

На правах рукописи

Айман Салям

АЙМАН МОХАМЕД ЭЛЬ САЕД ГОМАА

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
РАПСА (*Brassica napus* L.)
СО ВСТРОЕННЫМ ГЕНОМ *OSMYB4***

Специальность 03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и на кафедре ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии Российского университета дружбы народов, Москва.

Научный руководитель:
кандидат биологических наук

Ралдугина Галина Николаевна

Научный консультант:
доктор биологических наук
профессор, чл.-корр. РАН

Кузнецов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Хрянин Виктор Николаевич

Кандидат биологических наук, профессор

Семенов Олег Григорьевич

Ведущая организация:

Российский государственный аграрный университет – МСХА
им. К.А. Тимирязева

Защита состоится 21 июня 2011 г. в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499)977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru; m_azarkovich@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан «20» мая 2011 г.

Ученый секретарь Совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
канд. биол. наук



Азаркович М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Использование современных методов клеточной, молекулярной биологии и биотехнологии позволило достичь крупных успехов в повышении устойчивости растений к гербицидам и биопатогенам, но не к повреждающим абиотическим факторам. Это делает актуальным разработку теоретических основ создания безопасных для человека и окружающей среды стресс-толерантных сортов растений. Одной из таких культур является рапс - важнейшая масличная с/х культура, которая наряду с подсолнечником, соей и хлопчатником служит источником пищевого и технического масла, содержащего самое низкое количество вредных для здоровья насыщенных жирных кислот.

На протяжении онтогенеза растения подвергаются действию различных неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как низкие положительные температуры, засуха, засоление, тяжелые металлы и многие другие, негативно влияющих на рост, развитие и продуктивность с/х культур. Растения отвечают на абиотические воздействия экспрессией стресс-специфических генов, что может сопровождаться повышением их устойчивости [Thomashow, 1999; Viswanathan, 2002; Трунова, 2007].

Ключевая роль в регуляции экспрессии генов принадлежит трансфакторным белкам [Latchman, 2007; Du and et al., 2009], которые объединены в семейства. Одним из них является семейство *myb* генов, все члены которого имеют консервативный ДНК-связывающий домен, характерный для животных, растений и дрожжей. К семейству *myb* генов трансфакторных белков относится ген *Osmyb4* (Y11414) риса [Pandolfi et al., 1997]. Гетерологическая суперэкспрессия этого гена в растениях арабидопсиса и яблони приводила к повышению холодо- и засухоустойчивости, а также устойчивости к биопатогенам [Vannini et al., 2004, 2006; Mattana et al., 2005]. По данным авторов, в основе повышения стресс-устойчивости этих растений лежит интенсивная аккумуляция совместимых осмолитов.

Для повышения устойчивости в настоящее время растения, как правило, трансформируют генами функциональных белков (ферментов синтеза и деградации защитных макромолекул и низкомолекулярных органических соединений, транспортеров, шаперонов и т.п.). Значительно более эффективным является

использование для этой цели генов транс-факторов, в частности, гена *Osmyb4* риса. В этом случае один трансген контролирует «работу» целой кассеты стресс-регулируемых генов, что и приводит к повышению устойчивости растений к стрессорам различной природы, в том числе и к низкой температуре.

Как известно, холодовой стресс негативно влияет на растения, ингибируя скорость протекания метаболических реакций, а также вызывая осмотический и окислительный стресс. В процессе адаптации растений к холоду наблюдается накопление стресс-протекторных соединений [Dionne et al., 2001; Трунова, 2007; Groppa, Benavides, 2008; Синькевич и др., 2009], таких как аминокислоты, четвертичные ионы, растворимые сахара, сахароспирты и другие метаболиты [Hare et al., 1998; Dionne et al., 2001; Patton et al., 2007].

Эти результаты делают крайне актуальным изучение влияния гетерологической суперэкспрессии трансгена *Osmyb4* на функционирование защитных систем и холодоустойчивость растений рапса. Тем более экспрессия гена *Osmyb4* риса в растениях не всегда приводит к повышению их холодоустойчивости [Vannini et al., 2007], что говорит о видоспецифичности данного признака.

В этой связи было важно выяснить, сопровождается ли активная экспрессия гена *Osmyb4* риса в растениях рапса формированием защитных механизмов и повышением их устойчивости к холоду. Исследование данной проблемы представляет как большой теоретический, так и значительный практический интерес и позволяет не только лучше понять механизмы адаптации растений к низким положительным температурам, но и содействовать разработке современных технологий повышения стресс-толерантности растений.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы заключалась в том, чтобы выяснить, сопровождается ли суперэкспрессия гена *Osmyb4* транс-фактора риса в растениях рапса повышением устойчивости к низкотемпературному стрессу и, в случае позитивного ответа, исследовать возможные механизмы.

Для достижения этой цели **необходимо было решить следующие задачи:**

- (1) Исследовать, наследуется ли в растениях рапса трансген *Osmyb4* риса, и экспрессируется ли он в процессе холодовой адаптации.
- (2) Оценить уровень холодоустойчивости трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген *Osmyb4* риса.

(3) Исследовать динамику изменений совместимых осмолитов (растворимых сахаров и пролина) в трансгенных растениях рапса в процессе низкотемпературного стресса.

(4) Изучить аккумуляцию общих фенолов и флавоноидов, а также антоцианов, обладающих антиоксидантными свойствами, в трансгенных растениях рапса в условиях низкотемпературного стресса.

