

УДК 577.21

## ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ОСМОТОЛЕРАНТНЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ КУКУРУЗЫ С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

С.И. МИХАЛЬСКАЯ<sup>1</sup>, Л.Е. СЕРГЕЕВА<sup>1</sup>, А.Ю. МАТВЕЕВА<sup>1</sup>, Н.И. КОБЕРНИК<sup>1</sup>,  
А.В. КОЧЕТОВ<sup>2</sup>, Е.Н. ТИЩЕНКО<sup>1</sup>, В.В. МОРГУН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины  
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук  
630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего рВi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы (*ProDH*), получено семенное поколение трансгенных растений кукурузы (*Zea mays* L.), выдержавших при прорастании моделированное маннитом летальное обезвоживание. Определено многократное возрастание содержания свободного *L*-пролина в побегах осмотолерантных Т2-растений в условиях водного стресса. Полученные данные свидетельствуют о перспективности siРНК-технологий для повышения уровня устойчивости кукурузы к водному дефициту.

**Ключевые слова:** *Zea mays* L., пролин, двухцепочечный РНК-супрессор *ProDH*, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta*.

Одно из направлений генетической инженерии по повышению уровня устойчивости культурных растений к осмотическим стрессам связано с использованием генов, контролирующих метаболизм свободного *L*-пролина (Pro). Всесторонние генетические и физиолого-генетические исследования, в том числе с использованием методов генетической инженерии и экспериментального мутагенеза, сформировали точку зрения о Pro как о полифункциональной аминокислоте, которая может принимать участие в сложных интегральных процессах адаптации/устойчивости растений. Развивается также представление о Pro как о сигнальной/регуляторной молекуле в ходе роста, дифференцировки клеток и их программированной гибели [3, 4, 9, 14, 19, 25, 29, 31, 35]. Вместе с тем участие свободного пролина в процессах осмотолерантности не всегда очевидно. Об этом свидетельствуют результаты анализа трансгенных растений и некоторых диких видов, включая культурные злаки [20, 31]. Помимо этого повышение содержания Pro может быть сопряжено только с одним из стрессовых факторов — водным дефицитом или засолением [2, 22]. Ряд аспектов биологической функции Pro, в том числе связанных с ролью отдельных генов, контролирующих его метаболизм, остаются недостаточно изученными и противоречивыми.

При разработке молекулярных биотехнологий, направленных на повышение уровня стрессоустойчивости культурных растений, основное внимание уделяется генам синтеза — *P5CS* и катаболизма — *ProDH* про-

лина, кодирующим ферменты соответственно  $\Delta^1$ -пирролин-5-карбоксилатсинтетазу (КФ 2.7.2.11.1.2.1.41) и пролиндегидрогеназу (КФ 1.5.99.8). Эти гены представлены в ядерном геноме двумя копиями, показывают высокий уровень гомологии среди двудольных и однодольных и могут выполнять различные функции, связанные с реакцией на стресс и (или) с пролиферацией, дифференцировкой клеток растений [16, 20, 21, 26, 28, 32]. Вместе с тем экспрессия гомологичных копий генов синтеза или катаболизма пролина в условиях стресса может осуществляться дифференциально как в ответ на разные типы стрессоров, так и при последующем восстановлении после стресса [9, 10, 15]. Относительно генов *ProDH* растений известно, что их экспрессия преимущественно регулируется на транскрипционном уровне де- и регидратацией, а также экзогенным *L*-пролином. В ответ на стресс уменьшается количество мРНК и снижается ее накопление при регидратации [17, 23, 27].

В связи с полифункциональностью и различиями в уровнях экспрессии генов метаболизма Про целесообразен предварительный анализ эффективности их применения для получения биотехнологических продуктов. При этом для аккумуляции свободного *L*-пролина используют два основных подхода: 1 — введение дополнительного числа копий кДНК *P5CS*; 2 — частичная супрессия эндогенных генов пролиндегидрогеназы за счет фрагментов генов *ProDH* в антисмысловой ориентации или в форме обращенного повтора, в результате чего изменения в их экспрессии осуществляются путем посттранскрипционного сайленсинга РНК.

Целью данной работы был анализ содержания свободного *L*-пролина в побегах на ранних этапах онтогенеза кукурузы, трансформированной *in planta* с использованием обезоруженного агробактериального штамма *LB44404*, несущего плазмиду *pBi2E* с двухцепочечным (дц) РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, в условиях водного дефицита.

