

КОМІСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСЬКА С.І.✉

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

✉ svetlana_mykhalska@mail.ru

РІВЕНЬ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ В ТЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ СОНЯШНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Водний дефіцит є найбільш шкодочинним фактором довкілля, що спричиняє широкий спектр патологічних перебудов у рослинах. Водночас у природі є генотипи, які мають підвищений рівень стрес-стійкості. Для існування за умов дії осмотичних стресів такі варіанти відпрацювали ряд компенсаторних механізмів, серед яких провідну роль відіграє пролін (Pro). Ця амінокислота часто акумулюється у значних кількостях. Встановлена роль проліну як регулятора внутрішньоклітинного осмотичного потенціалу, стабілізатора клітинних структур; відмічена його участь у процесах відновлення та розвитку [1–4].

Структура та властивості молекули Pro такі, що ця сполука впливає на системи власного синтезу/катаболізму/транспорту. Вочевидь, рівень вільного проліну в тканинах рослин відображає ці події та динамічно змінюється впродовж усього онтогенезу. Особливо в значній мірі це має відбуватися за стресових умов. Пряме втручання в роботу ферментних комплексів, котрі регулюють коливання вмісту вільного проліну, може, в свою чергу, певним чином впливати на його зміни. Проте спроби збільшення вмісту вільного проліну в клітинах генно-інженерними методами до цього часу не дали однозначної відповіді про повний спектр його функцій у складному багатоступінчатому процесі адаптації рослин до стресу.

У зв'язку з цим особливу увагу привертають біотехнологічні рослини зі структурними модифікаціями геному, які обмежують баланс синтезу/катаболізму проліну. Такими об'єктами можуть бути отримані нами трансгенні рослини соняшника та їх насінневі покоління з інтегрованим супресором гена проліндегідрогенази (*ProDH*) – ферменту катаболізму проліну [5]. Очевидно, що супресія окремої ланки метаболізму може поміняти характер його функціонування в умовах стресу. Причому ефективність виживання залежить від стабілізації процесів

життєдіяльності та збереження цілісності організму.

Раніше при дослідженні швидких реакцій трансгенних рослин кукурудзи на дію осмотичних стресів ми відзначали явище перерозподілу вмісту вільного проліну між органами рослин [6]. Таким чином здійснювалася активна адаптація до стресових умов. Ці напрямки досліджень генетичної трансформації надають нові можливості для з'ясування фундаментальних питань, пов'язаних із закономірностями та особливостями фізіолого-біохімічних процесів стрес-стійкості.

Метою цієї роботи було визначення вмісту вільного проліну в різних органах ТЗ трансгенних рослин соняшника, які піддавали дії тривалого штучного зневоднення та з'ясування ролі проліну в загальній системі регуляції процесів стрес-стійкості *Helianthus annuus* L.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були сформовані рослини соняшника інбредної лінії VK-121 (селекції Інституту олійних культур НААН України, Запорізька область), контроль та ТЗ – біотехнологічні рослини з інтегрованим дволанцюговим РНК (длРНК) супресором гена проліндегідрогенази, отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму LBA4404, що несе векторну конструкцію pVi2E [7]. Наявність трансгена підтверджували ПЛР-методом, як описано раніше [5]. Насіння пророщували у вегетаційних ємностях за нормального водопостачання. Зневодненню піддавали двохтижневі рослини.

Рівень вільного проліну в досліджуваних варіантах визначали в пагонах і коренях за стандартною методикою [8]. Виміри здійснювали за нормальних умов вирощування та після 12-добового водного дефіциту, створеного припиненням поливу. Для оцінки ступеня стійкості рослин аналізували морфологічні показники

(висоту рослини – 1, масу пагона і кореня – m), які визначали водночас із відбором проб на пролін. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [9].

Результати та обговорення

Попередні наші дослідження трансгенних рослин Т0 – Т3 показали, що вони характеризуються суттєвим збільшенням рівня вільного проліну в нормі та за дії осмотичних стресів. Це явище було наслідком часткової супресії гена проліндегідрогепази [5]. Беззаперечним фактом

цього є аналіз експресії гена *ProDH* в Т3 трансгенних рослинах, який показав значне зниження активності ферменту проліндегідрогепази [10]. Крім того параметри фотосистеми два (ФСII), які відображають функціональний стан фотосинтетичного апарату і рослини в цілому, вказували на відсутність негативного впливу стресу на трансгенні рослини соняшника [11].

Як видно з даних, представлених на рисунку 1 (а), вимірювання Pro у рослин соняшника показало перевищення цього показника у Т3 відносно контролю.

