

УДК 581.1:522:58.02

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ ЯК ПОКАЗНИК ШВИДКИХ РЕАКЦІЙ НА ДІЮ ЛЕТАЛЬНИХ ОСМОТИЧНИХ СТРЕСІВ IN VITRO

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

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru*

Досліджували зміни вмісту вільного проліну (Pro) на початкових етапах реакції кукурудзи на дію модельованого летального зневоднення та сульфатно-хлоридного засолення. Після 4-годинної дії стресорів спостерігали істотні зміни вмісту Pro в пагонах і коренях 7-добових проростків інбредної лінії Л-390 та Л-390, трансформованої in planta з використанням штаму LBA 4404, що несе pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (Л-390-Т1). Рівень Pro в пагонах і коренях проростків Л-390-Т1 переважав цей показник у рослин Л-390 за будь-яких умов культивування. За дії осмотичних стресів вміст Pro знижувався в пагонах і підвищувався в коренях рослин Л-390, тоді як у рослин Л-390-Т1 його вміст у коренях зменшувався й неістотно коливався в пагонах. Це свідчить про активування метаболізму проліну вже на початкових етапах впливу осмотичних стресів, де одним із компонентів генетичного контролю є ген проліндегідрогенази. Обговорено внесок системи транспорту Pro на початкових етапах стресу.

Ключові слова: *Zea mays* L., генетична трансформація, супресія гена проліндегідрогенази, осмотичний стрес, пролін.

Засолення та водний дефіцит, різновиди осмотичного стресу, є найчастішими чинниками довкілля, що зумовлюють широкий спектр патологічних перебудов у рослинах. Водночас у природі є генотипи з підвищеним рівнем стрес-стійкості. Для існування за умов дії осмотичних стресів у таких рослин сформувалась низка компенсаторних механізмів, серед яких провідну роль відіграє пролін. Вільний пролін часто акумулюється у значних кількостях. Встановлено його роль як регулятора внутрішньоклітинного осмотичного потенціалу, стабілізатора клітинних структур, відмічено його участь у процесах відновлення і розвитку [2, 5, 8, 12, 13].

Зміни у функціонуванні ферментних комплексів, які регулюють вміст вільного проліну, можуть певним чином спричинювати його варіювання. В зв'язку з цим привертають увагу біотехнологічні рослини з трансгенами, що впливають на синтез або катаболізм Pro. Стосовно останнього ми отримали рослини кукурудзи й соняшника з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (дл РНК-супресор гена ПДГ) та дослідили особливості акумуляції/витрачання Pro у варіантах,

які піддавали тривалій дії осмотичних стресів. Ці рослини на відміну від звичайних витримували летальні дози модельованого зневоднення й сульфатно-хлоридного засолення [3].

Однак ефективність виживаності може залежати не тільки від стабілізації процесів життєдіяльності, а й забезпечуватись насамперед швидкістю активування захисних механізмів, у тому числі пов'язаних з осмотичними речовинами. Теоретично можна очікувати, що варіантам із дл РНК-супресором гена ПДГ, які мають вищий загальний рівень вільного проліну, властиві особливості також у розподілі та використанні Pro в різних тканинах. Ймовірно, це підтримує процеси життєдіяльності в умовах стресу.

Водночас структура і властивості молекули проліну такі, що ця амінокислота сама впливає на системи власного синтезу/катаболізму/транспорту [12]. Тому ми вивчали вміст вільного проліну в пагонах і коренях проростків кукурудзи на початкових етапах дії сольового й водного стресів.

Методика

Об'єктами дослідження були 7-добові проростки кукурудзи (*Zea mays* L.) інбредної лінії Л-390, а також аналогічного віку рослини, отримані в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta (Л-390-Т1) із застосуванням штаму LBA 4404, який містив векторну конструкцію pVi2E із дволанцюговим РНК-супресором гена ПДГ (рекомбінантний штам люб'язно надав О.В. Кочетов з Інституту цитології і генетики Сибірського відділення РАН).

Відібрані зернівки пророщували на зволоженому фільтрувальному папері. Вирівняні за розміром 7-добові проростки кукурудзи переносили в умови модельованих летальних стресів (25,0 г/л морських солей або 0,8 М маніту). Обидві речовини застосовували у формі водних розчинів, тому нормальними умовами (н.у.) вважали перебування на воді. Через 4 год від початку дії стресових чинників проростки розділяли на пагін і корінь. У кожному з них вимірювали вміст вільного проліну [1]. Отримані дані оброблені статистично за критерієм Стьюдента. Повторність експерименту не менш як чотириразова.

