

## ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН СОНЯШНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Толерантність культурних рослин до водного дефіциту та засолення – складні ознаки, кожна із яких визначається координованою експресією мережі генів. На сучасному етапі генетичної інженерії розглядаються можливості використання конкретних регуляторних та структурних генів, надекспресія яких здатна призводити до підвищення рівня стійкості трансгенних рослин до цих несприятливих факторів довкілля [1–5]. Перспективність використання різноманітних генів встановлюється під час аналізу трансгенних рослин та їх насіннєвого покоління за генетичними та фізіолого-біохімічними показниками. Значна увага, зокрема, приділяється генам, пов'язаним із синтезом та катаболізмом вільного L-проліну (*Pro*), який розглядається як фактор, що може брати участь у складних інтегральних процесах адаптації/стійкості рослин до абіотичних стресів, диференціації клітин та їх запрограмованої загибелі [6–8]. Серед них представляє інтерес ген проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаний із катаболізмом L-проліну. Цей ген може мати практичне значення для генетичної інженерії, оскільки часткове інгібування його експресії здатне призводити до підвищення вмісту *Pro* і як результат – рівня стійкості рослин до ряду абіотичних чинників. У той же час дані з цього питання обмежені та не завжди однозначні [9, 10]. Водночас вважається, що ген *ProDH* задіяний у генетичних аспектах регуляції, які здійснюються за нормальних умов культивування, в процесах відновлення клітин після стресу та їх росту і розвитку [7, 11, 12]. Щодо використання гена *ProDH* в молекулярних біотехнологіях для підвищення рівня стійкості культурних рослин, то такі дослідження небагаточисельні, а результати не завжди однозначні. Так, із використанням антисенсового супресора гена *AtProDH* показано, що трансгенні рослини арабідопсису з підвищеним рівнем вільного проліну були толерантними до засолення та низьких температур [13]. У трансгенних лініях арабідопсису, що містили ген *AtProDH* в сенсо-

вій та антисенсовій орієнтації, відбувалося зменшення рівня проліну на 50 % та його підвищення на 25 %, відповідно. У той же час трансгенні рослини при високому рівні вільного проліну не були осмотолерантними [14].

Тому очевидно, що для практичного застосування цільових генів, пов'язаних із частковою супресією *ProDH* при трансгенезі культурних рослин, потрібне ретельне дослідження генетичних та фізіолого-біохімічних процесів. Метою роботи був аналіз експресії ендогенних генів проліндегідрогенази соняшника на рівні активності ферменту, визначення вмісту вільного проліну та рівня стійкості до стресових факторів рослин, у геном яких інтегровані елементи векторної конструкції, що здатні призводити до часткової супресії гена проліндегідрогенази.

### Матеріали і методи

Генетичну трансформацію інбредної лінії соняшника VK-121 (селекції Інституту олійних культур НААН України, Запорізька область) здійснювали розробленим нами способом *in planta* у процесі запилення. Інокуляцію проводили суспензією клітин агробактерії (оптична щільність 0,2–1,0 О.О.), використовуючи частково модифіковане нами середовище (МСМТ) із додаванням 0,01 % (за об'ємом) Silwet L-77 згідно з рекомендаціями [15].

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію здійснювали з використанням штаму LBA4404, що містить плазмиду pVi2E з дволанцюговим (дл)РНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису (*ProDH*) та селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) *E. coli* (рис. 1), люб'язно наданий д.б.н Кочетовим В.О. (Інститут цитології та генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

Молекулярно-генетичний аналіз проводили ПЛР-методом із використанням праймерів до фрагментів екзону, інтрону гена проліндегідрогенази арабідопсису, селективного гена неоміцин-



**Рис. 1.** Блок-схема Т-ДНК області з двохланцюговим РНК-супресором (pBi2E). pNOS – промотор гена нопалінсинтази; p35S – промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); PDH-ex1 – фрагмент першого екзону гена проліндегідрогенази (*ProDH*) арабідопсису; int – фрагмент першого інтрону *ProDH*, *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази.

фосфотрансферази, *virC* штаму *LBA4404* та гена запасного білка соняшника (*heliantin* – GenBank M28832) на термоциклері Mastercycler gradient (Eppendorf). ДНК виділяли із сегментів листових пластинок соняшника за частково модифікованою методикою Деллапорта [16] або з використанням комплекту реагентів << ДНК-сорб – С>> <<Amplisens>>, Росія. Електрофорез ДНК проводили згідно з рекомендаціями [17].