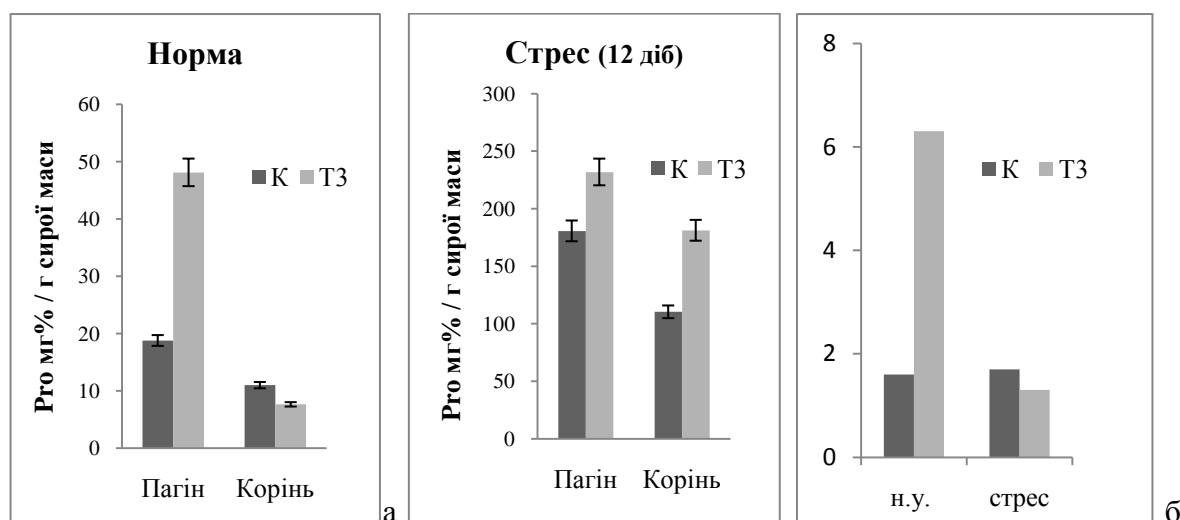


Рис. 1. Рівень вільного проліну в контрольних і трансгенних рослинах соняшника (а); співвідношення (пагін/корінь) проліну в рослинах соняшника (б).

Рівень вільного проліну в пагонах трансгенних рослин за нормального водозабезпечення зростав і перевищував контроль у 2,5 раза. Розподіл амінокислоти між надземною і кореневою частинами в контрольних рослин був 1,7 : 1, а в трансгенних – 6,3 : 1 (рис. 1 б).

За дії осмотичного стресу (12 діб без поливу) рівень Pro зростав у всіх досліджуваних рослин. При цьому в контрольних рослинах розподіл амінокислоти між частинами рослини залишався без змін, тоді як у трансгенних суттєво змінювалося співвідношення в бік збільшення вмісту в коренях. На нашу думку, зростання рівня вільного проліну, ймовірно, відбувалося за рахунок його перерозподілу між органами (транспорту з надземної частини). Подія збільшення вмісту Pro в коренях за рахунок його синтезу менш імовірна, оскільки 12-добовий осмотичний стрес є суттєвим лімітуючим фактором. Можливо, надлишок проліну в трансгенних рослинах у нормі (за відсутності стресу) здат-

ний пом'якшити наслідки перших етапів впливу стресу, що дозволяє більш швидко і ефективно запустити механізми захисту, в тому числі й перерозподілу Pro по органах.

Ріст є інтегральною фізіологічною характеристикою при оцінюванні стійкості рослин до певних стресових факторів. Рослини соняшника з функціональним трансгеном випереджали в рості контрольні варіанти (рис. 2, 1–3). Водночас встановлені відмінності в накопиченні біомаси в трансгенних і контрольних рослинах. Як в умовах нормального водозабезпечення, так і в умовах припинення поливу маса пагонів та коренів трансгенних рослин була більшою, ніж контрольних варіантів. На нашу думку, в нормальних умовах вирощування таке явище може бути результатом підвищеного рівня проліну, який, крім того, що виконує осмопротекторну функцію, впливає на процеси росту та розвитку, тоді як обмеження росту за умов 12 добового стресу може бути відображенням різних реак-

цій. У контрольних рослинах як в умовах норми, так і за умов водного дефіциту співвідношення маси пагону до кореня не змінювалося, тоді як у Т3 рослинах в умовах стресу цей показник змінювався на перевагу кореня. Це може свідчити на користь активної адаптації, на що вказувало і явище транспорту проліну (рис. 1). Амінокислота накопичувалася у корені – органі, що найбільше потерпав від водного дефіциту.

На основі представлених результатів, можна зробити висновок, що часткова супресія

ProDH корелює з підвищенням неспецифічної стійкості до осмотичного стресу. В цьому випадку «стійкість» розглядається як розширення норми реакції, часто достатньо вагоме, що дозволяє говорити про можливість використання розробленого підходу для отримання форм господарсько-цінних рослин, здатних витримувати стресові навантаження й успішно відновлюватися після них.

