

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СОНЯШНИКА ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

Важливий напрямок метаболічної інженерії пов'язаний із дослідженням ролі проліну в процесах реалізації морфогенетичного потенціалу і варіабельності його вмісту під впливом обеззброєних штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Оскільки морфогенетичний потенціал клітини є динамічною характеристикою, логічно передбачити, що його зміни поєднані із змінами загального метаболізму. Вочевидь найбільший ефект буде відображатись у найбільш варіабельних участках біохімічного синтезу.

Серед ендогенних амінокислот, які постійно присутні в рослинах, особливий інтерес привертає пролін (*Pro*). Набуває актуальності уява про пролін як сигнальну/регуляторну молекулу в процесах росту, диференціювання клітин та їх запрограмованої загибелі, а також про роль проліну в реалізації морфогенетичного потенціалу при культивуванні *in vitro* [1–4].

Встановлено, що система *in vitro* здійснює багатофакторний вплив на культивовані тканини, корінним чином змінюючи їх анатомічну будову, метаболізм, гормональний статус [5].

При культивуванні *in vitro*, використання екзогенного проліну може підвищувати частоту регенерації пагонів ряду культур, існують дані про підвищення вмісту ендогенного *Pro* в ході соматичного ембріогенезу [6].

Раніше ми відзначали, що динамічні зміни вмісту ендогенного проліну можуть бути пов'язані з процесами органогенезу рослин *in vitro* [7]. Оскільки, показано, що *Agrobacterium tumefaciens* може викликати зміни в метаболізмі ряду амінокислот [8], постало питання порівняльного вивчення вмісту проліну в експлантатах, різних за здатністю до індукції пагоноутворення, і регенерантах після інфікування *Agrobacterium tumefaciens*.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був соняшник (*Helianthus annuus* L.) сорту Прометей (Інституту олійних культур НАН України, Запорізької обл.). Стерильні сім'янки пророщували на агаризованому безгор-

мональному середовищі Мурасіге-Скуга. Індукцію пагоноутворення здійснювали на регенераційному середовищі Мурасіге-Скуга [9]. Для визначення вільного проліну відбирали тканини різного терміну культивування, які відрізнялися здатністю до реалізації морфогенетичного потенціалу (рис. 1).

Рослинний матеріал культивували при температурі 25–26 °С, 16-годинному фотоперіоді та освітленні 3–4 клк. Проби для аналізу відбирали та фіксували в один і той же час доби. Рівень вільного *Pro* вимірювали в кожному окремому експлантаті та відповідному регенеранті (якщо морфогенез відбувався), проби відбирали не менш ніж у трьохкратній аналітичній повторності.[10].

Agrobacterium-опосередковану трансформацію здійснювали з використанням штаму LBA4404, який містив бінарний вектор рBi2E із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, отриманим на основі гена арабідопсису ProDH1, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptIII*) *E. coli* [11]. Векторна конструкція люб'язно надана к.б.н. Кочетовим А.В. (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ, Росія). Для порівняльного аналізу обирали регенеранти одного і того ж віку.

Результати та обговорення

Адекватні швидкі реакції з боку рослинних тканин у відповідь на умови культивування *in vitro* та їх зміни проявляються перед усім у найбільш чутливих ділянках. Такими є області проліферації, ділянки з додатковими пораненнями, сегменти з активним метаболізмом та зміненним гормональним статусом. Внаслідок цього, як було вказано вище, інформативною характеристикою даних областей може бути підвищений рівень вільного проліну. Вміст вільного *Pro* вимірювали у зразках тканин соняшника, наведених на рисунку 1.

Як видно із даних, представлених на рис. 2 (№ 1–3), із збільшенням тривалості культивування відбувалось підвищення вмісту вільного проліну в сім'ядолях та в експлантаті, потенційно здатному до індукції паго-

ноутворення. Однак, у той же час вміст проліну у тканинах достовірно відрізнявся. Найвищий рівень амінокислоти фіксували у сегменті проростка, який містив частину сім'ядолі із гіпокотилем (№ 3), що могло бути відображенням існування градієнта концентрації амінокислоти.