Відбір стрес-стійких трансгенних варіантів здійснювали за умов летального зневоднення (0,4 М маніту – *in vitro*; 0,8 М маніту – *in planta*) та сульфатно-хлоридного засолення (2,0 % солей морської води – *in vitro*; 2,5 %, – *in planta*). Вміст вільного Lпроліну визначали за модифікованою методикою Чинарда [18], а активність фермента проліндегідрогенази – за методом Маттіоні [19]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [20].

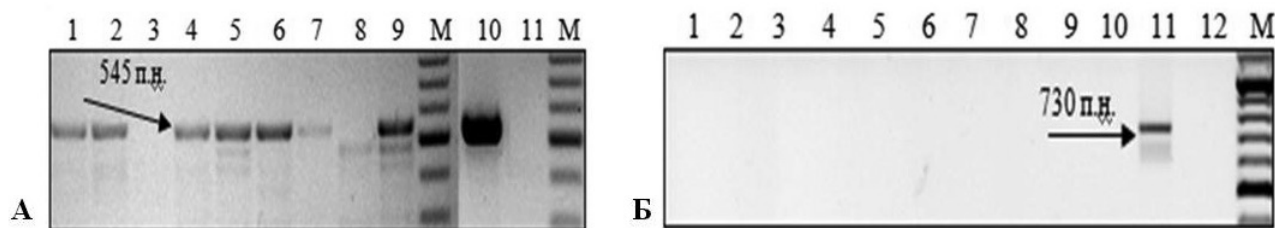
### Результати та обговорення

У зв'язку з проблемами, пов'язаними з передчасним цвітінням та укоріненням як трансгенних, так і нетрансгенних пагонів соняшника в системі *in vitro*, вперше розроблено спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації інбредних ліній соняшника *in planta*. Суть його полягає у нанесенні суспензії клітин агробактерії на суцвіття з подальшим запиленням пилком тієї

ж рослини. При інокуляції використовували модифіковане нами середовище, доповнене поверхнево-активною речовиною Silwet L-77. На формування сім'янок не впливали різні комбінації середовищ інокуляції з/без ацетосирінгону, сахарози, Silwet L-77.

Оскільки раніше нами показано, що в процесі генетичної трансформації може здійснюватися інтеграція неповної копії Т-ДНК, а саме відсутність селективного гена [21], селекцію трансгенних рослин проводили в умовах летального зневоднення. Такий підхід дозволяє дати відповідь на питання про доцільність часткової супресії ендегенних генів проліндегідрогенази для підвищення осмотолерантності рослин та відразу відбирати варіанти, стійкі до водного дефіциту. При пророщуванні насінневого покоління трансгенних рослин соняшника в умовах летального зневоднення (0,8 М маніту) життєздатними залишалися тільки рослини, молекулярно-генетичний аналіз яких показав наявність трансгену (рис. 2, а). При цьому аналіз за геном *virC* штаму *LBA4404* показав відсутність агробактеріальних домішок у трансгенних рослинах (рис. 2, б).

Використовуючи для генетичної трансформації соняшника векторну конструкцію з длРНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису, очікували, що часткова супресія ендегенних генів проліндегідрогенази трансфор-



**Рис. 2.** Електрофореграма продуктів ампліфікації: (а) – ДНК рослин соняшника лінії VK-121 (1–9), трансформованої *in planta* із застосуванням праймерів до першого екзону гена *ProDH1* арабідопсису; 10 – позитивний контроль – ДНК обеззброєного штаму *LBA4404*; 11 – негативний контроль (без ДНК); (б) – ДНК рослин соняшника лінії VK-121 трансформованої *in planta* із використанням праймерів до гена *virC* (1–10); 11 – позитивний контроль; 12 – негативний контроль. М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

мованих рослин буде відбуватися шляхом по-транскрипційного сайленсінгу РНК за рахунок утворення коротких інтерферуючих siРНК, у результаті чого зниження активності проліндегідрогенази призведе до підвищення рівня вільного L-проліну та осмотолерантності рослин.

При цьому об'єктивним критерієм ефективності часткової супресії гена проліндегідрогенази шляхом посттранскрипційного сайленсінгу є динамічні зміни вмісту вільного L-проліну в умовах норма → стрес → норма. У трансгенних рослинах із длРНК-супресором гена *ProDH* спостерігалось значне підвищення рівня вільного проліну при стресі та його зниження в умовах відновлення (рис. 3).