### Методика

Объектами исследования были инбредные линии кукурузы 370, 390, 1555 селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины. *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию *in planta* проводили частично модифицированным нами способом Чумакова и соавт. [11], где после изоляции пестичных нитей осуществляли инокуляцию штаммом *LB44404* (*pBi2E*) с последующим опылением пыльцой того же растения [12]. Для повышения частоты трансформации в модифицированную нами среду инокуляции добавляли сурфактант — *Silwet L-77* («Lehle Seed», США) концентрацией 0,01 %.

Двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы кукурузы получен на основе фрагмента первого экзона гена *ProDH1* арабидопсиса, расположенного как обращенный повтор, включающий фрагмент первого интрона этого же гена [8]. Интеграцию рекомбинантных молекул ДНК анализировали ПЦР-методом по наличию фрагментов экзона, интрона гена *ProDH1* арабидопсиса и гена селективного агента — канамицинсульфата [5]. При этом отсутствие агробактериальной примеси в трансгенных растениях определяли по гену *virD1*.

Стрессоустойчивые варианты отбирали в условиях моделированного летального обезвоживания (0,5 М раствор маннита). Их семенное поколение (Т2) выращивали, увеличивая стрессовое давление до 0,8 М маннита.

Уровень свободного *L*-пролина в побегах проростков определяли по стандартной методике [1]. Пробы отбирали и фиксировали в одно и

то же время суток. Динамику содержания свободного Pro в условиях стресса и в период восстановления после стресса определяли в побегах каждого индивидуально развивающегося проростка (по 3 аналитических и 4–6 биологических повторов). В качестве контроля принимали содержание L-пролина в нетрансформированных побегах, культивируемых в условиях стресса и (или) в нормальных условиях. При статистической обработке результатов сравнительных исследований применяли критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В условиях действия летальной дозы стрессора жизнеспособными оставались только трансгенные растения, молекулярно-генетический анализ которых показал наличие элементов векторной конструкции, образующих дцРНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы (рис. 1). При этом агробактериальная примесь отсутствовала. Очевидно, в таких условиях ген *ProDH* выступает детерминантой в поддержании активного метаболизма пролина. Объективным критерием этого являются динамические изменения в содержании свободного пролина в условиях норма → стресс → норма (повышение при стрессе и снижение при регидратации). Он основан на результатах исследования характера экспрессии гена *ProDH* растений при умеренных дозах стрессора и используется в исследованиях, связанных с изучением роли генов пролиндегидрогеназы в процессах адаптации (устойчивости) растений к абиотическим стрессам [17, 20].

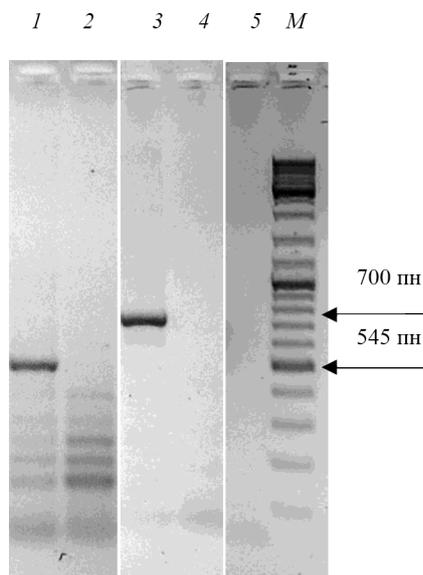


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов Т1-растений кукурузы, отобранных в условиях летального обезвоживания:

1,3 — с использованием праймеров к фрагментам соответственно экзона и интрона гена *ProDH* арабидопсиса, размер ампликонов которых составляет 545 и 700 пн; 2, 4 — ДНК нетрансформированных растений; 5 — негативный контроль; М — маркер молекулярных масс GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

Результаты такого эксперимента на примере трансгенных Т2-растений инбредной линии 370 представлены на рис. 2. В данном случае зерновки, которые прорастали при наличии 0,5 М раствора маннита, параллельно переносили в условия регидратации и сверхжесткого стресса (0,8 М раствор маннита). При регидратации за короткий период культивирования (в течение 1 сут) происходило резкое падение содержания свободного пролина до значений, сопоставимых с таковыми у контрольных растений, растущих в нормальных условиях. При сверхжестком стрессе культивирования (в течение 15 сут) происходило ~5–9-кратное повышение уровня аккумулированного Pro (см. рис. 2, а). По мере дальнейшего увеличения (до 22 сут) продолжительности стрессового давления при сверхжестком стрессе он значительно снижался (см. рис. 2, б). Такая реакция на водный дефицит является отражением процес-