Результати та обговорення

За нормальних умов (H₂O) вміст вільного проліну зазвичай має відтворювати стан систем його синтезу/катаболізму/транспорту (рис. 1, а). У проростках Л-390 проліну було більше в пагонах, у Л-390-Т1 — в коренях. За абсолютною величиною сумарний рівень проліну в генотипу Л-390-Т1 перевищував аналогічний показник у контрольних рослин, при цьому в коренях — у 3,8 раза. Ймовірно, це відображало часткову супресію гена ПДГ кукурудзи. Про таке явище в тютюну повідомлялось при застосуванні іншої векторної конструкції, що викликала аналогічний ефект [2].

Хоча генотипи кукурудзи тестували за дії летальних осмотичних стресів, через 4 год від початку експерименту візуальних порушень стану рослин не виявлено, але вміст вільного проліну вже починав змінюватись (див. рис. 1, б). Спостерігались як генотипні відмінності, так і відмінності між досліджуваними частинами рослин.

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА

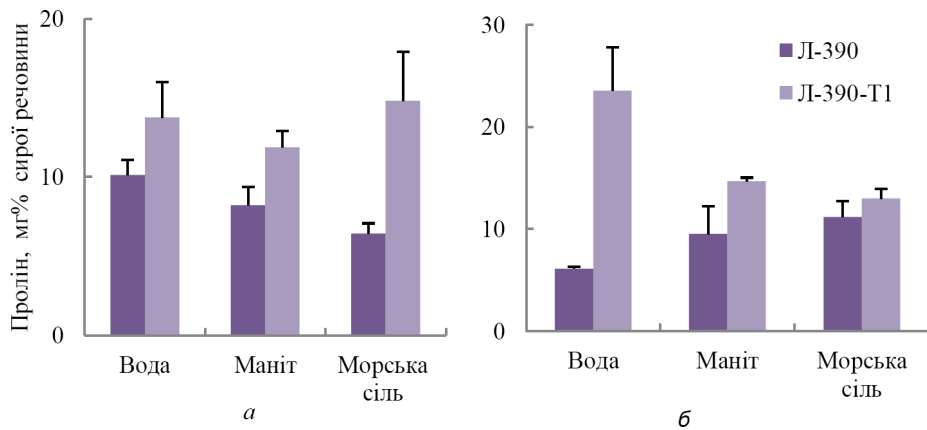


Рис. 1. Вміст вільного проліну в пагонах (а) і коренях (б) 7-добових проростків кукурудзи (маніт — 0,8 М; морська сіль — 2,5 %)

У контрольних проростках рівень проліну синхронно знижувався в пагонах і підвищувався в коренях. У рослин Л-390-Т1 вміст проліну змінювався специфічно залежно як від частини рослини, так і стресового чинника.

Оскільки осмотичні стреси створювали додаванням водних розчинів, то виміряний пролін був виключно ендогенним. Синхронні різноспрямовані зміни вмісту цієї амінокислоти в коренях і пагонах Л-390 (без істотного порушення сумарної її кількості) ймовірно виникали внаслідок перерозподілу — транспорту до тканин (коренів), що безпосередньо зазнавали дії стресового чинника. У цьому разі пролін міг слугувати протектором клітинних структур [4] і захищати апікальну меристему, що контактувала зі стресовим чинником. Водночас можна припустити, що генотип Л-390 уже почав зазнавати пригнічення, оскільки синтетичні процеси (насамперед синтез Pro) призупинялись. Продовження дії осмотичних стресів призводило до загибелі контрольних рослин.

Корені та пагони проростків кукурудзи Л-390-Т1 на початкових етапах стресу акумулювали пролін по-різному. Так, у тканинах коренів вміст проліну знижувався, а в пагонах — коливався в межах, близьких до норми. Це може свідчити, що ключовий внесок у загальний проліновий пул робили системи метаболізму (не транспорту). Очевидно, що так створювався рівень цієї амінокислоти, оптимальний для підтримання осмотичного статусу всього організму, хоча в окремих частинах рослини синтез відбувався незалежно.