Тенденція до збільшення рівня вільного проліну при стресі і його зниження в умовах регідратації була характерна і для кукурудзи [22]. Вміст амінокислоти в трансгенних рослинах за нормальних умов культивування достовірно перевищував його рівень в рослинах контролю, тоді, як за жорстких стресових умов вміст проліну збільшувався в ~15–20 разів порівняно з нормальними умовами. При регідратації (перенесенні в нормальні умови) вміст проліну різко знижувався.

Отримані дані можуть свідчити про те, що підвищений рівень проліну у трансгенних рослин може сприяти подоланню негативного впливу водного дефіциту, оскільки контрольні рослини в умовах наджорсткого стресу не проростали зовсім, а при пророщуванні в нормальних умовах та подальшому перенесенні в стресові (0,8 М маніту) також гинули.

Оскільки за використання для трансформації векторної конструкції з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази очікувалося, що саме часткова супресія ендогенних генів проліндегідрогенази трансформованих рослин призведе до підвищення рівня вільного L-проліну та осмотолерантності рослин, доцільним було дослідити зміни експресії гена *ProDH* на

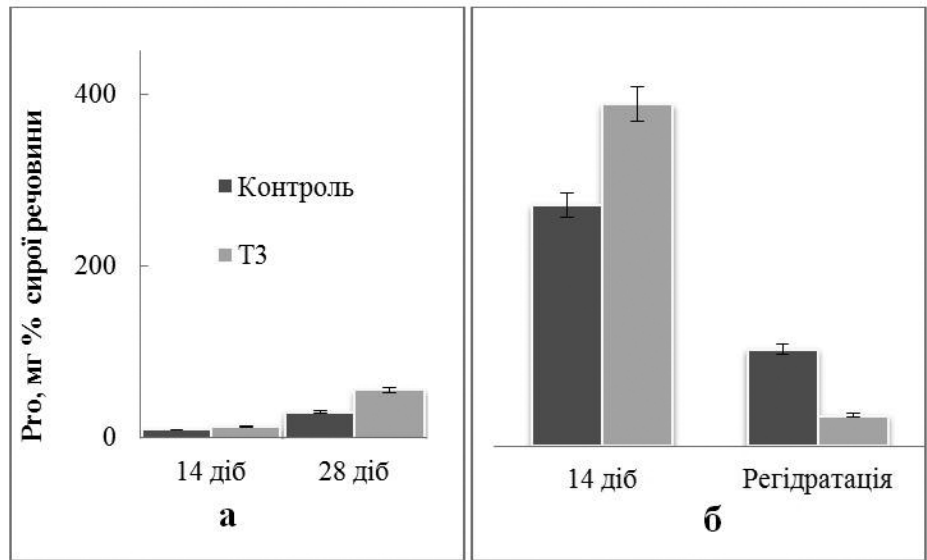


Рис. 3. Рівень вільного L-проліну в листках трансформантів інбредної лінії соняшника VK-121 за умов норма → стрес → норма: **а** – нормальні умови культивування; **б** – стрес (14 дiб водного дефіциту) та відновлення (регiдратацiя протягом 3 годин)

рівні активності ферменту. В сучасній біохімічній практиці, встановлюючи залежність ферментів від певних факторів, оцінюється не кількість ферменту, а його активність, яка передбачає накопичення продукту або зменшення субстрату за одиницю часу. Активність проліндегідрогенази оцінювали, вимірюючи збільшення концентрації НАДН за одиницю часу при окисленні проліну.

Встановлено, що часткова супресія гена *ProDH* призводить до зниження активності ферменту. Так, у трансгенних рослинах соняшника активність ПДГ була в середньому нижчою майже в 6 разів, ніж у контрольних варіантах (рис. 4).

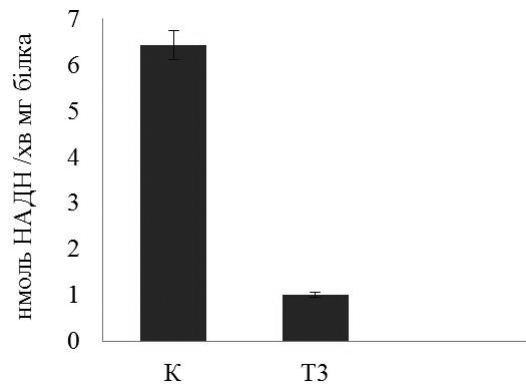


Рис. 4. Активність фермента проліндегідрогенази в Т3-поколінні трансгенних рослин інбредної лінії соняшника VK-121. К – контроль (дикий тип); Т3 – трансгенні рослини

## Висновки

Таким чином, трансгенні рослини соняшника з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази характеризуються зниженою

активністю проліндегідрогенази, підвищеним рівнем вільного проліну та стійкістю до водного дефіциту.