Научная новизна работы. Показано, что в процессе генеративного размножения трансгенных растений рапса ген трансфакторного белка *Osmyb4* наследуется и активно экспрессируется в процессе адаптации к низкотемпературному стрессу. Установлено, что экспрессия трансгена *Osmyb4* в растениях рапса сопровождается повышением устойчивости к низким положительным и отрицательным температурам. В основе повышения устойчивости растений к гипотермии лежит снижение интенсивности окислительного стресса в результате аккумуляции низкомолекулярных органических антиоксидантов и увеличения активности антиоксидантных ферментов, с одной стороны, и накопления совместимых осмолитов, с другой. Впервые установлено, что интенсивная экспрессия гена *Osmyb4* трансфактора риса в растениях рапса в ответ на гипотермию сопровождается активацией «работы» генов различных метаболических путей, реализация которых на уровне физиологических функций обеспечивает формирование важных защитных механизмов и повышение устойчивости к неблагоприятным температурам.

Практическая ценность работы. Полученные трансгенные растения рапса с интенсивной экспрессией гена транс-фактора *Osmyb4* риса являются прекрасной модельной системой для изучения стресс-толерантности растений к различным повреждающим абиотическим факторам. Кроме того, эти растения могут быть полезны в селекционной практике в качестве исходных линий для создания новых сортов растений с повышенной устойчивостью к гипотермии. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы экспериментальные данные и сделанные на их основе обобщения могут быть использованы в университетах и ВУЗах страны в курсах лекций по технологии создания генетически модифицированных стресс-толерантных растений.

Апробация работы. Результаты работы были представлены: на I Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых и аспирантов аграрных вузов РФ; на Международной научной конференции "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера" (Апатиты, Россия, 2009), на 10-й молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2010), на III Всероссийском симпозиуме "Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности" (Москва, 2010), на Всероссийском симпозиуме "Растение и стресс" (Москва, 2010), на VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), на Научной молодежной конференции ИФР РАН (Москва, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них одна статья вышла из печати, вторая принята в печать в журналы, включенные в перечень ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, и списка цитированной литературы. Объем работы составляет 123 страницы. В диссертации содержится 22 рисунка, 2 таблицы. Список цитированной литературы содержит 259 источников, в том числе 226 на иностранных языках.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования были трансгенные и нетрансформированные растения *Brassica napus* var. *napus* ярового рапса сорта Вестар канадской селекции. Трансформированные растения рапса с геном *Osm14* были созданы ранее в ИФР РАН. Полученные через культуру тканей растения размножали черенкованием *in vitro* на модифицированной среде Мурасиге Скуга и после укоренения помещали в условия гидропонной культуры на среду Хогланда-Снайдерс. В возрасте 5-6 листьев растения делили на группы, одни из которых служили контролем и постоянно находились при температуре 24°C, фотопериоде 12/12, освещенности 2,5 клк, тогда как другие растения перемещали в холодную камеру фитотрона с температурой 4°C, тем же фотопериодом и освещенностью 1,2 клк. Третью группу растений помещали в климатическую камеру, где температура

изменялась согласно программе от +4°C до -6°C; освещенность составляла 2,0 клк, фотопериод – 12/12 ч.

Методы исследования. Биомассу и содержание воды в растительном материале оценивали, используя гравиметрический метод. Сухую массу определяли после фиксации при 90°C и высушивания (при 70°C) до постоянного веса. Содержание воды (%) рассчитывали, исходя из разности свежей и сухой биомасс [Пустовой и др., 1995].

Растворимые сахара определяли, экстрагируя сахара из растительной ткани 80% этанолом. Количественное определение фруктозы и сахарозы проводили с резорцином по Рое [Туркина и др., 1971]. Глюкозу определяли глюкозооксидазным методом, используя готовый набор реактивов (Sigma, № 510, USA).

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по методу *Heath and Packer* [1968], активность СОД – по методу *Beauchamp and Fridovich* [1971]. Определение активности пероксидазы проводили по методу, предложенному *Ridge, Osborne* [1971], свободного пролина - по методу *Bates et al.* [1973]. Определение растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Дениса [Загоскина и др., 2003], содержание флавоноидов - по методу *Gage* [*Gage, Wendei*, 1950], содержание антоцианов - по методу *Mabry* [*Mabry et al.*, 1970], содержание белка - по методу *Esen* [1978]. Тотальную ДНК выделяли по методу *Fulton* [*Fulton et al.*, 1995], обрабатывали РНКазой (Serva, Германия) и оценивали качество ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Тотальную РНК выделяли фенольным методом по *Westhoff et al.* [1981]. Очистку от примесей ДНК, обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов фирм «Fermentas» (Литва) и «СибЭнзим» (Россия). Подбор праймеров осуществляли с помощью программ Oligo 6.71. Для ПЦР использовали праймеры, синтезированные фирмой «Литех» (Россия):

Myb-1(+) 5'CGGGAGGACGGACAACGAG3'; Myb-2(-)

5'GGATGGCGGCGCGACGAAC3'; NPT-1(+) 5'GTGGAGAGGCTATTCGGCTA3'; NPT-2(-) 5'CCACCATGATATTCGGCAAG3';

R18-1 (+)5'GAGTGATGTGCCAGACCTAGGAATT3';

R18-2 (-) 5'ATGCTGATCCGCGATTAAGTAC3'.

Все опыты были поставлены в трехкратной биологической повторности. Аналитическая повторность для каждой из них равна 3. Результаты обработаны с использованием пакета программ Windows Excel. Бары показывают относительную ошибку среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Наследование трансгена *Osmyb4* в процессе генеративного развития растений рапса и регуляция его экспрессии в условиях гипотермии

Изучение стрессорного ответа растений рапса с геном *Osmyb4* риса на действие низкой положительной температуры проводили на трансгенных растениях-потомках, поскольку в растениях первого поколения наследуемый ген в меньшей мере подвержен сайленсингу. По этой причине необходимо было получить растения рапса первого поколения и доказать их трансгенность. Ранее в ИФР РАН были получены трансгенные растения рапса нулевого поколения с геном *Osmyb4* риса под контролем *COR15* промотора [Радионов и др., 2007], трансформируя плазмидой *COR15Myb4*, любезно предоставленной итальянскими коллегами [Vannini et al., 2004].

