

СЕРГЄЄВА Л.Є., МИХАЛЬСЬКА С.І.✉, КУРЧІЙ В.М., ТИЩЕНКО О.М.©

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, (050) 380-65-15

## ПОРІВНЯЛЬНІ РЕАКЦІЇ РОСЛИН КУКУРУДЗИ НА ДІЮ ШТУЧНОГО ЗНЕВОДНЕННЯ

Серед біотехнологічних методологій отримання рослин із підвищеним рівнем посухостійкості активно застосовується генетична трансформація. Перспективним вважається напрямок, пов'язаний із виділенням генотипів, які вирізняються підвищеним вмістом осмотично активних сполук, а саме вільного проліну [1, 2]. Ця амінокислота має ряд особливостей, котрі роблять її неспецифічним стресовим протектором [3].

У попередніх дослідженнях із використанням агробактеріального штаму *LBA4404* з векторною конструкцією *pVi2E*, яка містила дволанцюговий (дл)РНК-супресор гена пролін-дегідрогенази, нами були отримані трансформанти кукурудзи [2]. (Рекомбінантний штам наданий д. б. н. О. В. Кочетовим, Інститут цитології і генетики СВ РАН). Трансгенний статус рослин Т1 було встановлено молекулярно-генетичним аналізом. Рослини характеризувалися підвищеним рівнем стійкості до стресів, викликаних водним дефіцитом, що було встановлено при їх тестуванні в умовах модельованого водного стресу з додаванням високих доз маніту, а також у вегетаційних дослідках за відсутності поливу. Були отримані насіннєві покоління.

Інтенсивність порушень, викликаних водним дефіцитом, зростає пропорційно терміну його впливу. Перевагу в цьому разі мають генотипи із підвищеним рівнем стійкості. Отримані в попередніх дослідженнях трансгенні форми кукурудзи витримували навіть летальні для звичайних рослин осмотичні стреси. При цьому їхня стійкість корелювала із підвищенням вмісту вільного проліну (*Pro*). Очевидно, що ці фізіолого-біохімічні переваги починали реалізовуватися і на початкових етапах стресу. Крім *Pro*, визнаною сумісною сполукою, яка бере участь у підтриманні осмотолерантності рослин, є сахароза [4, 5]. Відомо також про взаємодію цих речовин [6, 7].

Оскільки інтеграція трансгена призводила до змін метаболізму вільного проліну, то не від-

кидалася імовірність пролін-опосередкованої дії і на метаболізм вуглеводів.

З огляду на зазначене метою нашої роботи було дослідження особливостей реакцій рослин кукурудзи, пов'язаних із метаболізмом вільного проліну та вуглеводів, за дії нетривалого модельованого водного дефіциту.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були трансгенні рослини кукурудзи Т4 покоління, отримані шляхом генетичної трансформації лінії Л-370 (Л-370-Т0). Контролем слугувала вихідна лінія Л-370 селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Відібране стандартизоване насіння пророщували у вегетаційних ємностях на відкритому повітрі. Об'єм ґрунту, мінеральне живлення, водозабезпечення відповідали фізіологічним потребам. Для аналізу залишали по дві рослини у вегетаційному посуді. Аналізували 1,5-місячні рослини. Водний стрес створювали впродовж 4 діб природним повітряним підсушуванням ґрунту. Вміст *Pro* та вуглеводів визначали за стандартними методиками на 1-у і 4-у доби зневоднення, а також у перші години після відновлення поливу [4, 8]. Наважки тканин відбирали від кожної рослини однієї ємності, ділили на дві частини для одночасного визначення проліну та вуглеводів. Проби з однієї вегетаційної ємності вважали біологічним повтором.