На 4–5 добу проростання рівень *Pro* суттєво підвищувався, після чого тримався на достатньо високому рівні. При перенесенні потенційно здатних до морфогенезу експлантатів соняшника на середовище для регенерації, кількість *Pro* в них майже чотирьохразово знижувалась. Вже на 6 добу культивування спостерігались суттєві відмінності за рівнем вільного проліну між

тканинами, у яких індукувалось пагоноутворення та тканинами, де воно було відсутнє (рис. 2, № 4 та № 5, відповідно). В експлантаті, де відбувалась регенерація пагона, акумулювалась приблизно в 2 рази більша кількість *Pro*.

У сформованих 6-добових пагонах (рис. 2, № 6) вміст проліну суттєво перевищував рівень амінокислоти, який вимірювали в експлантатах, з яких ініціювалась регенерація. Більш того, в експлантатах, від яких були відокремлені пагони, рівень цієї амінокислоти достовірно не відрізнявся від показників нерегенеруючих тканин (№ 7, № 8). У подальшому в таких культивованих експлантатах, кількість проліну залишалась стабільно низькою.

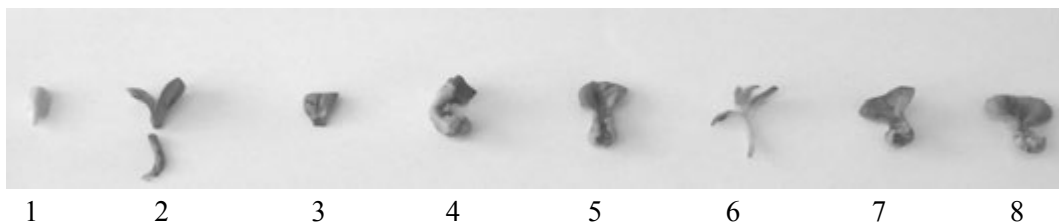


Рис. 1. Тканини соняшника, в яких вимірювали вміст вільного проліну

1. Сім'янка через 24 години культивування пророщування. Перед проведенням аналізу сім'янку розділяли на 2 сім'ядолі, які аналізували окремо.

2. Сім'ядолі проростків через 4 доби пророщування. Перед проведенням аналізу відокремлювали корінець та апікальну бруньку. Кожну сім'ядолу аналізували окремо.

3. Первинний експлантат, потенційно здатний до індукції пагоноутворення: ~ 2/3 сім'ядолі з розщепленою верхньою частиною гіпокотила, розміром 1–2 мм, сформований із 4-х добових проростків.

4. Первинний експлантат на початковій стадії регенерації; 6 діб на середовищі для регенерації.

5. Первинний експлантат із відсутністю регенерації; 6 діб на середовищі для регенерації.

6. Регенерант після відокремлення від експлантату; культивування протягом 16-ти діб на середовищі для регенерації.

7. Експлантат після відокремлення від регенеранта; 16 діб на середовищі для регенерації.

8. Експлантат через 10 діб після відокремлення регенеранта; 26 діб на середовищі для регенерації.