Трансгенные растения рапса нулевого поколения с геном *Osmyb4* риса размножали черенкованием. Черенки укореняли и высаживали в почву. В этих условиях они нормально росли и развивались и морфологически не отличались от исходных нетрансформированных растений. Для дальнейшей работы нами было выбрано растение с наибольшей семенной продуктивностью. Семена, собранные с этого растения, проращивали в условиях *in vitro* до состояния проростков. Из семядолей полученных проростков выделяли ДНК, и с помощью ПЦР проводили скрининг на наличие в проростках трансгенов *Osmyb4* и *nptII*.

Результаты скрининга показали (табл. 1), что целевой ген *Osmyb4* присутствовал в геноме 50 тестированных проростков (52,6%), селективный ген устойчивости к Км *nptII* - в геноме 19 проростков (20,3%), тогда как оба эти трансгена одновременно обнаруживались в 26 проростках (27,3%). Эти данные свидетельствуют о том, что трансген *Osmyb4* наследуется в процессе генеративного развития рапса.

В дальнейшем исследовали экспрессию на уровне транскриптов гена *Osmyb4* в трансгенных растениях рапса, одновременно содержавших гены *Osmyb4* и *nptII*.

Таблица 1. Наследование трансгенов *Osmyb4* и *nptII*

Число высаженных семян	Число исследованных растений	Число растений с геном <i>Osmyb4</i>	Число растений с геном <i>nptII</i>	Число растений с генами <i>Osmyb4</i> и <i>nptII</i>	Число растений, экспрессировавших ген <i>Osmyb4</i>
150	95 100%	50 52,6%	19 20,3%	26 27,3%	19

В связи с тем, что целевой ген *Osmyb4* риса стоит под *COR15* промотором, то перед выделением РНК все растения в течение суток подвергали действию холода (24 час, 4°C). Уровень индивидуальных транскриптов гена *Osmyb4* оценивали с помощью ОТ-ПЦР. С этой целью из листьев трансгенных растений выделяли тотальную РНК и использовали ее для синтеза кДНК. Полученные кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами к гену *Osmyb4*. В качестве контрольного использовали фрагмент гена R18 (рис.1).

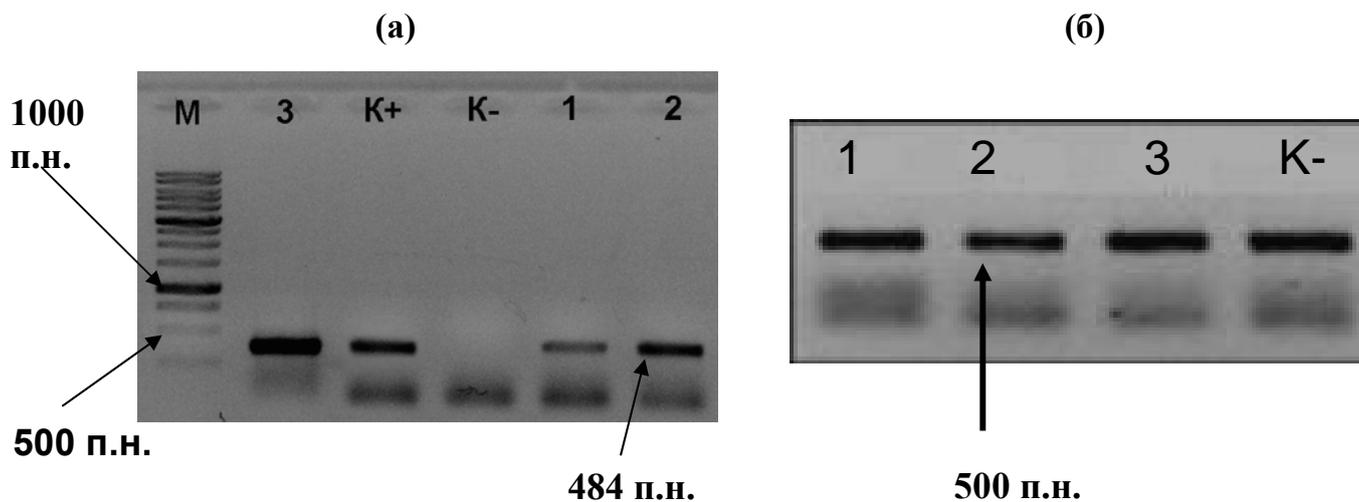


Рис.1. Экспрессия генов *Osmyb4* и *R18* у трансгенных растений риса при низкой положительной температуре.

Уровень индивидуальных транскриптов генов *Osmyb4* (а) и *R18* (б) оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Для этого из листьев трансгенных растений, подвергнутых холодовой обработке (24 час, 4°C), выделяли тотальную РНК, на ней синтезировали кДНК и амплифицировали их с помощью ПЦР со специфическими праймерами к генам *Osmyb4* и *R18*. Фрагмент гена R18 использовали в качестве контрольного для нормализации результатов. Обозначения: “М” – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК; “К+” – положительный контроль (использовали плазмиду CORMyb4 для проведения ПЦР); “К-” – отрицательный контроль (кДНК синтезировали на РНК из нетрансгенных растений); 1 (Вn-1), 2 (Вn-2), 3 (Вn-3) – кДНК синтезировали на РНК из различных линий растений-трансформантов.

Проведенный анализ показал, что из 26 полученных трансгенных растений, содержащих оба встраиваемых гена, экспрессия гена *Osmyb4* на уровне образования транскриптов наблюдалась у 19 растений, тогда как у остальных 7 растений ген *Osmyb4* не экспрессировался, несмотря на его присутствие в геноме (Табл.1). Для дальнейших исследований нами были выбраны 3 линии растений с разным уровнем экспрессии *Osmyb4* гена. При этом одно из трансгенных растений обнаруживало слабую (Вn-1), другое среднюю (Вn-2) и, наконец, третье – сильную интенсивность экспрессии гена *Osmyb4* (Вn-3) (рис. 1а).