## ЛІТЕРАТУРА

- Castiglioni P., Warner D., Bensen R. J. et al. Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions // *Plant Physiology*. – 2008. – 147. – P. 446–455.
- Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – 1819. – P. 86–96.
- Fu J., Zhang D.-F., Liu Y.-H. et al. Isolation and Characterization of Maize PMP3 Genes Involved in Salt Stress Tolerance // *PLoS ONE*. – 2012. – 7, N 2. – P. 1–16.
- Wang M., Zhang B., Wang Q. Cotton transformation via pollen tube pathway // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – 958. – P. 71–77.
- Nguyen T.X., Sticklen M. Barley HVA1 Gene Confers Drought and Salt Tolerance in Transgenic Maize (*Zea mays* L.) // *Adv Crop Sci Tech*. – 2013. – 1:105. Doi: 10.4172/acst.1000105
- Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиология растений*. – 1999. – 46. – С. 321–336.
- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in Plant Science*. – 2009. – 15, N 2. – P. 89–97.
- Pospisilova J., Haisel D., Vankova R. Responses of Transgenic Tobacco Plants with Increased Proline Content to Drought and/or Heat Stress // *AJPS*. – 2011. – 2, N 3. – P. 318–324.
- 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 Physiology*. – 2002. – 128. – P. 73–83.
- Tateishi Y., Nakagama T., Esaka M. Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique // *Physiologia Plantarum*. – 2005. – 125. – P. 224–234.
- Rastagi S., Rizvi S.M.H., Singh R.P., Dwivedi A.N. *In vitro* regeneration of *Zeucaena eucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis // *Biol. Plant*. – 2008. – 52, N 4. – P. 743–748.
- Сергеева Л.Е., Комисаренко А.Г., Бронникова Л.И., Михальская С.И., Тищенко Е.Н. Содержание свободного пролина в тканях подсолнечника при реализации морфогенетического потенциала *in vitro* // *Біотехнологія*. – 2013. – 6, N 1. – С. 113–118.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y. et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Letters*. – 1999. – 461, N 3. – P. 205–210.
- 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, N 1. – P. 73–83.
- Bent A.F. *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species // *Plant Physiology*. – 2000. – 124, N 4. – P. 1540–1547.
- Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // *Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Перевод с англ.* – М.: Мир, 1991. – С. 248–252.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
- Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourm // *Известия Академии Наук Молдавской ССР*. – 1981. – N 4 – С. 55–60.
- Mattioni C., Lacerenza N.G., Troccoli A.D. et al. Water and sah stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings // *Physiol Plant*. – 1997. – 101. – P. 787–792.
- Доспехов Б.А. Методы полевой статистики. – М.: Агрехимия, 1985. – 351 с.
- 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 *rVi2E* с двуцепочечным РНК-супресором гена пролиндегідрогенази // *Цитология и генетика*. – 2014. – 48, N 4. – С. 19–30.
- 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-супресором гена пролиндегідрогенази // *Физиология растений и генетика*. – 2014. – 46, N 6. – С. 482–489.

**KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M, TISHCHENKO O.M.**

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

**THE CHARACTERIZATION TRANSGENIC SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)  
PLANTS WITH SUPPRESSOR OF PROLINE DEHYDROGENASE GENE**

**Aim.** The obtaining of osmotolerant form of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by siRNA-technology. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation using LBA4404 harboring pBi2E with double-stranded RNA-suppressor, produced based on the *ProDHI* gene of arabidopsis. Gene expression of proline dehydrogenase at level of activity of this ferment. **Results.** The transgenic sunflower plants with dsRNA suppressor proline dehydrogenase gene and their seed generation were obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*. Transgenic osmotolerant plants had lower activity (6 times less) of proline dehydrogenase as well as increased level of free proline.

**Keywords:** *Helianthus annuus* L., genetic transformation, dsRNA suppressor proline dehydrogenase gene, osmotic stress, proline, proline dehydrogenase, activity of proline dehydrogenase.