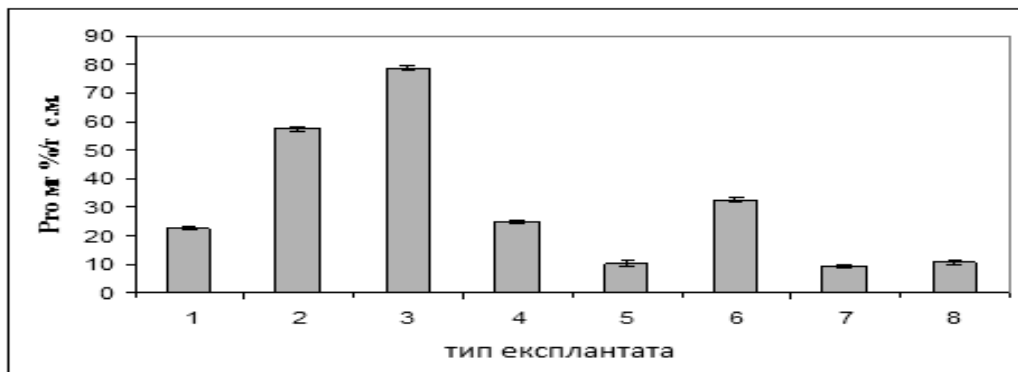


Рис. 2. Вміст вільного проліну в тканинах соняшника із різною здатністю до реалізації морфогенетичного потенціалу

Порівняння вмісту вільного проліну в культивованих тканинах соняшника виявили два показових моменти. По-перше, відбувалось активне зниження вмісту амінокислоти в експлантатах при культивуванні *in vitro* на регенераційному середовищі. По-друге, спостерігалась спряженість подій: пагоноутворення / рівень *Pro*, що свідчить на користь можливої участі проліну в загальній системі регуляції процесу органогенезу соняшника *in vitro*.

Феномен динамічного варіювання вмісту вільного проліну загальновідомий. Причини цього явища різні. У конкретному випадку зниження вмісту проліну може виникати із ряду причин. Із збільшенням віку культури швидкість процесів синтезу уповільнюється (в системі *in vitro* це явище посилюється, внаслідок вичерпання ресурсів). При цьому старіють швидше неморфогенні тканини. На це вказують і інші автори [3, 5]. Не виключають також і вплив середовища культивування, зокрема регуляторів росту НУК і БАП, які були присутні в регенераційному середовищі.

Встановлено, що при культивуванні *H. annuus in vitro* максимальний рівень накопичення вільного *Pro* спостерігався тільки в експлантатах, здатних до індукції пагоноутворення. Це свідчить про те, що вільний пролін може бути одним із факторів, який бере участь у процесах росту та диференціювання клітин соняшника *in vitro*. Більш того, показник вмісту вільного проліну може бути застосований для первинного скринінгу експлантатів соняшника.

Оскільки рівень вільного проліну є динамічним показником, проводили порівняльний аналіз його вмісту в регенерантах

соняшника одного віку, отриманих від експлантів, які піддавалися та не піддавалися *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації.

Оскільки, *A. tumefaciens* може викликати зміни метаболізму ряду амінокислот [8], досліджували вплив конкретного штаму на синтез вільного проліну. Показано, що інокуляція обеззброєним штамом *LBA4404* не впливала на метаболізм проліну в процесі індукції пагоноутворення (рис. 3). Так, у регенерантів, у геном яких не був інтегрований дЛРНК-супресор гена проліндегідрогенази, рівень *Pro* за нормальних умов був суттєво нижчий, ніж у трансформантів, які містили даний ген. Це може бути результатом часткової супресії гена проліндегідрогенази (рис. 4). Аналогічними властивостями характеризувалися трансформанти тютюну, які несли таку ж конструкцію [12].

Підвищений рівень проліну в трансгенних регенерантах соняшника (відносно рослин контролю) зберігався протягом культивування *in vitro* (14- та 28 доба), що свідчить на користь зменшення рівня транскрипції ендогенних генів проліндегідрогенази.

Висновки

1. Рівень вільного проліну може бути маркером тотипотентності тканин при культивуванні соняшника *in vitro*.

2. Інокуляція суспензією клітин агробактерії (штам *LBA4404*) не впливає на вміст вільного проліну в регенерантах та експлантатах, в яких здійснюється індукція пагоноутворення.

3. Трансформанти соняшника відзначались підвищеним рівнем вільного проліну протягом пасажу.