Ранее было показано, что не все трансгенные растения с интенсивной

экспрессией гена *Osmyb4* обнаруживали повышение холодоустойчивости [Vannini et al., 2004, 2007]. Это делало целесообразным исследование влияния низкотемпературного стресса на трансгенные растения рапса с геном *Osmyb4*.

2. Трансгенные растения рапса с геном *Osmyb4* обнаруживают большую холодоустойчивость по сравнению с исходной формой.

О более высокой холодоустойчивости трансгенных растений рапса свидетельствовала (1) их способность к более активной аккумуляции биомассы при температуре 4°C, (2) поддержание водного статуса и (3) меньшая интенсивность окислительного стресса при гипотермии.

Полученные результаты показали (рис. 2), что трансгенные растения рапса обнаруживали меньшую (на 15%) степень ингибирования накопления сырой биомассы при гипотермии по сравнению с нетрансформированными формами, что свидетельствует в пользу их более высокой холодоустойчивости

Известно, что при охлаждении растения испытывают водный дефицит из-за снижения их водопоглотительной способности. Нами было исследовано содержание воды в листьях растений при оптимальных условиях (+24°C) и при +4°C. Полученные результаты показали (рис. 3), что оводненность листьев растений, находившихся 48 час при +4°C, в большей мере снижалась у нетрансформированных растений (на 10%), чем у трансгенных (на 6%), тогда как на пятые сут гипотермии эти значения составляли 14% и 10% соответственно. Перенос растений на +24°C приводил к восстановлению оводненности листьев.

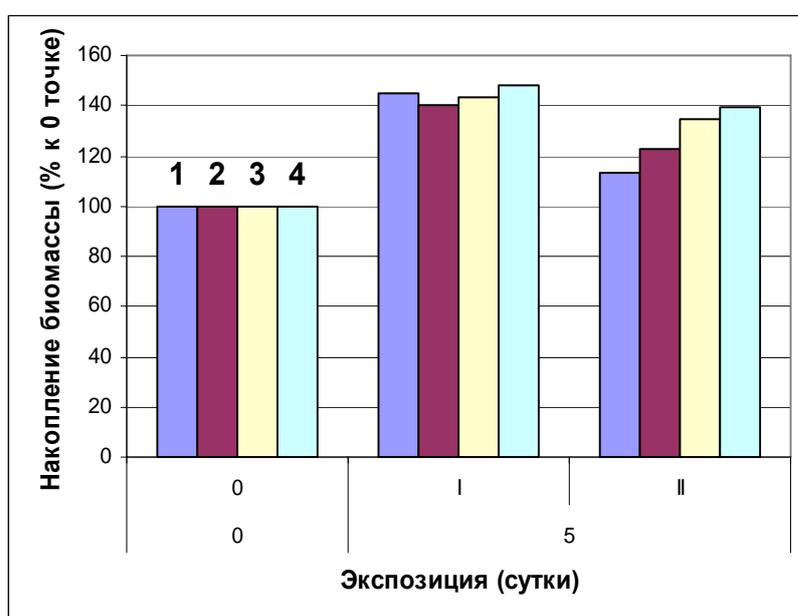


Рис.2. Влияние низкой положительной температуры на накопление сырой биомассы в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса I – растения при 24°C; II – растения при 4°C; 1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Вп-1; 3- трансгенные растения линии Вп-2; 4 – трансгенные растения линии Вп-3.

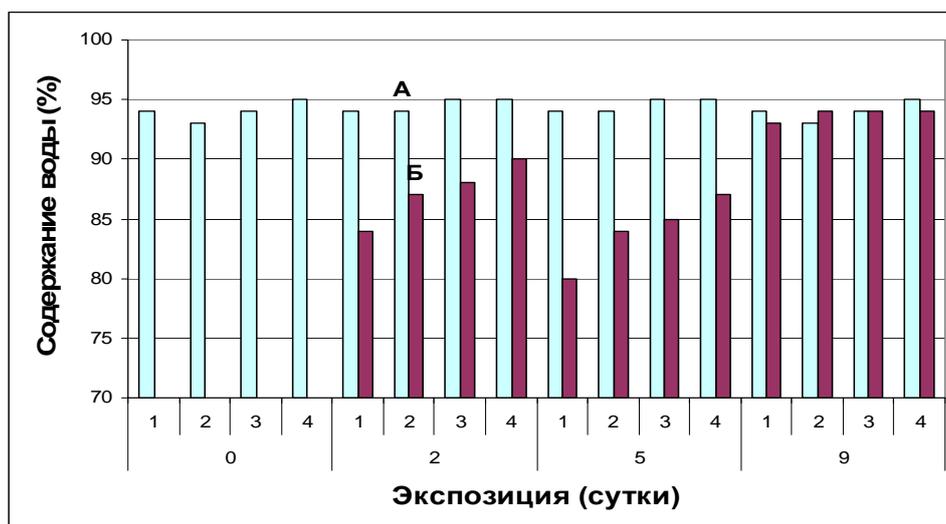


Рис. 3. Влияние низкой положительной температуры на содержание воды в листьях растений рапса

А – растения выращивали при 24°C; Б – растения выдерживали 5 сут при 4°C;
 1 – нетрансгенные растения; 2 – трансгенные растения линии Vn-1; 3- трансгенные растения линии Vn-2; 4 – трансгенные растения линии Vn-3

Уровень малонового диальдегида (МДА) говорит об интенсивности протекания процесса перекисного окисления липидов мембран, в свою очередь свидетельствующего о степени повреждающего действия стрессора. В трансгенных и исходных линиях рапса при температуре 4°C накопление МДА было различным. При адаптации к холоду уровень МДА в листьях нетрансформированных растений возрастал в 1.7 и 2.3 раза через 2 и 5 суток гипотермии соответственно, тогда как у трансгенных растений его содержание практически не изменялось (рис. 4). Спустя 4 суток после переноса растений, подвергнутых воздействию 4°C, в оптимальные для роста условия (24°C), содержание МДА восстанавливалось практически до исходных значений у всех исследованных генотипов, что говорит об отсутствии серьезных повреждений метаболизма растений в условиях гипотермии.