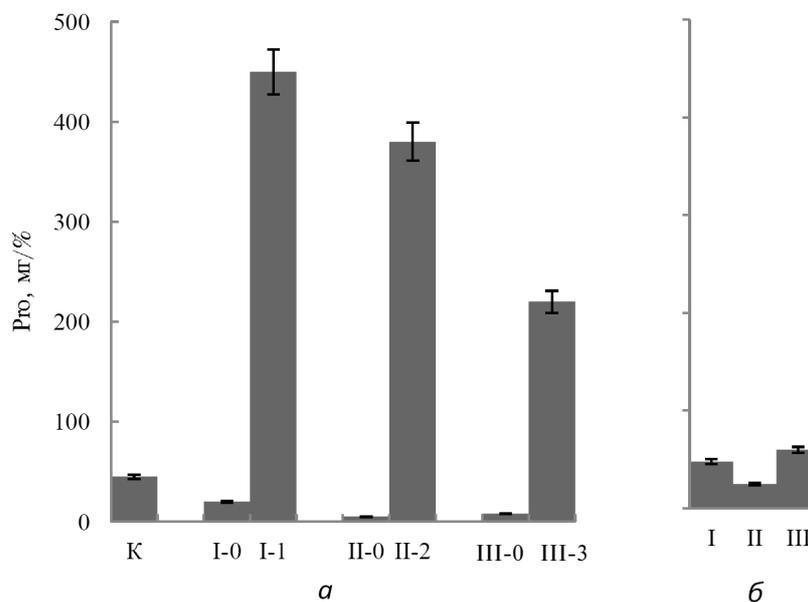


Рис. 2. Изменение содержания свободного *L*-пролина в побегах индивидуальных Т2-трансформантов кукурузы (варианты I, II, III) инбредной линии 370 в условиях культивирования при сверхжестком стрессе (I-1, II-2, III-3) и при регидратации (I-0, II-0, III-0):

*а* — культивирование в нормальных условиях в течение 1 сут (на воде) и при стрессе (0,8 М водный раствор маннита) в течение 15 сут; *б* — продолжение культивирования при сверхжестком стрессе (до 22 сут)

сов адаптации трансгенных растений кукурузы. Полученные данные дают основание полагать, что повышенный уровень свободного пролина, конститутивно синтезируемого в трансгенных растениях на ранних этапах онтогенеза кукурузы, будет способствовать преодолению негативно-го влияния водного дефицита в условиях *in vivo*.

Изучение содержания свободного *L*-пролина в побегах 14-суточных проростков индивидуальных трансформантов кукурузы, которые проращивали и культивировали на фоне летального обезвоживания (0,5 М раствор маннита), показало 2—4-кратное превышение этого показателя относительно контроля — исходных инбредных линий (рис. 3). Это также свидетельствует в пользу участия свободного *L*-пролина в реакции на стресс, вызванный водным дефицитом.

Жизнеспособность трансформантов, сопряженная с повышением уровня содержания Pro, поддерживалась и при адаптации к условиям сверхжесткого стресса, моделированного с применением 0,8 М раствора маннита (рис. 4). В данном случае проростки предварительно культивировали в нормальных условиях на воде или среде МС, содержащей макро- и микроэлементы половинного состава (МС/2), а далее в условиях стресса (0,8 М раствора маннита). Независимо от типа используемых сред у трансгенных вариантов на ранних этапах культивирования происходило значительное превышение количества Pro (~16—20-кратное) относительно контроля — растений, выращиваемых в нормальных условиях или при стрессе.

Повышение уровня свободного пролина наблюдалось не только на ранних этапах роста и дифференцировки клеток проростков при осмотическом стрессе, но и в верхних листьях трансгенных растений в фазу молочной спелости, культивируемых в условиях вегетационного опыта.