### Результати та обговорення

Аналізували реакції сформованих рослин кукурудзи на дію нетривалого водного дефіциту. На 4-у добу у всіх рослин помічали аналогічні зовнішні зміни, а саме: зниження тургору у листків нижніх ярусів і скручування листкових пластинок у молодих. Після поновлення поливу рослини набували звичайного вигляду і в подальшому розвивалися без порушень. Різниці між варіантами не спостерігали, тобто зневоднення не було критичним і не викликало незворотних

патологій. Таким чином, на нашу думку, зафіксовані події можна вважати адаптаційними реакціями.

Перебіг реакцій відслідковували за динамікою змін метаболізму сумісних осмотично активних сполук – проліну та сахарози.

**Пролін.** Рисунок 1. Рівень вільного проліну на 1-у добу після припинення зволоження був аналогічний у всіх генотипів із незначною перевагою у трансгенних варіантів, що може вказувати на відсутність водного стресу. Із продовженням терміну зневоднення вміст *Pro* зростає. На 4-у добу підвищення складало: у контрольних рослин ~ 15,6 раза; у рослин T4 ~ 11,6 раза. Після відновлення поливу рівень вільного проліну у контрольних рослин знижувався і складав ~ 48 % від максимальних показників. У рослин T4 рівень амінокислоти практично не змінювався.

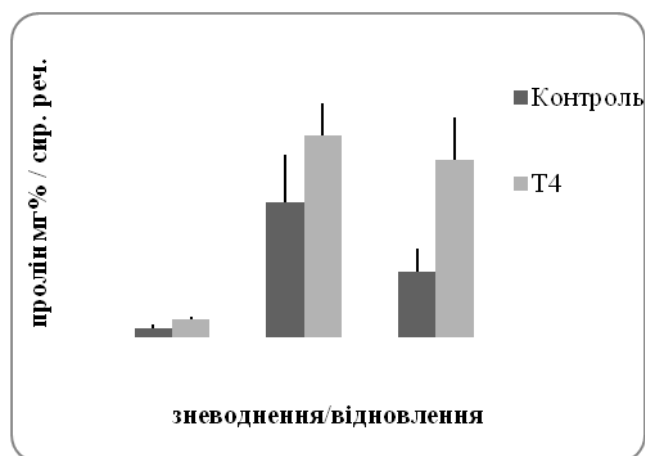


Рис. 1. Вміст вільного проліну в рослинах кукурудзи за умов нетривалого зневоднення/регидrataції.

**Вуглеводи, сахароза.** Рисунок 2, а. Вміст сахарози в досліджуваних генотипів на 1-у добу припинення поливу варіював за абсолютною величиною. Очевидно, таким чином проявлялися генотипові особливості, оскільки, як зазначалося, водного стресу рослини не відчували. На 4-у добу зневоднення фіксували різноспрямовані зміни вмісту сахарози в листках рослин. Так, у контрольних рослин рівень сахарози був стабільним. У рослин T4 вміст сахарози різко знижувався. Після регидrataції рівень сахарози в листках усіх варіантів зростає у різній мірі, але найбільше збільшення було властиве контролю.