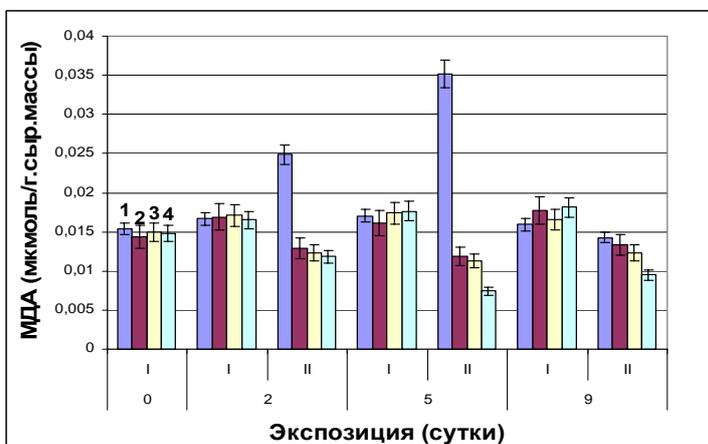


Рис. 4. Накопление МДА в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса

I – растения при +24°C;
 II – растения при +4°C
 1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Vn-1; 3- трансгенные растения линии Vn-2; 4 – трансгенные растения линии Vn-3

3. Аккумуляция совместимых осмолитов трансгенными растениями рапса при гипотермии

Одной из универсальных защитных реакций растений в ответ на действие холода, засухи, засоления и других абиотических факторов, нарушающих водный статус, является аккумуляция совместимых осмолитов, обладающих осморегуляторным и стресс-протекторным эффектом.

3.1. Аккумуляция растворимых сахаров растениями рапса

Сравниваемые линии трансгенных и нетрансформированных растений рапса существенно различались по содержанию растворимых сахаров в условиях гипотермии, несмотря на то, что при оптимальной температуре роста они имели близкие уровни сахарозы, глюкозы и фруктозы, которые незначительно изменялись при +24°C в течение всего эксперимента (рис. 5 а,б,в,г).

Нетрансформированные растения на вторые сутки экспозиции на холоде обнаруживали значительные изменения содержания сахарозы, фруктозы и глюкозы. На 5 сутки адаптации растений к +4°C количество сахарозы уменьшалось, тогда, как содержание моносахаров несколько возрастало (рис. 5а). На этапе восстановления содержание сахарозы падало в 3 раза, фруктозы - в 5 раз, глюкозы – более чем в 15 раз.

Трансгенные растения, в отличие от растений дикого типа, не обнаруживали на холоде выраженных изменений в содержании растворимых сахаров (рис. 5б, 5в, 5г). Так, в трансгенных линиях рапса содержание сахарозы изменялось от 2-х до 6, фруктозы – от 0.8 до 3.2 и глюкозы – от 0.2 до 1.0 мкмоль/г сырой массы. Существенно отметить, что все сравниваемые трансгенные линии Vn-1, Vn-2 и Vn-3, различающиеся интенсивностью экспрессии *Osmyb4* гена, несколько отличались по реакции на понижение температуры. У растений линии Vn-1 содержание сахарозы в течение всей холодовой обработки возрастало в 1,4 раза (рис. 5б), у растений линии Vn-2 оно увеличивалось почти в 1,9 раза (рис. 5в), а у растений Vn-3 возрастало в 2,2 раза (рис. 5г). При возвращении адаптированных к низкой температуре растений на 24°C содержание сахарозы снижалось (рис. 5 б,в,г). В ответ на действие низкой положительной температуры растения линии Vn-1 реагировали почти 3-х кратным увеличением содержания фруктозы, тогда как уровень этого сахара у растений линии Vn-2 и Vn-3 уменьшался приблизительно в 4 раза. На этапе восстановления у трансгенных растений Vn-1 содержание фруктозы уменьшалось почти до первоначальных значений, у растений линии Vn-2

падало в 2 раза (рис. 5б), а у растений линии Вп-3 содержание фруктозы почти не изменялось (рис.5г).