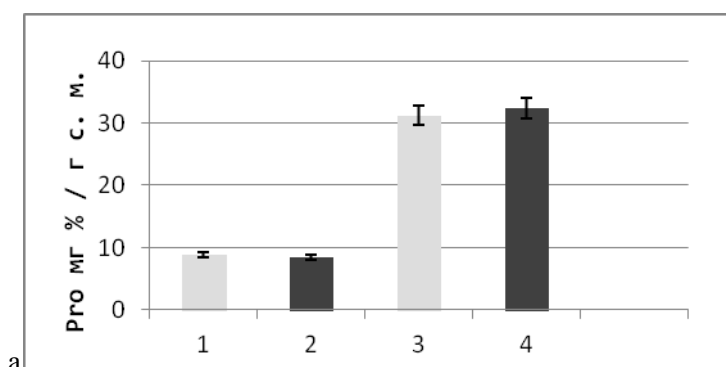


Рис. 3. Вміст вільного проліну в експлантатах (1, 2) та отриманих із них регенерантах (3, 4) соняшника.

Примітка: 1,3 – без інокуляції; 2, 4 – інокуляція штамом *LBA4404*.

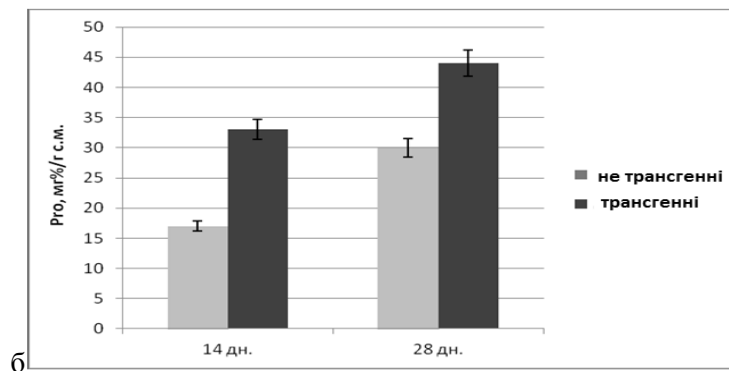


Рис. 4. Вміст вільного проліну в трансгенних та нетрансгенних рослинах-регенерантах соняшника при культивуванні *in vitro*

Література

1. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: A review // *Amino Acids*. – 2008. – 35, № 4. – P. 753–759.
2. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. Laxmi P.S., Naidu 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.
3. Maggio A., Miyazaki I.S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction // *Plant J*. – 2002. – 31, N 6. – P. 699–712.
4. Szabados L.O., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in Plant Science*. – 2009. – 15, N 2. – P. 89–97.
5. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture // *Ann. Rev. Plant Physiol*. – 1984. – 35. – P. 519–542.
6. Rastagi S., Rizvi S.M.H., Singh R.P., Dwivedi A.N. *In vitro* regeneration of *Zeucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis // *Biologia Plantarum*. – 2008. – 52, N 4. – P. 743–748.
7. Сергеева Л.Є., Михальська С.І., Комисаренко А.Г., Броннікова Л.І., Тищенко О.М. Спосіб оцінки морфогенетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендogenous проліну. Патент України на корисну модель № 64611 від 2011. Бюл № 21.
8. Simoh S., Quitana N., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens* infected *Brassica rapa* // *J. Plant Physiol*. – 2009. – 166, N 10. – P. 1005–1014.
9. Михальская С.И., Комисаренко А.Г., Малина А.Э., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2009. – 41, № 3. – С. 255–261.
10. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon* Tournef. // *Изв. АН МССР*. – 1981. – № 4. – С.55–60.
11. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium* – опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // *Biotech. Acta*. – 2013. – 6, № 1. – P. 113–118.
12. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов // *Физиол. раст.* – 2012. – 59. – С. 99–107.

