

УДК 577.21; 581.1.03; 581.143:577.175.1.05

**И. А. Дремук, Т. А. Гапеева, Т. Г. Третьякова, С. М. Савина,
Н. Г. Аверина, И. Д. Вологовский**

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск

E-mail: gapreeva@ibp.org.by

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ СИНТЕЗА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

РЕЗЮМЕ

*Показано, что трансгенные растения картофеля с экспрессируемым геном АЛК-синтетазы *Saccharomyces cerevisiae* обладают повышенной АЛК-синтезирующей способностью, а также более устойчивы к действию низкой температуры по сравнению с диким типом.*

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, 5-аминолевулиновая кислота, трансгенные растения, низкотемпературный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель – одна из основных сельскохозяйственных культур в Республике Беларусь и проблема устойчивости данной культуры к неблагоприятным факторам окружающей среды, в частности низкотемпературному стрессу, достаточно актуальна. Особый интерес представляет разработка новых технологий повышения холодоустойчивости картофеля.

В настоящее время в сельскохозяйственном производстве широко используются регуляторы роста растений. Принципиально новым подходом к созданию экологически чистых регуляторов роста растений является использование для этих целей естественных метаболитов растений, в частности экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (далее – АЛК). Известно, что низкие концентрации АЛК оказывают стимулирующий эффект на рост и урожайность ряда сельскохозяйственных культур [1] и повышают защитные свойства растений за счет снижения интенсивности окислительных процессов в клетках, повышения активности антиоксидантных ферментов, а также способности регулировать экспрессию ряда белков, в частности, стимулировать экспрессию нитратредуктазы [2].

Вопрос устойчивости растений к низкотемпературному стрессу в присутствии экзогенной АЛК в литературе освещен достаточно широко. Так, предпосевная обработка семян АЛК, а также опрыскивание данным препаратом листьев проростков перца повышала устойчивость растений к действию низких

температур, что выражалось в увеличении уровня пролина, сахаров, содержания хлорофилла и активности супероксиддисмутазы [3]. Обработка проростков огурца АЛК до начала стрессового воздействия низкой температуры (5 °С, четверо суток) приводила к возрастанию активности антиоксидантных ферментов, содержания аскорбата, пролина, растворимых сахаров [4]. Экзогенная АЛК в низких концентрациях повышала устойчивость проростков сои к действию низкотемпературного стресса (4 °С, двое суток), что выражалось в увеличении содержания хлорофилла, активности каталазы, гемоксигеназы, снижении степени повреждения мембран, уровня активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов (далее – ПОЛ) [5].

В связи с вышесказанным особый интерес представляет исследование возможностей и перспектив генно-инженерного синтеза АЛК в растительной клетке. Образование АЛК является ключевым и в то же время лимитирующим звеном в образовании тетрапирролов. В высших растениях и водорослях АЛК образуется в пластидах из глутаминовой кислоты в реакции, катализируемой тремя ферментами: глутамил-тРНК^{Глу}-синтетазой, глутамил-тРНК^{Глу}-редуктазой и глутамат-1-полуальдегидаминотрансферазой (С 5-путь). Биосинтез АЛК в нефотосинтезирующих организмах (α -подгруппе протеобактерий, дрожжах, грибах, клетках животных и др.) проходит в митохондриях из глицина и сукцинил-КоА в реакции, катализируемой АЛК-синтетазой (С 4-путь). Генно-инженерный синтез данного фермента в растениях открывает потенциальные возможности повышения накопления в растительной клетке эндогенной АЛК, обладающей свойствами регулятора роста и антистрессового агента.

Показано, что содержание эндогенной АЛК в растительной клетке можно увеличить путем включения в ядерный геном гена дрожжевой АЛК-синтетазы, содержащего последовательность лидерного пептида для транспорта фермента в хлоропласты [6]. Однако известно, что АЛК, введенная в хлоропласты генно-инженерным способом, может запускать на свету деструктивные фотодинамические реакции, связанные с повышенным содержанием протопорфирина IX [7]. Таким образом, актуальной задачей является создание систем экспрессии гена АЛК-синтетазы в клетках растений, обеспечивающих локализацию дополнительной АЛК вне хлоропластов, где она не будет участвовать в синтезе тетрапирролов-фотосенсибилизаторов, но будет проявлять защитные и стимулирующие свойства.

Ранее в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси были получены трансгенные растения картофеля с генетической конструкцией для экспрессии дрожжевой (*Saccharomyces cerevisiae*) АЛК-синтетазы в клетках растений [8]. Целью данной работы было изучение функциональной активности данной генетической конструкции на уровне ее экспрессии, влияния на АЛК-синтезирующую способность и устойчивость трансгенных растений картофеля к действию низкой температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта белорусской селекции Скарб, регенерированные из меристемной ткани, были получены из РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» (аг. Самохваловичи, Минский р-н).