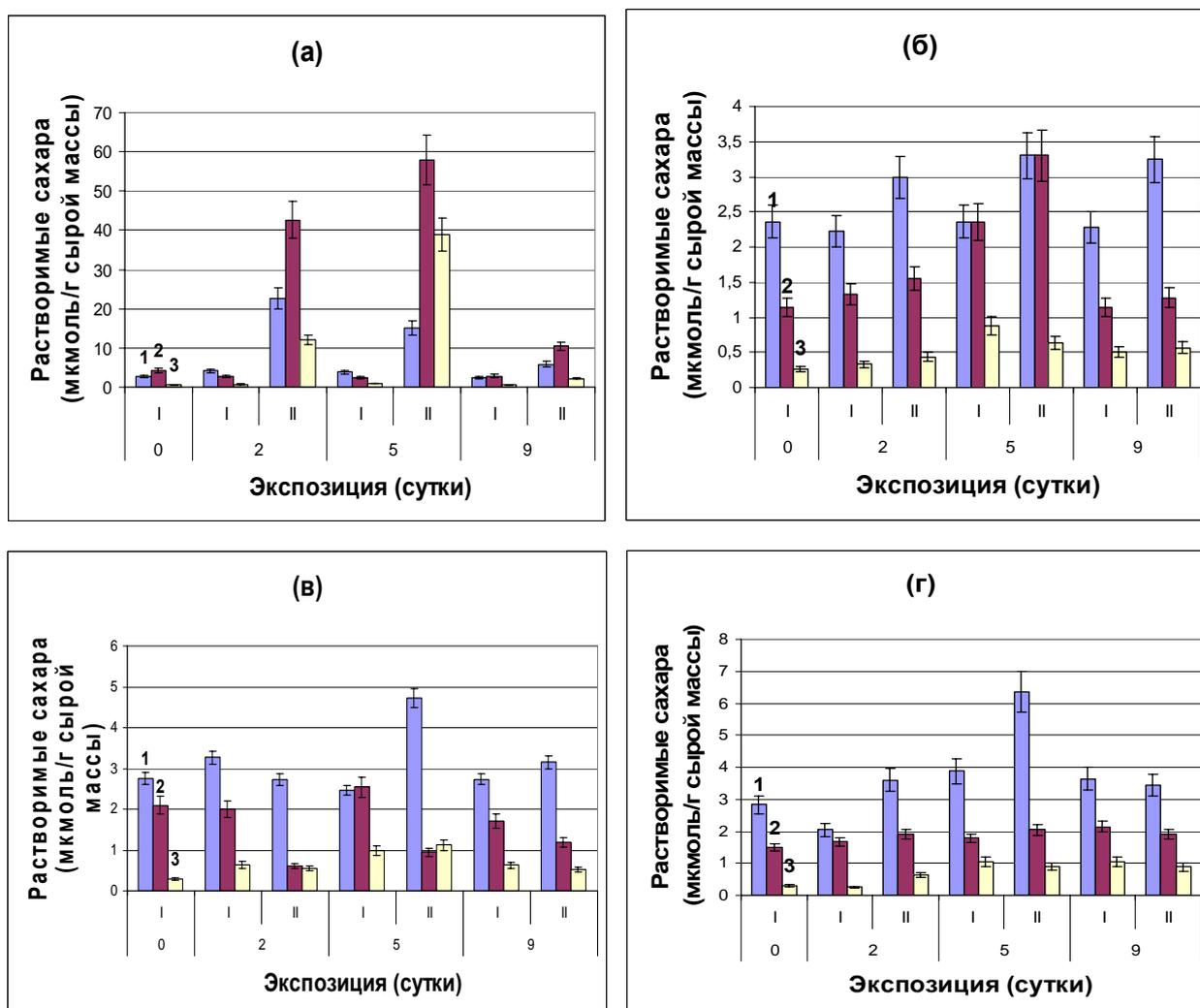


Рис. 5. Накопление растворимых сахаров в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса

1 – сахароза; 2 – фруктоза; 3- глюкоза

а) сахара в нетрансформированных растениях; б) сахара в трансгенных растениях линии Вп-1; в) сахара в трансгенных растениях линии Вп-2; г) сахара в трансгенных растениях линии Вп-3;

I – растения при 24°C; II – растения при 4°C;

3.2. Аккумуляция свободного пролина

Накопление пролина в нетрансформированных растениях несколько возрастало в процессе адаптации к холоду, достигая максимума ко 2 суткам (около 1 $\mu\text{mol/g}$ сырой массы), и затем оставалось на одном и том же уровне (рис. 6). В отличие от растворимых сахаров, содержание пролина во всех сравниваемых линиях трансгенных растений возрастало весьма значительно, увеличиваясь на 2 сутки примерно в 8 раз, а на 5 сутки - почти в 20 раз. При этом просматривалась

некоторая тенденция к более активному накоплению пролина при холоде трансгенными растениями линии Vn-3 с более интенсивной экспрессией гена *Osmyb4* (рис. 6). На этапе восстановления наблюдалось резкое падение содержания пролина у растений всех трансгенных линий.

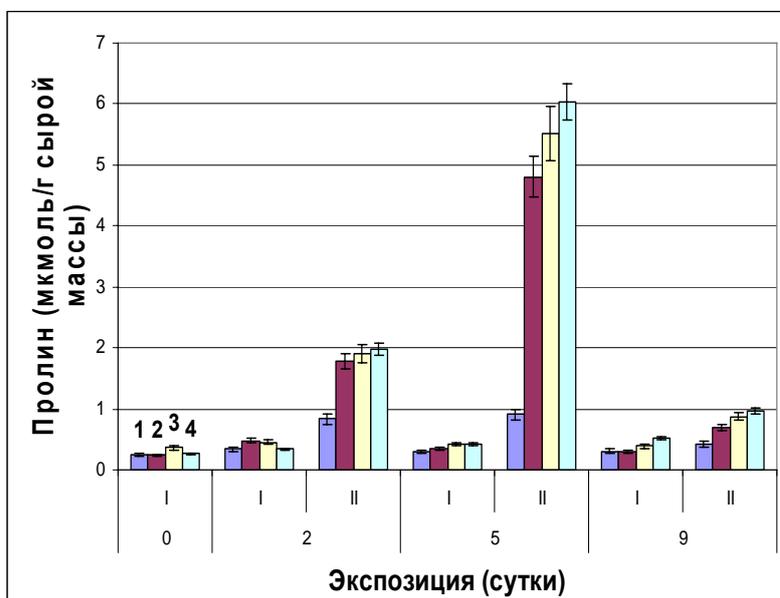


Рис. 6. Влияние низкой положительной температуры на накопление пролина в трансгенных растениях рапса
 I – растения при 24°C; II – растения при 4°C;
 1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Vn-1;
 3 – трансгенные растения линии Vn-2; 4 – трансгенные растения линии Vn-3

4. Аккумуляция фенолов и антоцианов, а также изменение активности антиоксидантных ферментов в растениях рапса в процессе холодной адаптации

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что трансгенные растения рапса с геном *Osmyb4* характеризуются меньшей интенсивностью окислительного стресса при +4°C по сравнению с нетрансформированными растениями (рис. 4). Это позволило предположить, что одной из причин сохранения внутриклеточного окислительного статуса трансгенных растений в условиях гипотермии является аккумуляция антиоксидантных соединений, к которым могут быть отнесены, прежде всего, растворимые фенолы и антоцианы.

