

УДК 581.1:58.02+58.009

СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА И САХАРОЗЫ В КАЛЛЮСНЫХ КУЛЬТУРАХ КУКУРУЗЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАННЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ

Л.Е. СЕРГЕЕВА, В.М. КУРЧИЙ, А.Ю. МАТВЕЕВА, Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Исследовали содержание свободного пролина, сахарозы и соотношение моносахара/сахароза в клетках каллюсных культур кукурузы. Каллюс получен из T1 растений кукурузы линии Л-390, трансформированной *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду pBi2E с двухпочечным (дц)РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы (Л-390-T1), и растений инбредной линии Л-390 (контроль). Каллюсные культуры в течение 10 сут подвергали воздействию осмотических стрессов (2 %-й раствор солей морской воды, 0,5 М раствор маннита). В норме содержание пролина у всех вариантов было невысоким, а содержание сахарозы у варианта Л-390-T1 превышало контроль в 7,5 раза. На 10-е сутки культивирования в стрессовых условиях начинали проявляться различия в устойчивости между вариантами. Под действием маннита в контроле уровень пролина не изменялся, а содержание сахарозы возрастало на порядок относительно нормальных показателей. При наличии солей морской воды соотношение моносахара/сахароза увеличивалось незначительно, тогда как аккумуляция пролина превышала показатель нормы в 2,8 раза. У Л-390-T1 при осмотическом стрессе любого типа уровень свободного пролина возрастал незначительно, а соотношение углеводов было тождественным. На 10-е сутки воздействия осмотического стресса в нормальных клетках реализовывались различные защитные реакции в зависимости от типа стресса; трансформированная каллюсная культура поддерживала нормальное функционирование.

Ключевые слова: *Zea mays* L., кукуруза, каллюсная культура, генетическая трансформация, дцРНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы, засоление, водный дефицит, пролин, сахароза, устойчивость.

Потребность в получении растений с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам не ослабевает. Стратегии решения настоящей проблемы разнообразны, одна из них направлена на получение форм, отличающихся повышенным содержанием низкомолекулярных совместимых осмотически активных веществ. Некоторые из этих соединений находятся в сложной реципрокной зависимости; нередко их синтез и аккумуляция взаимно координируются. В частности, это касается пролина и сахарозы.

Так, в каллюсе батата при действии жесткого моделированного водного стресса содержание растворимых сахаров за короткий период быстро возрастало, но затем так же быстро снижалось. Компенсировав снижение содержания сахаров, уровень пролина повышался в середине и конце стресса [12]. Высокие концентрации сахарозы индуцируют экспрессию гена синтеза пролина *P5KC* (*P5CS*, кодирует Δ^1 -пирролин-5-

карбоксилатсинтетазу), тогда как высокие дозы пролина, напротив, ингибируют. В то же время гену пролиндегидрогеназы (*ПДГ*, *ProDH*) присуща обратная реакция [4, 7, 8]. Установлено, что быстрая индукция транскрипции одного из генов пролиндегидрогеназы — *ProDH2* — осуществляется при участии транскрипционного фактора bZIP11, активируемого сахарозой. Сама сахароза непосредственно ингибирует экспрессию гена *ProDH2*, тогда как пролин и NaCl ее индуцируют [6, 8, 10].

Ценную информацию о роли свободного пролина, растворимых сахаров и их взаимосвязи в процессах устойчивости к различным абиотическим стрессорам могут предоставить трансгенные растения, в которых изменен уровень экспрессии конкретных генов, контролирующих их метаболизм. Большой интерес представляет изучение культуры клеток, индуцированных из таких форм, благодаря исключению перераспределения соединений между органами, которое может существенно усложнить и даже исказить оценку происходящих событий.

Целью данной работы было изучение содержания свободного пролина, сахарозы, соотношения моносахара/сахароза под действием осмотических стрессов в каллюсных культурах, инициированных из T1-растений кукурузы, трансформированной *in planta* с использованием штамма агробактерии LVA4404, несущего плазмиду pBi2E с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы.

Методика

Объектом исследования были каллюсные культуры, полученные из T1-растений инбредной линии кукурузы Л-390, трансформированной *in planta* с использованием плазмиды pBi2E, и обычных растений этой же линии (контроль) селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины.