Сукупний вміст проліну в рослинах Л-390-Т1 на початкових етапах дії летальних осмотичних стресів (порівняно з н.у.) дещо зменшувався. Однак, на нашу думку, цей факт не може вказувати на початок загального стресового пригнічення, оскільки рослини Л-390-Т1 в подальшому виживали, на відміну від генотипу Л-390.

Життєдіяльність стійких генотипів за стресових умов забезпечується стабільністю всіх компартментів, у тому числі клітинних мембран і клітинної стінки. Встановлено, що особливу роль у їх підтриманні відіграють особливі протеїни — збагачені проліном білки (proline rich proteins, PRPs). Більшість PRPs задіяна у формуванні структури клітин-

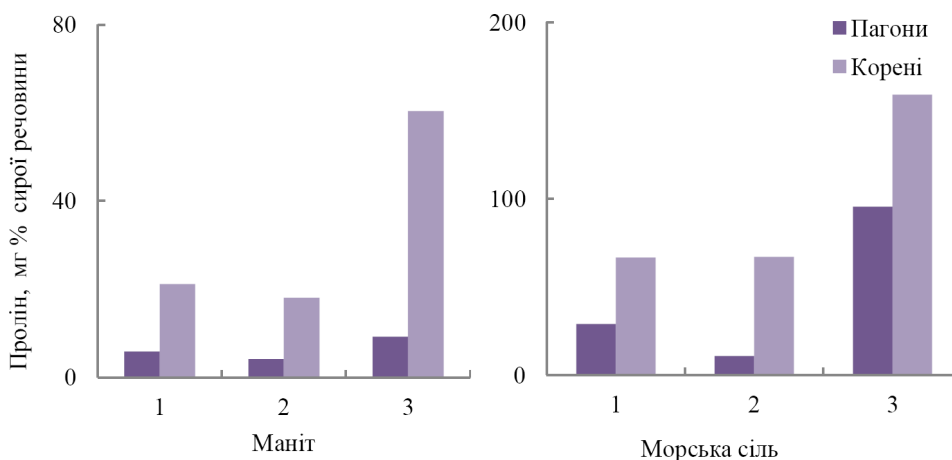


Рис. 2. Вміст вільного проліну в тканинах проростків трансгенних рослин кукурудзи (1-3) першого покоління (Л-390-Т1) на 21-шу добу дії осмотичного стресу (маніт — 0,5 М; морська сіль — 2,0 %)

ної стінки в процесі росту і розвитку [9–11]. У них залишки проліну організовані в повторювані мотиви, до яких також додається гідрокси-пролін [10]. Гідроксилювання проліну з наступним гліколізом відбувається в ендоплазматичному ретикулумі та комплексі Гольджі з наступною екскрецією в клітинну стінку. Дві PRP-субродини (екстенсини та P/H RGP) відіграють важливу роль у забезпеченні стійкості до абіотичних і біотичних стресів. Це зумовлено стресіндукованим окисненням їх, під час якого формуються між- і внутрішньомолекулярні перехресні зв'язки, які зміцнюють структуру клітинної стінки [5]. Інший різновид PRPs—8СМ-НуPRP — прикріплений до цитоплазматичної мембрани трьома трансмембранними консервативними доменами, характеризується наявністю восьми типових залишків цистеїну [6].

Ймовірно, в нашому випадку зниження загального рівня проліну в біотехнологічних рослинах Л-390-Т1 на початкових етапах осмотичного стресу спричинене його включенням у синтез PRPs, а не втратою через ушкодження. Це припущення підтверджувалось упродовж тривалого стресу. Так, на 21-шу добу дії осмотичного стресу вміст вільного проліну в дослідних Т1 рослинах зростає, особливо в коренях, навіть у випадку меншого стресового тиску (рис. 2).

Оскільки стресозалежної реакції з боку тканин проростків не виявлено, можна припустити, що рослини реагували на осмотичну складову стресу. Так підтримувалась функціональна активність усього організму. Контрольні рослини генотипу Л-390 загинули до кінця другого тижня.

Згідно з отриманими результатами, уже на початкових етапах летальні осмотичні стреси по-різному впливали на рівень розподілу вільного проліну в тканинах усіх досліджених генотипів кукурудзи. У рослин Л-390-Т1 активувались системи його різноспрямованого метаболізму, не виключено, що активування пришвидшувалось унаслідок супресії ПДГ. Пролін діяв як неспецифічний стресовий протектор, а також швидко вступав у реакції синтезу проліновмісних білків мембран. Це створювало переваги для підтримання подальшої життєдіяльності за критичних умов.