В работе использовали плазмиду pALASC, предоставленную профессором Б. Гриммом (Берлинский университет им. Гумбольдта, Германия). Данная плазида, полученная на основе бинарного вектора pBINAR, содержит рекомбинантный ген для экспрессии АЛК-синтетазы *Saccharomyces cerevisiae* в клетках растений. При проведении генетической трансформации растений использовали агробактериальный штамм AGLO::pALASC [8].

Праймеры, использованные для анализа, были разработаны с помощью программы «Primer-BLAST» и синтезированы в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси» (г. Минск).

Суммарную растительную ДНК выделяли при помощи набора «NucleoSpin® Plant II» («Macherey-Nagel», Германия) согласно протоколу фирмы-производителя.

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента «TRIzol» («Sigma-Aldrich», США) по протоколу фирмы-производителя, кДНК синтезировали с использованием AMV-обратной транскриптазы («Thermo Scientific, Fermentas») и олиго-dT₁₈ праймера.

Накопление эндогенной АЛК в клетках растений определяли по методу, изложенному в работе [9]. Активность реакций ПОЛ в листьях растений оценивали по накоплению продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Проницаемость клеточных мембран определяли по выходу электролитов из клеток листьев растений в дистиллированную воду с помощью кондуктометра «HI9932» («HANNA instruments», Германия) [10].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ «SigmaPlot 10.0» («Systat Software», США) и «Excel 2007» («Microsoft», США). Оценивали среднюю квадратичную ошибку среднего арифметического.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Особенностью используемого в данной работе рекомбинантного гена АЛК-синтетазы дрожжей было отсутствие сигнальной последовательности, кодирующей пептид для транспорта фермента в хлоропласты. Следует отметить, что сигнальная последовательность митохондриального лидерного пептида также отсутствовала. Предварительно было показано, что используемая генетическая конструкция функционально активна в клетках растений табака [9]. Трансгенные растения табака обладали повышенной АЛК-синтезирующей способностью и характеризовались улучшенными ростовыми показателями.

Исследование функциональной активности трансгенной конструкции включало определение наличия мРНК-транскриптов в клетках трансформированных

растений картофеля, изучение способности последних к накоплению АЛК, а также определение устойчивости к низкотемпературному стрессу трансгенных линий (вегетативных клонов, соответствующих одному событию трансформации). Наличие мРНК-транскриптов целевого и маркерного генов было подтверждено методом кДНК-ПЦР (рис. 1). Размеры ампликонов соответствуют ожидаемым: 429 пн для праймеров ALA3 (ген АЛК-синтетазы) и 264 пн для праймеров NPT (маркерный ген неомизинфосфотрансферазы). Вегетативное потомство 3-х полученных линий (№ 1–3) было проанализировано на способность к накоплению эндогенной АЛК в листьях. Объектом исследования были 4-недельные растения, выращенные в условиях *in vitro*.

Установлено, что способность листьев трансформированных растений линий 1, 2 и 3 синтезировать АЛК на свету превысила данный показатель растений дикого типа на 75 ± 27 , 38 ± 8 и 45 ± 12 % соответственно (рис. 2), что свидетельствует об образовании дополнительной АЛК в клетках трансформированных растений за счет дрожжевой АЛК-синтетазы.

Следует отметить, что трансгенные растения представленных линий отличались от растений дикого типа и по своим морфометрическим показателям (рис. 3). В большинстве случаев они обладали большей длиной побегов и шириной листовой пластинки в сравнении с нетрансформированными растениями.

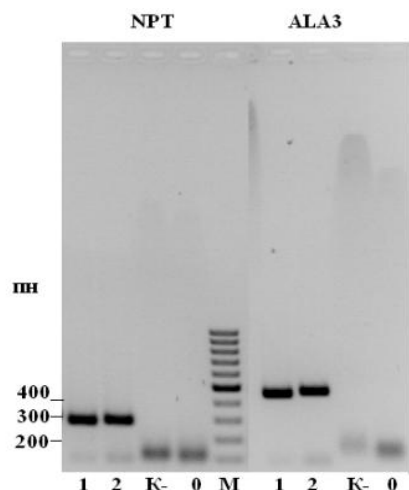


Рисунок 1 – Результаты кДНК-ПЦР с праймерами NPT и ALA3 для растений картофеля сорта Скарб *in vitro* после трансформации AGLO::pALASC: 1, 2 – варианты растений *in vitro* после трансформации; K- – отрицательный контроль (нетрансформированное растение); 0 – контроль без ДНК-матрицы; M – ДНК-маркеры «GeneRuler 100 bp DNA Ladder»

