УДК **577.21: 579.254.2: 581.143.5**

КОМІСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСЬКА С.І., КУРЧІЙ В.М., СЕРГЄЄВА Л.Є.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КУКУРУДЗИ ТА СОНЯШНИКУ З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ СТІЙКОСТІ ДО ВОДНОГО СТРЕСУ

Результати досліджень генетичної трансформації ряду видів однодольних та дводольних рослин показали, що трудомісткі та економічно затратні процедури культивування *in vitro* можна замінити на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* [1–4].

Метод *Agrobacterium* – опосередкованої трансформації *in planta* полягає у перенесенні в генеративні клітини та інтеграції в геном реципієнтних рослин векторних конструкцій з подальшим скринінгом значної кількості отриманих варіантів для виділення форм з новими бажаними характеристиками. Загалом метод передбачає використання векторних конструкцій, до складу яких входять цільовий ген (ген інтересу) і маркерний (селективний) ген. Після здійснення процедури трансформації та отримання покоління Т0 відбір індивідуальних трансформованих рослин у загальному масиві Т0 проводять в два етапи [5]. Першим етапом є селекція за маркерним геном (ознакою). Здебільшого – це гени *npt* II, *gus* тощо. На другому етапі ведуть тестування експресії цільової ознаки у варіантів, відібраних на першому етапі. Застосування конструкції із маркерними генами подовжує алгоритм відбору нових форм, з однієї сторони, та посилює негативний тиск на довкілля, з другої. Тому останнім часом починають залучати до генетичної трансформації конструкції лише з цільовим геном, а тестування здійснюють, створюючи модельні системи добору. Так, наприклад, застосовуючи конструкцію, яка сприяла акумуляції вільного проліну, трансгенні форми відбирались *in vitro* на середовищі із додаванням 200 мМ NaCl [6]. В іншому випадку при використанні конструкції, яка викликала підвищення рівня проліну в наслідок репресії ферменту катаболізму цієї амінокислоти, трансгенні форми відбирались на середовищі із додаванням 250 мМ NaCl [7]. Застосовуються інші підходи: зокрема трансгенні форми арабідопсису виділяли, обприскуючи рослини 100 мМ розчином NaCl [8].

Головним недоліком селекції без використання антибіотика безпосередньо на стресовому фоні, може бути неадекватна концентрація стресору. У випадку *Agrobacterium* – опосередкованої трансформації *in vitro,* коли отримується незначна кількість регенерантів, можливий індивідуальний аналіз і підбір селективної концентрації стресового чинника для кожного регенеранта. Однак при трансформації *in planta,* спрямованої на масове отримання покоління Т0, тільки використання жорстких умов селекції може гарантувати добір форм з бажаними характеристиками .

Метою нашої роботи було удосконалення та спрощення процедури добору трансгенних рослин з підвищеним рівнем стійкості до водного дефіциту, отриманих при *Agrobacterium* – опосередкованій трансформації *in planta.*

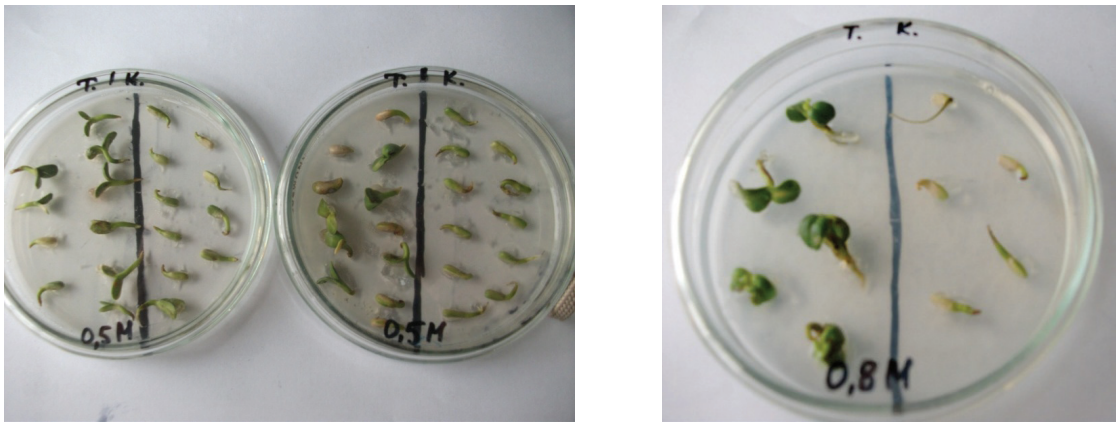
Матеріали і методи

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *planta* кукурудзи генотипу Л-370 та соняшнику – VK-121 проводили згідно методики описаної раніше [9, 10].

Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumifaciens LBA* 4404, що включав векторну конструкцію pBi2E із цільовим геном – дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази (*ProDH*) та селективним геном неоміцинфосфотрансферази (*npt*II). Конструкція люб'язно надана к.б.н. Кочетовим А.В. (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

Нові рослинні форми виділяли в умовах дії модельованого водного стресу *in vitro.* Для створення системи добору визначали селективну (летальну) концентрацію маніту, яка і для кукурудзи і для соняшнику становила 0,8 М. Маніт є неметаболізованим вуглеводом, який моделює водний дефіцит.

© КОМІСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСЬКА С.І., КУРЧІЙ В.М., СЕРГЄЄВА Л.Є.



1 етап 2 етап

Рис. 1. Визначення селективної концентрації маніту для добору трансформантів соняшнику (1 етап – 0,5 М; 2 етап – 0,8 М)

Рівень проліну у стійких до стресового чинника варіантів визначали згідно методики Чинарда [11], молекулярно-генетичний аналіз їх ДНК на наявність трансгенів перевіряли методом ПЛР, як описано нами раніше [9].

Результати та обговорення

У разі аналізу значної кількості варіантів Т0, наприклад зернівок у колосі, початку або сім'янок у кошику, головним аспектом є встановлення концентрацій стресового чинника, яка дозволить гарантовано відібрати трансгенні варіанти. Використання летальних доз стресора викликає загибель контрольних варіантів (нетрансформованих і трансформованих, в яких не експресується ген, що забезпечує стійкість).

У наших дослідженнях для трансформації кукурудзи та соняшнику використовували длРНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису, експресія якого передбачала збільшення рівня проліну і як результат підвищення рівня стрес-стійкості трансгенних рослин. У ряді досліджень представлені дані, що свідчать про позитивну кореляцію між вмістом проліну та стійкістю рослин [12]. Стосовно гена *ProDH*, то його значення в біотехнологіях по підвищенню стрес-стійкості тільки досліджується. Тому для аналізу ефективності проведеної процедури трансформації та для відбору рослин з підвищеним рівнем стійкості встановлювали летальні концентрації маніту. Для обох культур вона становила 0,8 М (рис. 1, 2).

У відібраних трансформантів впродовж культивування вимірювали вміст проліну, який за нормальних умов у тканинах різних рослин варіював у широких межах, проте за абсолютною величиною не перевищував 20,56 ± 2,04 мг % / сиру масу. За дії водного стресу вміст проліну зростав (рис. 3).

Флуктуації рівня проліну – це звичайне явище, яке може бути обумовлене фізіологічним статусом тканин, віком рослини, часом проведення

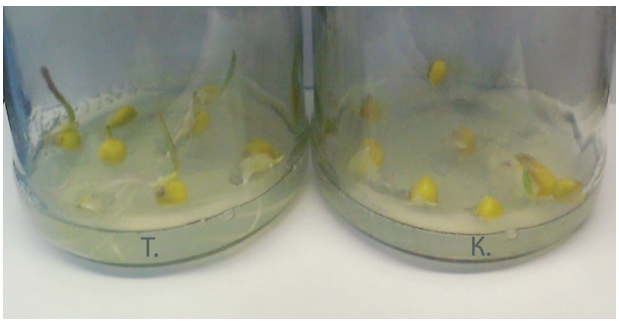


Рис. 2. Відбір трансформантів кукурудзи в умовах дії селективної (летальної) концентрації маніту

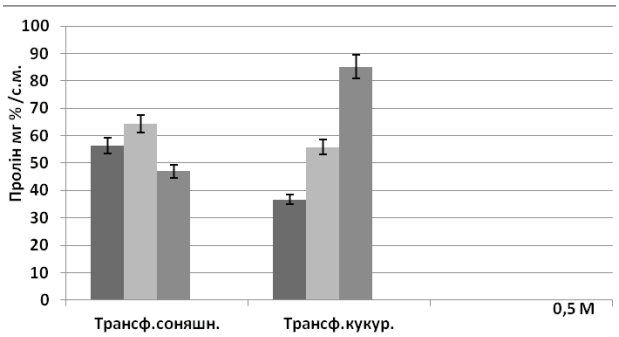


Рис. 3. Вміст вільного проліну у рослинах соняшнику і кукурудзи на 21-у добу дії модельованого водного стресу

вимірювання [12]. Як видно з рисунку 3 трансформанти кукурудзи та соняшнику мали різний (за абсолютною величиною) вміст вільного проліну, але всі вони відзначались стрес-стійкістю. На нашу думку таким чином підтримувався оптимальний рівень амінокислоти, який забезпечував життєдіяльність. Відомо, що надлишкові кількості проліну можуть перешкоджати нормальному росту і розвитку [13]. Тобто, за умов модельованого летального водного стресу відбувалось збереження нативних структур для подальшого розвитку. Відібрані рослини Т0, які відзначалися підвищеним рівнем проліну при культивуванні за умов довготривалого модельованого осмотичного стресу були перенесені в польові умови. ДНК таких рослин піддавали молекулярно-генетичному аналізу (рис. 4).