4.1. Накопление фенолов

Результаты, представленные на рис. 7, показывают, что трансгенные растения рапса линии Vn-3, характеризующиеся наиболее интенсивной экспрессией *Osmyb4* гена, обнаруживают значительную аккумуляцию общих фенолов и флавоноидов в процессе холодной адаптации. Существенно отметить, что нетрансформированные и трансгенные растения рапса в исходном состоянии не различались по уровню флавоноидов и общих фенолов (рис. 7 а, б). Более того, их содержание практически не изменялось в процессе адаптации нетрансгенных

растений к холоду (4°C). Растения линии Вп-1 реагировали на действие температуры 4°C увеличением содержания общих фенолов и флавоноидов лишь в 1.3-1.4 и в 1.8 раза через 2 и 5 суток соответственно, тогда как в листьях растений двух других линий Вп-2 и Вп-3 и на 2 и 5 сутки адаптации к холоду содержание фенолов возрастало значительно сильнее (в 2 и 3 раза у Вп-2 и в 2.6 и 3.7 раза у Вп-3 соответственно). Еще более интенсивно накапливались флавоноиды, содержание которых на вторые сутки действия холода составляло 18.6 мкг/г сырой массы, тогда как на пятые сутки – 21.0 мкг/г сырой массы; при этом содержание флавоноидов в тех же самых растениях, но не подвергнутых воздействию холода, составляло лишь 5.2 мкг/г сырой массы (рис. 7б). На этапе восстановления содержание фенолов и флавоноидов в нетрансгенных растениях и в растениях линии Вп-1 не отличалось от исходного уровня, тогда как растения линий Вп-2 и Вп-3 реагировали на возвращение их на температуру 24°C интенсивным снижением уровня фенольных соединений, хотя и в этом случае содержание флавоноидов и общих фенолов в 1.5 раза превосходило исходный уровень.

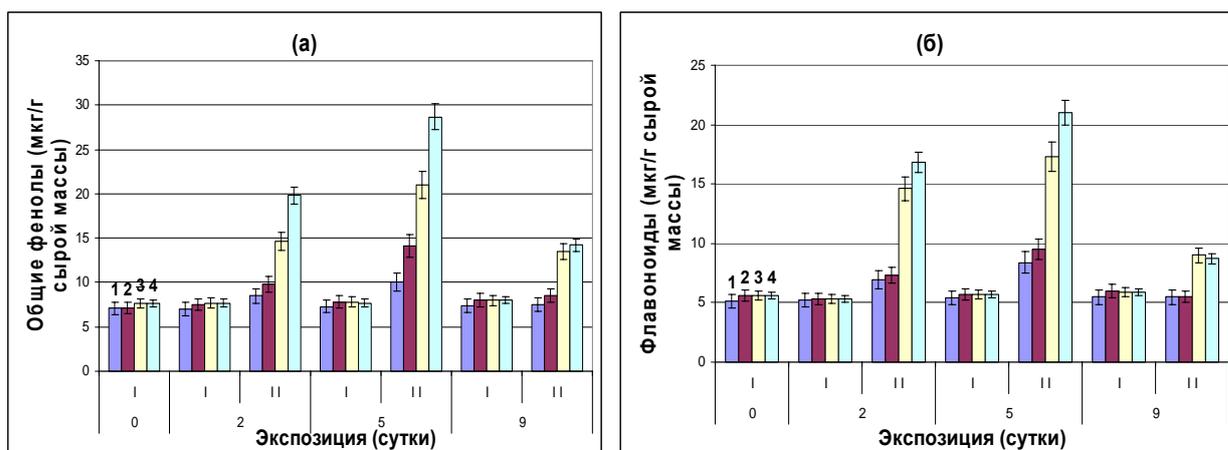


Рис. 7. Накопление общих фенолов и флавоноидов в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса
 I – растения при +24°C; II – растения при +4°C; 1 – нетрансформированные растения;
 2 – трансгенные растения линии Вп-1; 3- трансгенные растения линии Вп-2;
 4 – трансгенные растения линии Вп-3

4.2. Аккумуляция антоцианов

Характер изменения содержания антоцианов в сравниваемых линиях растений в процессе их адаптации к низкой положительной температуре (рис. 8) практически не отличался от изменения содержания исследованных выше фенольных соединений (рис. 7). При этом содержание антоцианов в растениях линии Вп-1 увеличивалось в 1.9 – 2.1 раза в течение 5 суток действия холода.

Наиболее интенсивное накопление антоцианов наблюдалось в процессе адаптации трансгенных растений линий Vn-2 и Vn-3 к температуре 4°C. В этом случае через 2 и 5 суток содержание антоцианов возрастало в 3.5 и 5.3 раза соответственно (рис. 8). Возвращение растений, подвергнутых действию температуры +4°C, на 24°C сопровождалось резким снижением содержания антоцианов в растениях линии Vn-1 и частичным падением их уровня в растениях линий Vn-2 и Vn-3.

Представленные выше данные однозначно свидетельствуют о том, что способность трансгенных растений рапса аккумулировать растворимые фенолы и антоцианы в процессе адаптации к холоду зависит от интенсивности экспрессии трансгена *Osmyb4* риса.