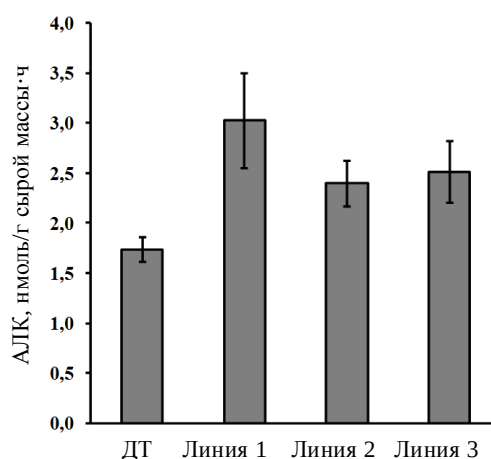


Рисунок 2 – АЛК-синтезирующая способность 4-недельных растений картофеля дикого типа и трансгенных растений картофеля с геном АЛК-синтетазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: ДТ – растения картофеля дикого типа; линия 1, линия 2 и линия 3 – линии трансгенных растений картофеля



Рисунок 3 – Внешний вид 4-недельных растений картофеля сорта Скарб *in vitro*:
ДТ – растения картофеля дикого типа; 1, 2, 3 – линии трансгенных растений картофеля с геном дрожжевой АЛК-синтетазы

С целью анализа устойчивости полученных трансгенных линий к низкотемпературному стрессу растения картофеля помещали в морозильную камеру при температуре -4°C на 40 мин. Ответная реакция растений дикого типа и трансгенных растений с геном АЛК-синтетазы на действие стрессового фактора была хорошо видна визуально. В частности, в условиях стресса все листья растений дикого типа темнели, теряли тургор и скручивались. Листья трансгенных растений также теряли свой тургор, но в меньшей степени, чем в диком типе (полная потеря тургора наблюдалась только у наиболее старых листьев).

Повреждающее действие низкотемпературного стресса оценивали также по накоплению продуктов ПОЛ и по выходу электролитов из листовой ткани растений (рис. 4 и 5).

В результате установлено, что при низкотемпературном стрессе количество ТБК-продуктов в диком типе возрастало в 1,4 раза, в клетках растений линий 2 и 3 – в 1,2 раза по сравнению с исходным уровнем (одинаковым для всех линий). Наименьшее содержание ТБК-продуктов было зафиксировано в трансгенных растениях картофеля линии 1. Трансгенные растения линии 1 характеризовались также пониженной проницаемостью мембран к электролитам по сравнению с диким типом (в 1,4 раза в соответствии с рис. 5). Полученные данные свидетельствуют о высокой степени защищенности клеточных мембран трансформированных растений линии 1 от окислительных повреждений, индуцированных низкотемпературным стрессом.

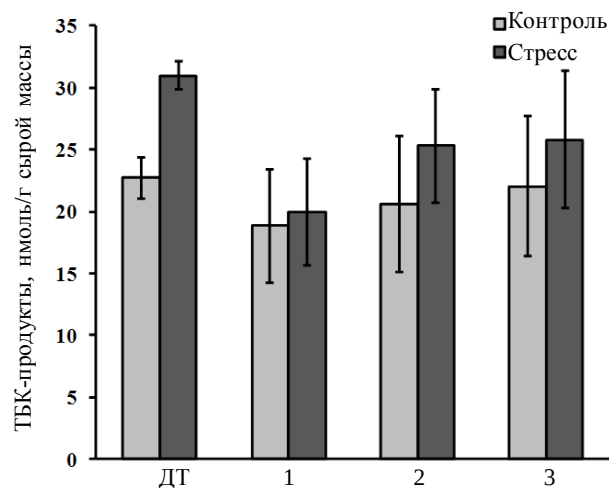


Рисунок 4 – Содержание ТБК-продуктов в листьях трансгенных растений картофеля и растений дикого типа в нормальных условиях выращивания и после действия низкотемпературного стресса: ДТ – растения дикого типа; 1, 2 и 3 – линии трансгенных растений картофеля с геном дрожжевой АЛК-синтетазы; контроль – нормальные условия выращивания; стресс – низкотемпературный стресс (–4 °С, 40 мин)