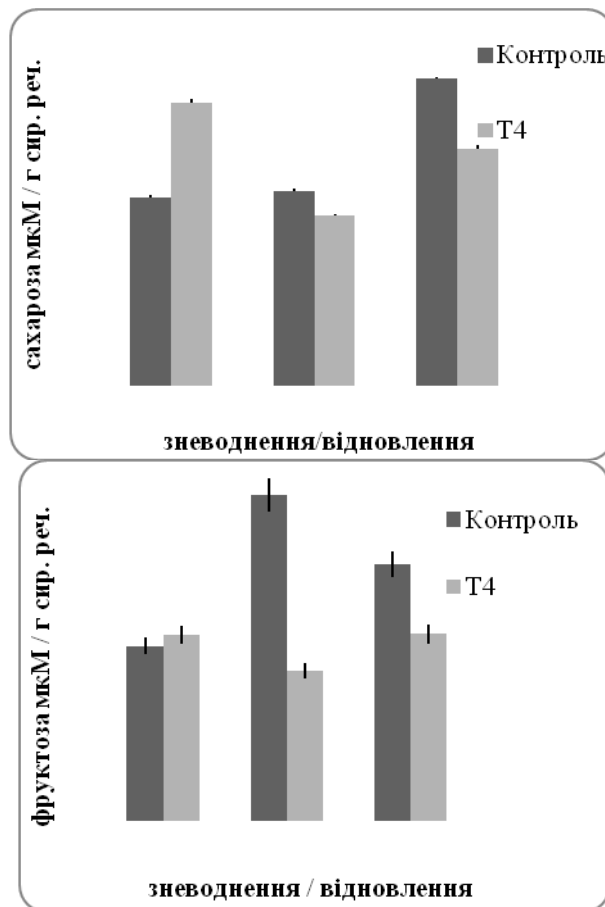


Рис. 2. Вміст вуглеводів, сахарози (а) і фруктози (б) в рослинах кукурудзи за умов нетривалого зневоднення/регидrataції.

**Вуглеводи, моноцукри (фруктоза).** Рисунок 2, б. За нормальних умов рівень фруктози в досліджуваних генотипів кукурудзи був тотожним. У ході продовження дії водного дефіциту рівень фруктози в листках змінювався, що може свідчити на користь факту підтримання метаболізму сахарози. У контрольних варіантів рівень моноцукрів збільшувався на 4-у добу підсушування та знижувався після регидrataції. У рослин T4 рівень фруктози коливався у незначних межах, синхронно до змін рівня сахарози. Відомо, що цукри, які нагромаджуються за стресових умов, передусім сахароза і фруктоза, захищають білки від денатурації та підтримують цілісність мембранних структур [9, 10]. Зокрема, сахароза може замінювати воду в структурі фосфоліпідів за стресів, які спричиняють зневоднення клітин [11].

Вміст вуглеводів змінювався таким чином, що їх баланс (відношення сахароза/фруктоза) у контрольних рослин істотно знижувався при зне-

водненні та нормалізувався при регідратації. У Т4 рослин цей показник майже не змінювався (рис. 3)

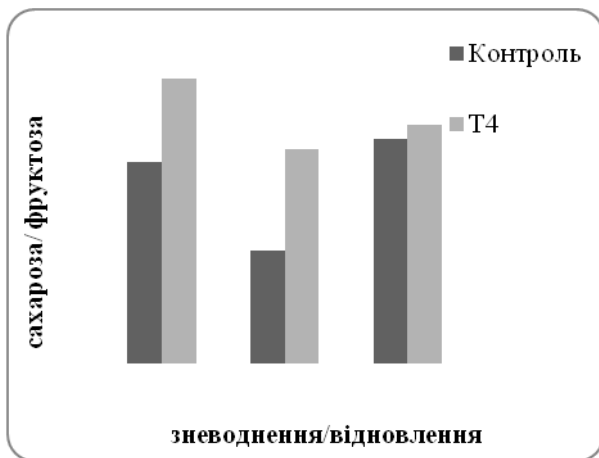


Рис. 3. Співвідношення сахароза/фруктоза в рослинах кукурудзи за умов нетривалого зневоднення / регідратації.

Порівнюючи показники метаболізму вільного проліну та вуглеводів у варіантів кукурудзи, можна помітити їх характерні особливості. Так, у контрольних рослин зміни рівня цих сумісних осмолітів здійснювалися координовано, але у протилежних напрямках.

Збільшення вмісту вільного проліну у рослин, які зазнають дії стресу, можуть відбувати-

ся як в результаті зростання його синтезу, так і внаслідок деградації пролін-містких структур клітини [12]. Характер змін рівня амінокислоти у контрольних варіантів за умов норма → стрес → відновлення свідчить на користь першої події (синтез); системи метаболізму сахарози діяли паралельно, з перевагою то в один, то в інший бік.

У той же час у рослин Т4 при посиленні водного дефіциту рівень вільного проліну зростає суттєвіше, ніж у контрольних варіантів, і підтримувався у перші години після регідратації. Вміст вуглеводів у рослинах Т4 змінювався аналогічно контролю, проте коливання сприяли підтриманню співвідношення вуглеводів.