Векторная конструкция представляла собой обращенный повтор, состоящий из фрагментов первого экзона гена *ПДГ* арабидопсиса, разведенных фрагментом его первого интрона (дцРНК-супрессор гена *ПДГ*). Рекомбинантный штамм был получен и предоставлен д-ром биол. наук А.В. Кочетовым (Институт цитологии и генетики СО РАН).

До проведения анализа каллюс индуцировали и наращивали на агаризованной культуральной среде FS1 [5]. Для проведения эксперимента клеточную биомассу равномерно наслаивали на свежую среду (нормальные условия), а также помещали в условия моделированных осмотических стрессов, которые создавали, прибавляя к среде соли морской воды (20 г/л) либо маннит (0,5 М). Культуры выдерживали в течение 10 сут, после чего анализировали в них содержание свободного пролина и углеводов.

Уровень свободного пролина измеряли по стандартной методике [1]. Содержание сахарозы и моносахаров определяли по ранее описанной методике [2]. На диаграммах представлены средние значения трех биологических и не менее двух аналитических повторностей. Статистическая обработка результатов проведена согласно методике Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Низкие и умеренные уровни осмотических стрессов стимулируют широкий спектр адаптивных реакций, среди которых многие являются неспе-

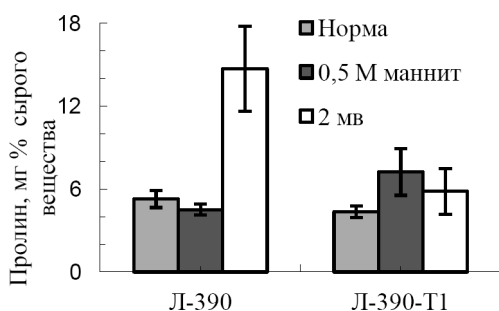


Рис. 1. Содержание пролина в каллусе кукурузы в норме и при осмотических стрессах (0,5 М маннит, 2 % солей морской воды (2 мв))

привнесения стрессоров) оказывал существенное влияние. В состав среды FS1 входит сахароза в количестве, оптимальном для нормальной жизнедеятельности клеточной культуры кукурузы.

В нормальных условиях содержание пролина в каллусе кукурузы невысоко и аналогично у L-390-T1 и контроля (рис. 1). В то же время содержание сахарозы в каллюсных клетках L-390 и L-390-T1 различалось и составляло соответственно $8,05 \pm 0,90$ и $60,56 \pm 2,07$ мкМ/г сырого вещества, т.е. превышение составило 7,5 раза. Однако содержание моносахаров у обоих генотипов различалось мало и составляло у контроля $53,48 \pm 1,62$, у L-390-T1 — $66,56 \pm 3,02$ мкМ/г сырого вещества. Соотношение углеводов в каллусе контроля было сдвинуто в сторону моносахаров.

При стрессовом воздействии начинались изменения. Отмечались различия, связанные с типами каллюса, осмотического стресса, уровнем накопления совместимых осмотически активных веществ. Прослеживались реакции со стороны системы метаболизма пролина (см. рис. 1). В клетках контроля уровень свободного пролина существенно (примерно в 2,6 раза) возрастал при засолении и не изменялся при действии маннита. В клетках культуры L-390-T1 содержание пролина на 10-е сутки стресса повышалось несущественно.

Содержание углеводов также изменялось (рис. 2). В каллусе контроля на 10-е сутки осмотического стресса резко возрастало содержание сахарозы; соотношение моносахара/сахароза составило $0,92 \pm 0,08$ при засолении и $0,61 \pm 0,03$ при добавлении маннита. Таким образом, у контрольного варианта при действии стрессоров реализовывались разные типы защитных реакций: пролинзависимые при засолении и сахарозозависимые при воздействии моделированного водного стресса. Можно предположить, что сахароза, поступившая в клетки, одновременно была источником энергии и углерода для клеток, а также приоритетным совместимым осмотически активным веществом. Хотя критического обезвоживания под действием маннита не происходило, смещение соотношения углеводов в сторону дисахарида мы квалифицировали как торможение реакций метаболизма сахарозы под воздействием стресса, моделирующего водный дефицит.

При засолении кроме сахарозы в клетки проникали ионы Na^+ и Cl^- . Эти токсичные ионы приводили к усиленной аккумуляции проли-

цифическими. Согласно литературным данным, используемые в нашем опыте концентрации стрессовых агентов считаются создающими сильный осмотический стресс [7].