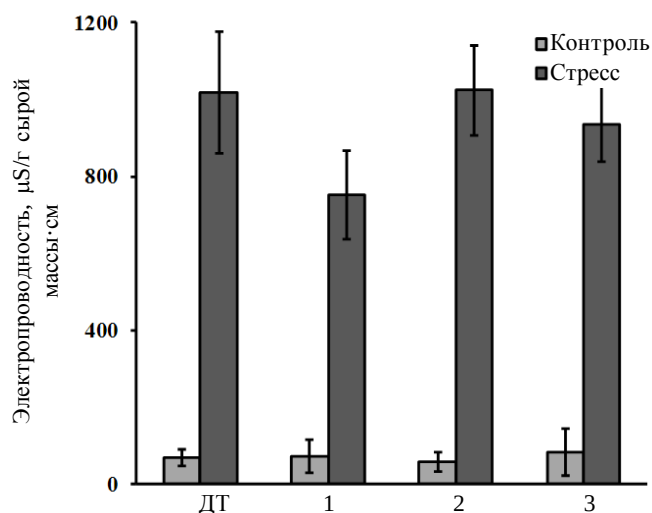


Рисунок 5 – Выход электролитов из ткани листьев трансгенных растений картофеля и растений дикого типа в нормальных условиях выращивания и после действия низкотемпературного стресса: ДТ – растения дикого типа; 1, 2 и 3 – линии трансгенных растений картофеля с геном дрожжевой АЛК-синтетазы; контроль – нормальные условия выращивания; стресс – низкотемпературный стресс (–4 °С, 40 мин)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что экспрессия рекомбинантного гена АЛК-синтетазы *Saccharomyces cerevisiae* в клетках трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L. сопровождается повышением их АЛК-синтезирующей способности, что свидетельствует в пользу функциональной активности данного гена. Дополнительное увеличение эндогенной АЛК в клетках сопровождается также повышенной устойчивостью трансгенных растений к действию низкой температуры по сравнению с диким типом. Установлено также, что наименьший уровень продуктов ПОЛ, а также более низкий выход электролитов в условиях низкой температуры наблюдается в клетках трансгенных растений картофеля, обладающих наибольшей АЛК-синтезирующей способностью.

Список литературы

1. Яронская, Е. Б. Экологически безопасные регуляторы роста растений на основе 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, Н. Г. Аверина, М. А. Кисель // Труды БГУ. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2012. – Т. 7. – Ч. 1. – С. 127–134.
2. Механизмы формирования устойчивости растений ячменя к солевому стрессу под действием 5-аминолевулиновой кислоты / Н. Г. Аверина [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – № 6. – С. 849–856.
3. Korkmaz, A. Effects of exogenic application of 5-aminolevulinic acid in crop plants / A. Korkmaz // Abiotic stress responses in plants: productivity and sustainability / P. Ahmad, M. N. V. Prasad. – N. Y., 2012. – P. 215–234.
4. Effects of 5-aminolevulinic acid on chilling tolerance in cucumber seedlings / L. Yin [et al.] // Acta Agric Boreali-Occidentalis Sin. – 2007. – Vol. 4. – P. 166–169.
5. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants / K. B. Balestrasse [et al.] // Phytochemistry. – 2010. – Vol. 71. – P. 2038–2045.
6. Zavgorodnyaya, A. Yeast 5-aminolevulinate synthase provides additional chlorophyll precursor in transgenic tobacco / A. Zavgorodnyaya, B. Papenbrock, J. Grimm // The Plant J. – 1997. – Vol. 12, № 1. – P. 169–178.
7. Defense response produced during photodynamic damage in transgenic rice overexpressing 5-aminolevulinic acid synthase / S. Jung [et al.] // Photosynthetica. – 2008. – Vol. 46, № 1. – P. 3–9.
8. Создание трансгенных растений картофеля с геном АЛК-синтетазы дрожжей / Т. А. Гапеева [и др.] // Картофелеводство: сб. науч. тр. / НППЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. – Минск, 2014. – Т. 22. – С. 50–57.
9. Накопление 5-аминолевулиновой кислоты, хлорофилла и каротиноидов в клетках трансгенных растений табака с геном АЛК-синтетазы дрожжей / С. М. Савина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 4. – С. 35–43.

10. Рогожин, В. В. Влияние ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов в проростках пшеницы / В. В. Рогожин, Т. Т. Курилюк // Биохимия. – 1996. – № 8. – С. 1432–1439.

Поступила в редакцию 21.11.2017 г.

I. A. DREMUK, T. A. GAPEEVA, T. G. TRETYAKOVA, S. M. SAVINA,
N. G. AVERINA, I. D. VOLOTOVSKIY

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF GENETIC CONSTRUCTION
FOR THE SYNTHESIS OF 5-AMINOLEVULINIC ACID
IN TRANSGENIC POTATOES PLANTS**

SUMMARY

The transgenic plants of potatoes expressing the gene for the synthesis of Saccharomyces cerevisiae ALA-synthase have been shown to possess the increased ALA-synthesizing ability and higher resistance to low temperature in comparison with the wild type.

Key words: Solanum tuberosum, 5-aminolevulinic acid, transgenic plants, low temperature stress.