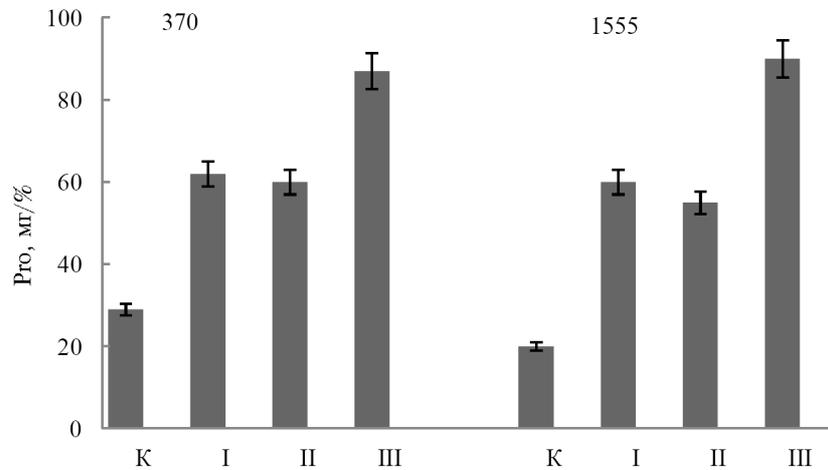


Рис. 3. Аккумуляция свободного *L*-пролина (мг% массы сырого вещества) в побегах 14-суточных проростков индивидуальных трансформантов инбредных линий кукурузы 370 и 1555 (варианты I, II, III), которые проращивали и культивировали в условиях летального обезвоживания (0,5 М раствор маннита); К — контроль (линии 370 и 1555 при тех же условиях моделированного водного дефицита)

Его уровень втрое превышал значения, определенные в контрольных (нетрансгенных) растениях исходной инбредной линии в нормальных

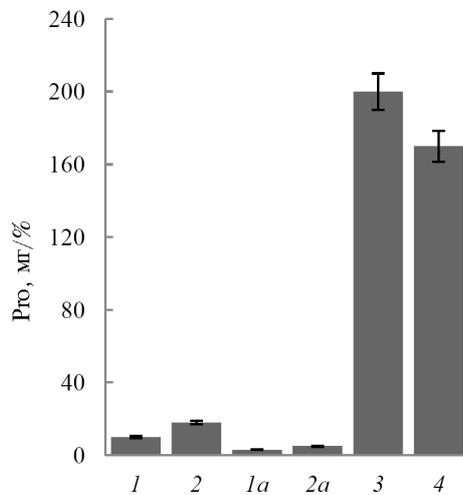


Рис. 4. Содержание свободного *L*-пролина (мг% массы сырого вещества) в побегах проростков кукурузы инбредной линии 390, трансформированной с использованием *LBA4404* (pBi2E), при адаптации к условиям сверхжесткого стресса:

1, 1a — контроль; 2, 2a — трансформанты соответственно на 4-е (1, 2) и 14-е (1a, 2a) сутки в нормальных условиях культивирования; 3, 4 — проростки трансформантов, культивируемых в течение 4 сут в нормальных условиях и далее 10 сут в условиях водного стресса (общий возраст проростков 14 сут), моделированного 0,8 М раствором маннита соответственно в воде и среде МС/2

условиях культивирования *in vivo*. При этом фенотипических различий между анализируемыми вариантами не обнаружено. Можно ожидать, что конститутивная аккумуляция свободного *L*-пролина на ранних и поздних этапах онтогенеза будет способствовать поддержанию роста и развития растений кукурузы в неблагоприятных условиях окружающей среды в течение вегетации.

Следует отметить, что одно из первых среди немногочисленных до настоящего времени исследований, которое свидетельствует в пользу регуляторной роли siRNA, связано с повышением уровня толерантности арабидопсиса к засолению как результатом антисмыслового перекрытия пары генов *P5CDH* (смысловой) и *SR05* (антисмысловой) [13]. Первый из них — *P5CDH* — связан с метаболизмом *L*-пролина (кодирует P5C-дегидрогеназу, превращающую P5C в глутамат),

функция второго, который индуцировался при засолении, не выяснена. Вместе с тем, хотя продемонстрирована важная роль *pat-siRNA* в процессе осмотолерантности, снижение активности фермента P5CDH может приводить к аккумуляции P5C (токсичного промежуточного метаболита) и, как результат, к запрограммированной клеточной гибели. В связи с этим при разработке молекулярных биотехнологий рассматриваются возможности направления, связанного с частичной супрессией гена пролиндегидрогеназы.