Проведений ПЛР-аналіз із використанням праймерів до першого екзону та інтрону дволанцюгового РНК-супрессора гена проліндегідрогенази 1 арабідопсиса показав наявність цільового гена у тотальній ДНК листків стійких до летальних концентрацій маніту рослин.

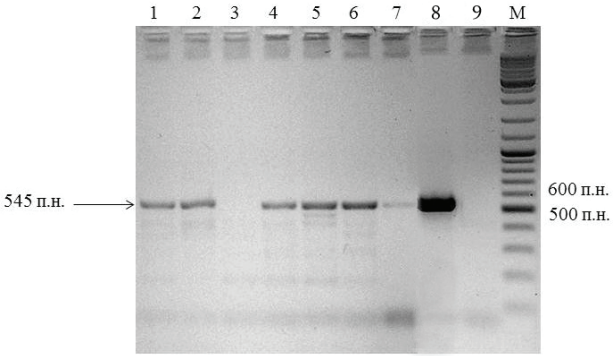


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК соняшнику: № 1, 2, 4–7 – ДНК трансформантів соняшнику, відібраних на середовищі з летальною концентрацією маніту; № 3 – ДНК не трансгенної рослини соняшнику; №8 – позитивний контроль; № 9 – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

Висновки

Таким чином, нами запропонована система масового скринінгу та відбору осмостійких трансформантів кукурудзи та соняшнику з використанням летальної для звичайних рослин дози маніту.

Відібрані варіанти характеризувались підвищеним рівнем проліну та наявністю цільового гена.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bent A.F. Arabidopsis *in Planta* Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species // Plant Physiology. – 2000. – 124. – P. 1540–1547.
2. Wang J., Sun Y., Li Y. Maize (*Zea mays*) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens* // Biotechnol Appl. Biochem. – 2007. – 46, (Pt 1). – P. 51–55.
3. Wang M., Zhang B., Wang Q. Cotton transformation via pollen tube pathway // Methods Mol. Biol. – 2013. – 958. – P. 71–77.
4. 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.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер.с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Патент № 2324737, Российская Федерация, МПК C12N015/82 «Способ получения трансгенных растений табака с повышенным содержанием пролина» / С.Е. Титов, А.В. Кочетов, Я.С. Колодяжная и др.; Заявитель и патентообладатель Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) – № 2006136956/13; заявл. 18.10.2006; опубл. 20.05.2008.
7. Патент № 2324736, Российская Федерация, МПК C12N015/82 «Способ получения трансгенных растений табака с повышенным содержанием пролина» / С.Е. Титов, С.В. Герасимова, А.В. Кочетов и др.; Заявитель и патентообладатель Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) – № 2006136954/13; заявл. 18.10.2006; опубл. 20.05.2008.
8. Патент № 2350653, Российская Федерация, МПК C12N5/14, C12N15/82, C12N15/29 «Способы повышения толерантности к абиотическому стрессу и/или биомассы у растений и получаемые таким образом растения» Карчи Х., Мейсснер Р., Ронен Д., Голан Е.; Заявитель и патентообладатель Эводжин ЛТД; - № 2005140106/13
9. 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 pBI2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Цитология и генетика. – 2014. – 48, № 4. – С. 19–30.

10. 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 пролиндегидрогеназы // Физиология растений и генетика. – 2014. – 46, № 6. – С. 482–489.
11. Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourn* // Известия Академии Наук Молдавской ССР. – 1981, № 4. – С. 55–60.
12. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010 – 15 – P. 89–97.
13. Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. Toxicity of proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase // Plant Cell Physiol. – 2003. – 44. – P. 541–548.

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M., SERGEEVA L.E.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

THE ANALYSIS OF TRANSGENIC CORN AND SUNFLOWER PLANTS LEVELS RESISTANCE TO WATER STRESS

Aims. The trustworthy selection of transgenic plants essentially makes fast the whole transformation of procedure. The optimization of mass screening of corn and sunflower plants, obtained after *Agrobacterium* – mediated transformation *in planta* was created. ***Methods.*** *Agrobacterium* – mediated transformation with pBi2E suppressor of proline dehydrogenase gene was carried out. T0 corn and sunflower plants were tested under stress pressure. Lethal water stress in vitro was simulated by the addition of mannitol. The levels of free proline were measured. ***Results.*** The transgenic forms survived under lethal water stress. The free proline levels increased in plant tissues in various manners. The free proline contents maintained the tolerance and viability of transformed plants. ***Conclusions.*** The reliable method of the detection of plants, resistant to water stress there were proposed.

Keywords: *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Agrobacterium* – mediated transformation *in planta*, proline dehydrogenase gene suppressor, water stress, resistance.