В то же время 10-е сутки стрессового воздействия для клеточной культуры нельзя считать критическими. Однако защитные реакции уже начинали реализовываться и взаимоотношения между ними могли проявляться. Следует отметить, что в любом случае состав культуральной среды (сам по себе, без

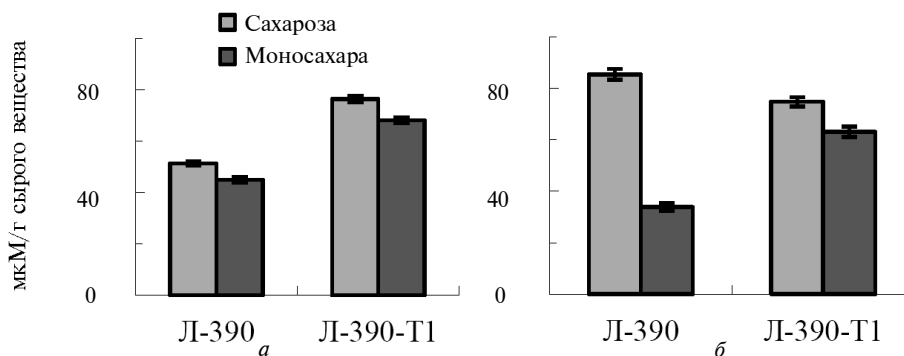


Рис. 2. Содержание углеводов в каллусе кукурузы при засолении 2 % солей морской воды (а) и водном стрессе при воздействии 0,5 М маннита (б)

на, что закономерно, поскольку роль пролина как детоксиканта хорошо известна [11].

Эти результаты дают основание предположить, что при доступности экзогенной сахарозы ключевую роль во взаимоотношении пролин/сахароза играл углевод. В нетрансформированных клетках реализовывались два типа защитных реакций, зависящих от характера осмотического стресса.

Анализируя клетки культуры Л-390-Т1, отмечали иную картину. При действии любого осмотического стресса содержание углеводов и свободного пролина увеличивалось в одинаковой мере. Соотношение углеводов практически не изменялось, что может свидетельствовать в пользу стабильности процессов метаболизма. Слабое возрастание содержания пролина на фоне действовавших сильных осмотических стрессов, по нашему мнению, являлось проявлением обычных динамических колебаний его уровня. Таким образом, реакции каллюсной культуры Л-390-Т1 могут свидетельствовать в пользу поддержания нормальных физиологических показателей на момент исследования, т.е. повышенного уровня устойчивости клеток.

Исходя из полученных данных, трудно оценить роль в реализации этих взаимоотношений дцРНК-супрессора ПДГ, который, несомненно, определяет общую комплексную устойчивость культуры.

Оценивая сопряженность действия совместимых осмотически активных веществ — пролина и сахарозы — у каллюсных культур кукурузы, культивируемых в условиях осмотических стрессов, можно сделать вывод, что каллюсная культура Л-390-Т1 клеток отличается повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам. Изменения содержания пролина и сахарозы в клетках Л-390-Т1 на 10-е сутки стресса направлены на поддержание нормального функционирования и указывают на отсутствие стрессового состояния. Содержание пролина и сахарозы в каллусе исходной линии изменяется на 10-е сутки стресса; вид (приоритет) осмотически активного вещества зависит от типа стрессора.

1. Андриященко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourne. // Изв. АН Молд.ССР. — 1981. — № 4. — С. 55—60.