В целом сведения о *siRNA*-технологиях растений ограничены и неоднозначны. В частности, показано 1,5–6-кратное повышение содержания свободного *L*-пролина в трансформантах табака относительно не-трансгенного контроля, тогда как изменения в аккумуляции этой аминокислоты в растениях, несущих «антисмысловые» конструкции, варьировали в более узких пределах (1,5–3 раза) [8]. Наряду с этим представлены данные о том, что применение *siRNA*-технологий, которые теоретически считаются более эффективными для частичной супрессии генов, чем «антисмысловые», не всегда себя оправдывает. Так, активность фермента NtProDH в трансгенных клеточных линиях табака, содержащих дцРНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы, повышалась всего лишь на 4,9–32,2 % относительно дикого типа, при этом повышение уровня свободного *L*-пролина колебалось в пределах 1,2–3 раза [33]. В наших исследованиях, где использовалась указанная выше конструкция [8], устойчивость трансгенных растений кукурузы к летальным дозам сульфатнохлоридного засоления сопровождалась значительной аккумуляцией Pro [6]. Такая же реакция наблюдалась и у трансгенных растений подсолнечника, устойчивых к летальному обезвоживанию и разным типам засоления [10]. Повышение содержания свободного пролина отмечали Моисеева и соавт. [7] в трансгенных растениях кукурузы, несущих фрагмент гена пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации.

Таким образом, получено семенное поколение трансгенных растений кукурузы с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, устойчивых к летальному обезвоживанию. Показано 15–20-кратное повышение содержания свободного *L*-пролина в побегах осмотолерантных T2-растений на ранних этапах их развития при водном дефиците. Сопряженность осмотолерантности и аккумуляции Pro свидетельствует о перспективности метаболической инженерии по повышению уровня устойчивости кукурузы к водному дефициту с использованием дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы.

Работа поддержана грантом совместных научных проектов НАН Украины (16-05-2012) – СО РАН (№ 11).

1. Андриюченко 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.
2. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов // Физиология растений. — 2012. — 59. — С. 99–107.
3. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. — 2004. — 40, № 2. — С. 282–285.
4. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. — 1999. — 46. — С. 321–336.
5. Михальская С.И., Адаменко Н.И., Моргун Б.В. и др. Компетентность к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сегментов побега элитных инбредных линий кукурузы // Биотехнология. — 2012. — 5, № 3. — С. 98–105.

6. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е. и др. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных *in planta* с использованием LVA4404, несущего рВи2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Изв. Самар. науч. центра РАН. — 2013. — **15**, № 3 (5). — С. 1662—1665.
7. Моисеева Е.М., Агаонов Д.А., Великов В.А. и др. Повышение содержания пролина в растениях кукурузы, экспрессирующих фрагмент гена пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации // Физиология растений. — 2012. — **59**, № 3. — С. 457—460.
8. Тумов С.Е. Изучение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Новосибирск, 2008. — 18 с.
9. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология растений и генетика. — 2013. — **45**, № 1. — С. 489—500.
10. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И. и др. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма LVA4404, несущего плазмиду рВи2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Цитология и генетика. — 2014. — **48**, № 4. — С. 19—30.
11. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А. и др. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // Генетика. — 2006. — **42**, № 8. — С. 1083—1088.
12. Патент на корисну модель № 77331 від 11.02.2013. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* / О.Ю. Матвеева, О.М. Тищенко, Б.В. Моргун.
13. Borsani O., Zhu J., Verslues E.P. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis* // Cell. — 2005. — **123**. — P. 1279—1291.
14. Cecchini N.M., Monteoliva M., Alvares M.E. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms // Plant Signal Behav. — 2011. — **6**, N 8. — P. 1195—1197.
15. Dobra J., Vankova R., Havlova M. et al. Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery // J. Plant Physiol. — 2011. — **168**, N 13. — P. 1588—1597.
16. Hur J., Jung K.H., Lee C.H., An G. Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice // Plant Sci. — 2004. — **167**. — P. 417—426.
17. Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 1996. — **8**. — P. 1323—1335.
18. Ma A., Mitchell H.J., Deuschle K., Pryor A.J. Comparative analysis in cereals of a key proline catabolism gene // Mol. Gen. Genomics. — 2005. — **274**, N 5. — P. 494—505.
19. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? // Plant J. — 2002. — **3**, N 16. — P. 699—712.
20. Mani S., Van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **128**. — P. 73—83.
21. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate proline accumulation // Planta. — 2005. — **222**, N 1. — P. 70—79.
22. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y. et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. — 1999. — **461**. — P. 205—210.
23. Oono Y., Seki M., Nanjo T. et al. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7,000 full-length cDNA microarray // Plant J. — 2003. — **34**, N 6. — P. 868—887.
24. Peng Z., Lu Q., Verna D.P. Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants // Mol. Gen. Genet. — 1996. — N 3. — P. 334—341.
25. Polavarapu B., Kavi K., Nese S. Is proline accumulation *per se* correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? // Plant Cell Environ. — 2014. — **37**. — P. 300—311.
26. Saeid M.A.-R., Ammari T.G., Irshaid L.A. et al. Cloning and expression patterns of the *HvP5CS* gene from barley (*Hordeum vulgare*) // J. Food, Agric. Environ. — 2011. — **9**, N 3—4. — P. 279—284.
27. Satoh R., Nakashima K., Seki M. et al. ACTCAT/ a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase gene in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **130**, N 3. — P. 709—719.