Отже, у рослин Л-390 і Л-390-Т1 на ранніх етапах осмотичного стресу за участю проліну реалізуються різні захисні фізіологічні процеси.

1. Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourm // Изв. АН МССР. — 1981. — № 4. — С. 55—60.
2. Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В. и др. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. — 2006. — 42. — С. 278—281.
3. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е. и др. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных in planta с использованием LBA 4404, несущего рВi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Изв. Самар. НЦ РАН. — 2013. — 5, № 3. — С. 1662—1666.
4. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе // Физиология растений. — 1983. — 30, № 1. — С. 768—778.
5. Battaglia M., Solorzano R.M., Hernandez M. et al. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings // Planta. — 2007. — 225. — P. 1121—1133.
6. Jose-Estaniol M., Gomis-Ruth F.X., Puigdomenech P. The eight-cysteine motif a versatile structure in plant proteins // Plant Physiol. Biochem. — 2004. — 42. — P. 355—365.
7. Kishor P.B.K., Sangam S., Amruta R. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // Curr. Sci. — 2005. — 88. — P. 424—432.
8. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation // Planta. — 2005. — 222. — P. 70—79.
9. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y. et al. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana* // Plant J. — 1999. — 18. — P. 185—193.
10. Showalter A.M., Keppler B., Lichtenberg J. et al. A bioinformatics approach to the identification, classification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins // Plant Physiol. — 2010. — 153. — P. 485—513.
11. Stein H., Honig A., Miller G. et al. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants // Plant Sci. — 2011. — 181. — P. 140—150.
12. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2010. — 15. — P. 89—97.
13. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // Planta. — 2003. — 218. — P. 1—14.

Отримано 10.09.2015

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ БЫСТРЫХ РЕАКЦИЙ НА ДЕЙСТВИЕ ЛЕТАЛЬНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ IN VITRO

Л.Е. Сергеева, С.И. Михальская, В.М. Курчий, Е.Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали содержание свободного пролина (Pro) на начальных этапах реакций кукурузы на действие моделированного летального обезвоживания и сульфатно-хлоридного засоления. После 4-часового действия стрессоров наблюдали существенные изменения содержания пролина в побегах и корнях 7-суточных проростков инбредной линии кукурузы Л-390 и Л-390, трансформированной in planta с использованием штамма LBA 4404, несущего рВi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы (Л-390-Т1). Уровень Pro в побегах и корнях проростков Л-390-Т1 превышал этот показатель у растений Л-390 при любых условиях культивирования. При действии осмотических стрессов содержание Pro снижалось в побегах и повышалось в корнях растений Л-390, тогда как у рас-

тений Л-390-T1 его содержание в корнях уменьшалось и несущественно колебалось в побегах. Это свидетельствует об активизации метаболизма пролина уже на начальных этапах воздействия осмотических стрессов, где одним из компонентов генетического контроля является ген пролиндегидрогеназы. Обсужден вклад системы транспорта Pro на начальных этапах стресса.

THE FREE PROLINE CONTENT IN CORN SEEDLINGS AS THE INDICATOR OF RAPID REACTIONS DURING LETHAL OSMOTIC STRESSES IN VITRO

L.E. Sergeeva, S.I. Mykhalska, V.M. Kurchii, E.N. Tischenko

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

The free proline fluctuations were measured in 7-day-old corn seedlings during early reactions under simulating lethal water or sulfate-chloride salt stress pressure. There were essential differences between plants of L-390 inbred line and L-390-T1 plants, obtained after *Agrobacterium*-mediated transformation in planta with LBA 4404 strain with pBi2E double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene. The proline levels in shoots and roots of L-390-T1 plants exceeded those parameters of L-390 plants under all kinds of cultivation. The proline levels of control plants reduced in shoots and rose in roots under 4-h osmotic stress pressure. At the same conditions proline levels of L-390-T1 plants decreased in roots and slightly fluctuated in shoots. Such events were the possible results of the proline metabolism activation in L-390-T1 plants during early stages of osmotic stress, where the proline dehydrogenase gene was the component part of genetic control. The contribution of proline transport system involved to total stress resistance was discussed.

Key words: *Zea mays* L., genetic transformation, proline dehydrogenase gene suppression, osmotic stress, proline.