2. Сакало В.Д., Ларченко К.А., Курчій В.М. Синтез і метаболізм сахарози в листках просеків кукурудзи за умов водного дефіциту // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 4. — С. 305—313.
3. Azarpanah A., Alizadeh O., Dehghanzadeh H. Investigation of proline and carbohydrates accumulation in *Zea mays* L. under water stress condition // ELBA Bioflux. — 2013. — **5**, N 1. — P. 47—54.
4. Boscaiu M., Esperanza M., Fola O. et al. Osmolyte accumulation in xerophytes as a response to environmental stress // Bul. Univ. Agr. Sci and Vet Med. Cluj-Napoca Hort. — 2009. — P. 96—102.
5. Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize // Crop. Sci. — 1975. — **15**. — P. 417—421.
6. Hanson J., Hanssen M., Wiese A. et al. 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. — **53**. — P. 935—949.
7. Hasegawa P.M., Bressan P.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // Annu. Rev. Plant Physiol. — 2000. — **51**. — P. 463—499.
8. Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase an enzyme involved in proline metabolism, up regulated by proline but down regulated by dehydration in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 1996. — **8**. — P. 1323—1335.
9. Rosa M., Prado C., Podazza G. et al. Soluble sugars — metabolism, sensing and abiotic stresses. A complex network in the life plants // Plant Signal. Behav. — 2009. — **4**, N 5. — P. 388—393.
10. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K. et al. A novel subgroup of bZIP11 proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. — 2004. — **45**. — P. 309—317.
11. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2010. — **15**. — P. 89—97.
12. Wang L., Zhang L., Chen G., Li X. Физиологические реакции каллюса батата на засуху и солевой стресс // Shengtaixue zazhi = Ch. J. Ecol. Bot. — 2005. — **25**. — P. 1508—1514.

Получено 18.12.2015

ВМІСТ ПРОЛІНУ ТА ЦУКРОЗИ В КАЛЮСНИХ КУЛЬТУРАХ КУКУРУДЗИ ЗА МОДЕЛЬОВАНИХ ОСМОТИЧНИХ СТРЕСІВ

Л.Є. Сергєєва, В.М. Курчій, О.Ю. Матвєєва, О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Досліджували вміст вільного проліну, цукрози та співвідношення моноцукри/цукроза в клітинах калюсних культур кукурудзи. Калюс отримано з Т1 рослин кукурудзи лінії Л-390, трансформованої in planta із застосуванням штаму LBA4404, що несе плазмиду pBi2E із дволанцюговим (дл)РНК-супресором гена проліндегідрогенази (Л-390-Т1), та рослин інбредної лінії Л-390 (контроль). Калюсні культури впродовж 10 діб піддавали впливу осмотичних стресів (2 %-й розчин солей морської води, 0,5 М розчин маніту). В нормі вміст проліну в усіх варіантах був невисоким, а вміст сахарози у варіанті Л-390-Т1 перевищував контроль у 7,5 раза. На 10-ту добу культивування за стресових умов починали виявлятися відмінності у стійкості між варіантами. За дії маніту в контролі рівень проліну не змінювався, а вміст сахарози зростав на порядок відносно нормальних показників. За наявності солей морської води співвідношення моноцукри/цукроза збільшувалось незначно, тоді як акумуляція проліну перевищувала показник норми у 2,8 раза. У Л-390-Т1 за осмотичного стресу будь-якого типу рівень вільного проліну зростав незначно, а співвідношення вуглеводів було тотожним. На 10-ту добу дії осмотичного стресу в нормальних клітинах реалізувались різні захисні реакції залежно від типу стресу; трансформована калюсна культура підтримувала нормальне функціонування.

PROLINE AND SUCROSE CONTENTS IN CORN CALLI CULTURES UNDER SIMULATING OSMOTIC STRESSES

L.E. Sergeeva, V.M. Kurchii, A.Yu. Matveeva, E.N. Tishchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The free proline and sucrose contents as well as monosugars/sucrose ratio were estimated in corn calli cultures. Calli were initiated from T1 corn plants, obtained via in planta *Agrobacterium*-mediated transformation with LBA4404 strain harboring pBi2E with double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene (L-390-T1) and from inbred line L-390 plants (control). Calli cultures were examined under osmotic stresses (2 % sea water salts, 0,5 M mannitol) during 10 days. Under normal conditions free proline contents in cells of both variants were low but the sucrose level in L-390-T1 cells was 7,5 over than control data. After 10 days of stress pressure the differences among variants were marked. In control variants, cultivated under mannitol influence, the free proline level remained constant but the sucrose content increased in many times. Under salinity monosugars/sucrose ratio increased slightly while proline accumulation grew in 2,8 times over normal data. Normal cells developed various types of stress-dependent protection reactions. In L-390-T1 cells under any stress pressure the free proline level raised slightly, the carbohydrate ratio was identical. The transformed cell culture maintained normal function.

Key words: *Zea mays* L., corn, calli culture, genetic transformation, dsRNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene, salinity, water deficit, proline, sucrose, tolerance.