28. *Servet C., Ghelis T., Richard L. et al.* Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis // *Front Biosci.* — 2012. — **1**, N 17. — P. 607–620.
29. *Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E.* Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential // *Plant Physiol.* — 2011. — **157**. — P. 292–304.
30. *Su M., Li X.-F., Ma X.-Y. et al.* Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment // *Plant Sci.* — 2011. — **181**. — P. 652–659.
31. *Szabados L., Savoure A.* Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* — 2009. — **15**, N 2. — P. 89–97.
32. *Szekely G., Abraham E., Cseplo A. et al.* Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis // *Plant J.* — 2008. — **53**, N 1. — P. 11–28.
33. *Tateishi Y., Nakagata T., Esaka M.* Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique // *Physiol. Plant.* — 2005. — **125**. — P. 224–234.
34. *Turchetto-Zolet A.C., Margis-Pinheiro M., Margis R.* The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis // *Mol. Gen. Genomics.* — 2009. — **281**. — P. 87–97.
35. *Verbruggen N., Hermans C.* Proline accumulation in plants: A review // *Amino Acids.* — 2008. — **35**. — P. 753–759.

Получено 12.09.2014

ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ В ОСМОТОЛЕРАНТНИХ  
ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ КУКУРУДЗИ ІЗ ДВОЛАНЦЮГОВИМ  
РНК-СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

*С.І. Михальська<sup>1</sup>, Л.Є. Сергєєва<sup>1</sup>, О.Ю. Матвєєва<sup>1</sup>, Н.І. Коберник<sup>1</sup>, О.В. Кочетов<sup>2</sup>,  
О.М. Тищенко<sup>1</sup>, В.В. Моргун<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ  
<sup>2</sup>Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук,  
Новосибірськ

Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta з використанням штаму *LB4404*, який містить рBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*ProDH*), отримано насінневе покоління трансгенних рослин кукурудзи (*Zea mays* L.), яке витримало при пророщуванні модельоване манітом летальне зневоднення. Визначено багаторазове зростання вмісту вільного *L*-проліну в пагонах осмотолерантних T2-рослин за умов водного стресу. Отримані дані свідчать про перспективність siРНК-технологій для підвищення рівня стійкості кукурудзи до водного дефіциту.

THE ELEVATION OF FREE PROLINE CONTENT IN OSMOTOLERANT TRANSGENIC  
CORN PLANTS WITH dsRNA SUPPRESSOR OF PROLINE DEHYDROGENASE GENE

*S.I. Mykhalska<sup>1</sup>, L.E. Sergeeva<sup>1</sup>, A.Yu. Matveyeva<sup>1</sup>, N.I. Kobernik<sup>1</sup>, A.V. Kochetov<sup>2</sup>,  
O.M. Tishchenko<sup>1</sup>, V.V. Morgun<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine  
<sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences  
10 Lavrent'ev Pr., Novosibirsk, 630090, Russia

The transgenic corn plants (*Zea mays* L.) were obtained via in planta *Agrobacterium*-mediated transformation by *LB4404* strain harboring pBi2E with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. Their seeds survived under lethal water deficit simulating by mannitol. High levels of free proline in shoots of osmotolerant T2-plants under water stress were observed. Those data indicate the promising scope of siRNA technologies towards maize water deficit tolerance.

*Key words:* maize (*Zea mays* L.), proline, dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene, *Agrobacterium*-mediated transformation in planta.