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., SERGEEVA L.E., 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

THE FREE PROLINE CONTENTS VIA THE MORPHOGENESIS SUNFLOWER *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION

Aim. Plant tissue totipotency – is the essential ability that is used in biotechnology. This peculiar feature responds to various changes of the total metabolism as well as fluctuations of some substances. Proline takes part in diverse functions of the plant both under normal and stress conditions. Proline has a concern in morphogenesis and genetic transformation. The levels of free proline in sunflower tissues with different

morphogenetic abilities and in tissues of transformed plant were investigated. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation with LBA 4404 strain with pBi2E suppressor proline dehydrogenase gene was created. The sunflower transformants were regenerated. The free proline contents were estimated in different tissues of normal and transformed plants. **Results.** The levels of free proline raise in tissues with high totipotency (initial explants and regenerants at the early stages of morphogenesis). The proline contents in transformed plants exceeded those parameters of controls during whole cultivation *in vitro*.

Key words: sunflower, *Agrobacterium*-mediated transformation, morphogenesis, proline.

УДК 581.132

КОСОБРЮХОВ А.А., КРЕСЛАВСКИЙ В.Д., ШИРШИКОВА Г.Н.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,

Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2, e-mail: kosobr@rambler.ru

РОЛЬ ФИТОХРОМА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА АРАБИДОПСИСА ДИКОГО ТИПА И МУТАНТА *hy2*

Система регуляторных фоторецепторов, в число которых входят фитохромы, играет важную роль в процессах роста и фотоморфогенеза растений, и их роль в этих процессах во многом изучена [1, 2], в частности действие фитохрома В (ФхВ) [3, 4]. Однако о его роли как регулятора метаболизма и, в частности, о взаимосвязи активности отдельных звеньев фотосинтетического аппарата с состоянием ФхВ и его содержанием известно мало. Ранее нами показано, что существует связь между состоянием фитохромной системы и устойчивостью фотосинтеза к действию стрессоров различной природы. Повышение содержания активной формы фитохрома В путем облучения растений после темнового периода импульсом красного света $\lambda = 660$ или 625 нм приводило к увеличению стресс-устойчивости фотосистемы 2 (ФС 2) растений шпината, салата к УФ-В а также к УФ-А радиации [5, 6]. Однако механизм стресс-защитного действия активной формы фитохрома остается мало изученными и для исследований такого рода в настоящее время используют растения с недостатком или с избытком отдельных типов фитохрома, в частности, трансгенные растения арабидопсиса, огурца, картофеля [7, 8].

В задачу данной работы входило исследование роли фитохрома В в регуляции метаболических реакций фотосинтетического аппарата при облучении растений УФ-А радиацией.

Материалы и методы

Объектами служили растения арабидопсиса дикого типа (ДТ) и мутант *hy2*.

Мутант по гену *HY2* относится к группе НУ-мутантов *Arabidopsis thaliana*, имеющих удлинённый гипокотиль. Ген *HY2* кодирует фермент фитохромобилин-синтазу (ФХБ-синтазу), ферредоксин-зависимую биливердинредуктазу. В результате мутант дефицитен по ФхВ.

Для облучения растений УФ-А использовали лампу Т8 18W BLB (Selecta) с основным диапазоном излучения в области длин волн 300–400 нм и с максимумом 365 нм. Интенсивность УФ-облучения на уровне листьев была 12 Вт м^{-2} , время облучения 2 ч. Газообмен CO_2 измеряли с помощью инфракрасного газоанализатора LCP⁺ фирмы ADC BioScientific Ltd., соединенного с листовой камерой площадью $6,25 \text{ см}^2$. Для построения углекислотных кривых с помощью микропроцессора газоанализатора устанавливали концентрацию углекислоты в воздухе от 0 до $1600 \text{ мкмоль CO}_2 \text{ моль}^{-1}$. Анализ углекислотной кривой CO_2 -газообмена проводили по модели Фаркьюхара [9] в модификации [10–12].

Результаты и обсуждение

Облучение растений арабидопсиса УФ-А в течение 2 ч. приводило к снижению скорости фотосинтеза в течение нескольких часов в последствии фактора. Вместе с тем, растения дикого типа и мутант по разному реагировали на стрессовое воздействие. Снижение скорости процесса у растений дикого типа составляло около 27 % от начальных значений (табл. 1). В большей степени влияние УФ-А проявлялось на мутанте и снижение скорости фотосинтеза составляло до 67 %.