### Висновки

Таким чином, проведено порівняльне дослідження реакцій рослин кукурудзи на дію короткотривалого водного дефіциту дає можливість зробити такі висновки. По-перше, реакції всіх генотипів можна вважати проявом активної адаптації до несприятливих умов. По-друге, стрес-протекторною сполукою для досліджуваних варіантів кукурудзи є вільний пролін. По-третє, підвищення рівня вільного проліну у рослин Т4 (відносно контролю) сприяє підтриманню балансу вуглеводів.

### Література

1. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013. – Т. 45, № 31. – С. 489–500.
2. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю., Коберник Н.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н., Моргун В.В. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 6. – С. 482–489.
3. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010. – V. 15. – P. 89–97.
4. Сакало В.Д., Ларченко К.А., Курчій В.М. Синтез і метаболізм сахарози в листках проростків кукурудзи за умов водного дефіциту // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 305–313.
5. Ho S.-L., Chao Y.-C., Tong W.-F., Yu S.-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth – and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanism // Plant Physiol. – 2001. – V. 125, № 4. – P. 877–890.
6. Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M.M., Smeekens S. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase 1 and proline dehydrogenase 2 // Plant J. – 2008. – V. 53. – P. 935–949.
7. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. A novel subgroup of bZIP protein functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. – 2004. – V. 45. – P. 309–317.
8. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., Дьяченко Н.И., Чиликина Л.А., Дроздов В.В., Корочкина С.К., Череп Г.И., Медведев В.В., Нютин Ю.И. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourn* // Известия Академии Наук Молдавской ССР. – 1981. – № 4 – С. 55–60.
9. Arata Y., Fukushima E., Endo T. Effect of sucrose on the protection of photosynthetic activity under salt stress // Plant and Cell Physiol. – 1999. – V. 40. – Suppl. – P. 144.
10. Iwahashi H., Obuchi K., Fuji S., Komatsu Y. The correlative evidence suggesting that trealose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1995. – V. 255. – P. 5518–5522.

11. Caffery M., Tonseca V., Leopold A.C. Lipid-sugar interaction Reveaauce to anhydrous biology // Plant Physiol. Proline. – 1988. – V. 86. – P. 754–758.
12. Stein H., Honig A., Miller G., Erster O., Eilerberg H., Csonka L.N. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradion in plants // Plant Sci. – 2011. – V. 181. – P. 140–150.

**SERGEEVA L.E., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M., TISHCHENKO E.N.**

*Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine,  
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: svetlana\_mykhalska@mail.ru*

#### **CORN PLANT COMPARATIVE REACTIONS TO ARTIFICIAL DEHYDRATION**

**Aim.** There are maize plants of inbred line L-370 (control) and from T4 progeny of plants transformed via *in planta* *Agrobacterium*-mediated transformation with *LBA4404* strain harboring pBi2E with double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene. The free proline and sucrose levels, sucrose/fructose ratio during period of desiccation/rehydration were investigated. **Methods.** Maize T4 progeny and initial plants of L-370 line were cultivated in containers. Variants were tested under short term (4 days) dehydration and after 3.5 hours of rehydration. The free proline and carbohydrates levels were estimated at those times of the experiment. **Results.** The short-term water deficit did not create pathological changes in plants. But the free proline levels rose in leaves of all variants. At the same time the amino acid levels under stress condition in T4 plans were higher than in L-370-plants. After 3.5 hours of rehydration the proline content in control plants decreased and stayed without changes in T4 plans. In T4 plants the carbohydrate metabolism systems energy maintained the stability of the sucrose/fructose ratio during the whole time of experiment. **Conclusions.** The T4 plants high level of water stress tolerance is a possible result of transgene activity.

**Keywords:** *Zea mays*, *Agrobacterium*-mediated transformation, T4-progeny, short-term water stress, dehydration, proline sucrose.