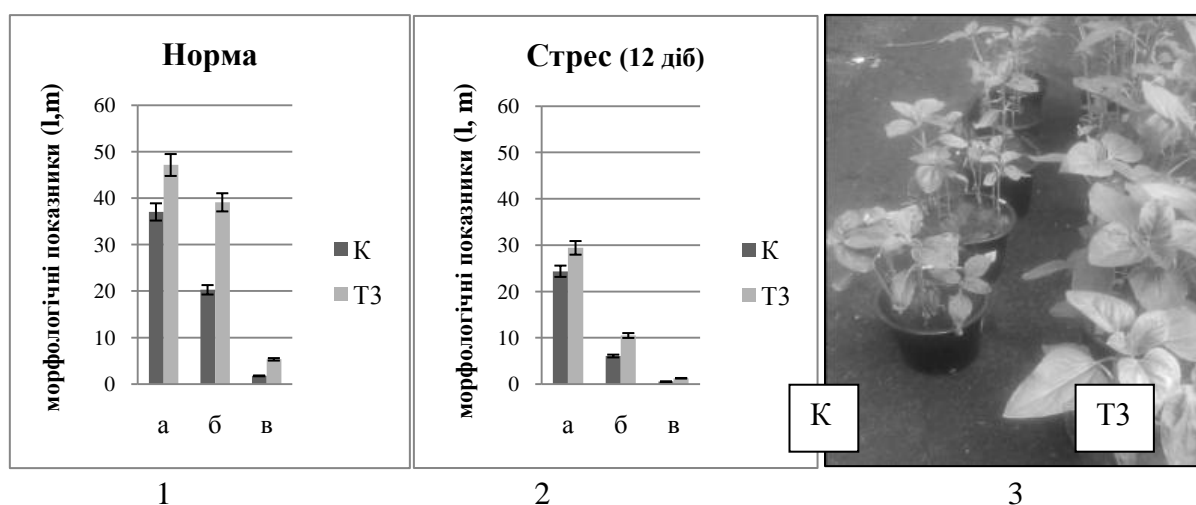


Рис. 2. Морфологічні показники – 1, 2: а – висота рослини (см); б – маса пагона (г); в – маса кореня (г); 3 – вирощування рослин у вегетаційному досліді.

Висновки

Отже, аналіз Т3 трансгенних рослин соняшника інбредної лінії VK-121 з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази показав підвищення рівня вільного проліну за різних умов вирощування. Причому в умовах

водного дефіциту рівень цієї амінокислоти в біотехнологічних рослинах регулюється не тільки синтезом, а й перерозподілом в органах. Очевидно, що таким чином створювався рівень Pro, оптимальний для підтримки осмотичного статусу всього організму.

Література

- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in plant science. – 2009. – 15, N 2. – P. 89–97.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu Rao K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Current Sci. – 2005. – 88, N 3. – P. 424–438.
- Miller G., Stein H., Honig A., Kapulnik Y., Zilberstein A. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation // Planta. – 2005. – 222. – P. 70–79.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // Planta. – 2003. – 218. – P. 1–14.
- Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.И., Моргун Б.В., Кочетов А.В. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду pVi2E с двухцепочечным РНК-супресором гена пролиндегидрогеназы // Цитология и генетика. – 2014. – 48, № 4. – С. 19–30.
- Сергеева Л.С., Михальська С.І., Курчій В.М., Тищенко О.М. Вміст вільного проліну в проростках кукурудзи як показник швидких реакцій на дію летальних осмотичних стресів *in vitro* // Физиология растений и генетика. – 2015. – 47, № 6. – С. 491–496.
- Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Тищенко О.М. Спосіб застосування *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* для отримання трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.). Патент України на корисну модель № 86108 від 10.12.2013. Бюл. № 23.

8. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tomum* // Изв. АН МССР. – 1981. – 4. – С. 55–60.
9. Доспехов Б.А. Методы полевой статистики. – М.: Агрохимия, 1985. – 351 с.
10. Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М., Тищенко О.М. Характеристика трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.) з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 143–147.
11. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Курчий В.М., Сытник С.К., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Физиолого-биохимическая характеристика трансгенных растений подсолнечника с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Физиология и биохимия растений. – 2015. – Т. 47, № 2. – С. 160–166.

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKAYA S.I.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

THE FREE PROLINE LEVELS IN TRANSGENIC SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) T3 PLANTS WITH DOUBLE-STRANDED PROLINE DEHYDROGENASE GENE RNA-SUPPRESSOR

Aim. The investigation of the T3 transgenic sunflower plants osmotic tolerance there were developed. The levels of free proline in plant shoots and roots were estimated. **Methods.** Mature sunflower plants (T3 and wild type) were cultured in standard pots. Those genotypes were tested during 12-day artificial drying. The levels of free proline in plant shoots and roots were measured. **Results.** The proline contents in transgenic plants preferred those parameters of control plants both under normal and stress conditions. The proline levels in shoots and roots increased in all genotypes cultivated under stress conditions. The shoot/root proline ratio of control plants was constant during whole experiment, while in T3 plants this parameter changed due to high elevation in roots. **Conclusions.** The changes of shoot/root proline ratio of T3 plants were the result of free proline transfer among plant organs.

Keywords: *Helianthus annuus* L., transgenic plants, L-proline, shoot/root proline ratio.