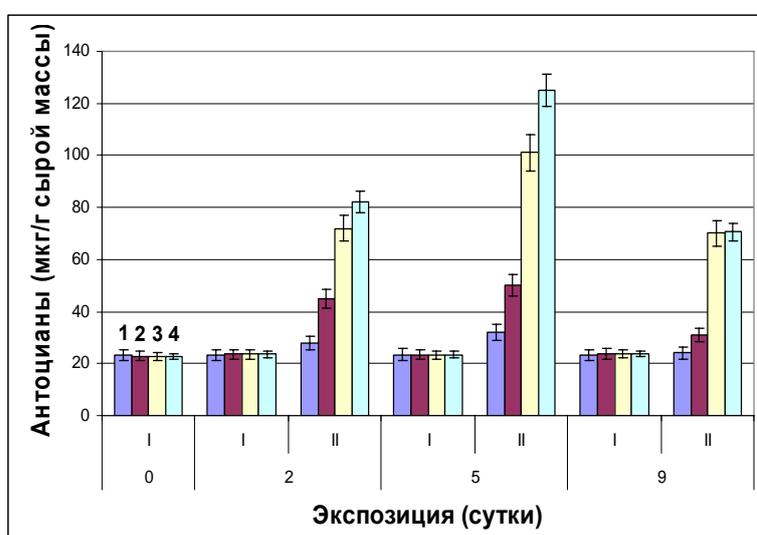


Рис. 8. Накопление антоцианов в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса
 I – растения при 24°C; II – растения при 4°C;
 1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Vn-1;
 3 – трансгенные растения линии Vn-2;
 4 – трансгенные растения линии Vn-3

4.4. Изменение активностей супероксиддисмутазы (СОД) и гваякольной пероксидазы при холодовом стрессе

Уровень активности гваяколовой пероксидазы при 4°C у трансгенных растений рапса практически не изменялся в течение первых 2-х суток, тогда как у нетрансформированных растений повышался почти в 2 раза; через 5 суток гипотермии активность пероксидазы у всех исследуемых генотипов резко падала. На 4-е сутки переноса растений на +24°C активность пероксидазы восстанавливалась в большей степени у трансгенных растений, чем у нетрансформированных (рис. 9а).

Активность СОД при +24°C у нетрансформированных растений была выше, чем у трансгенных (рис. 9б). Через 2 суток гипотермии активность СОД падала у нетрансформированных линий в 1,8 раза, а у трансгенных растений - в 2,5 раза. На 5 сутки действия температуры +4°C активность СОД возрастала у всех

исследованных генотипов; при этом у трансгенных растений значения активности были ближе к исходным.

Совокупность представленных данных свидетельствует о том, что наибольший вклад в поддержание окислительного статуса трансгенных растений при гипотермии вносили фенольные соединения и антоцианы, но никак не СОД или пероксидаза.

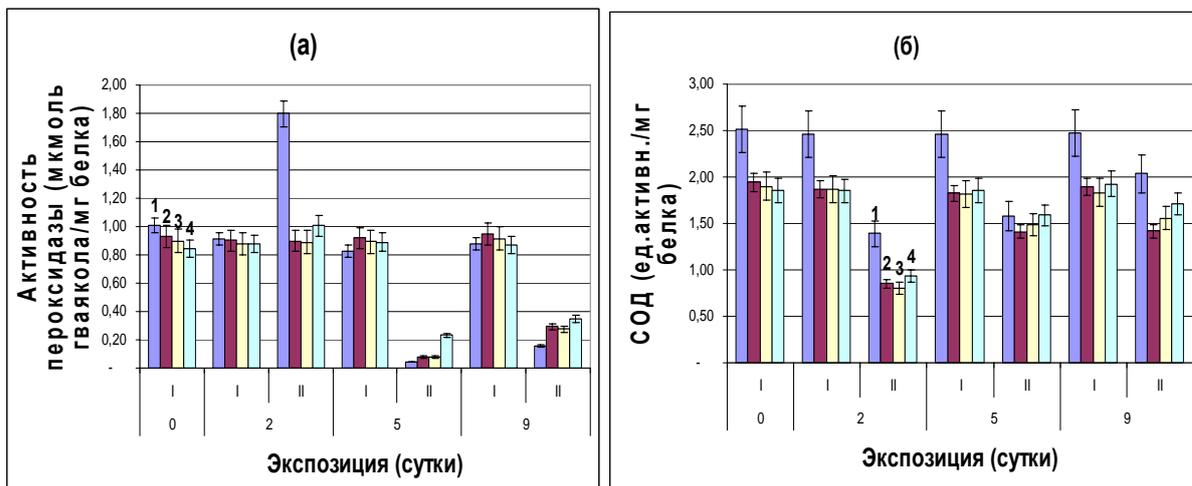


Рис. 9. Активность гваяколовой пероксидазы (а) и супероксиддисмутазы (б) в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса.

I – растения выращивали при +24°C; II – растения выращивали при +4°C;

1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Vn-1;

3- трансгенные растения линии Vn-2; 4 – трансгенные растения линии Vn-3

5. Стрессорный ответ трансгенных растений рапса на действие отрицательной температуры

Для изучения ответа растений на действие отрицательных температур 3-х недельные растения рапса всех исследуемых линий (24°C, фотопериод 12/12), делили на 3 равные группы: *растения первой группы* постоянно находились при 24°C; *растения второй группы* сначала адаптировали к температуре 4°C (5 сут), затем снижали температуру и выдерживали их при -6°C (2 сут). После этого растения переносили на 4°C (6 час) и, наконец, - на 24°C; *растения третьей группы* без предварительной адаптации помещали при -6°C, а затем, так же как и растения 2-ой группы, последовательно переносили на +4°C (6 час) и на 24°C. Биологические пробы брали после промораживания, спустя 6 час экспозиции растений при 4°C.

5.1. Накопление МДА

Как показывают полученные результаты (рис. 10), трансгенные и нетрансформированные растения, подвергнутые последовательному действию

температуры -6°C (2 сут) и 4°C (6 час), существенно различались по содержанию МДА. Так, у нетрансформированных неадаптированных растений содержание МДА возрастало в 2.5, тогда как у адаптированных растений – лишь в 1.6 раза. При этом у трансгенных растений всех трех линий накопление МДА было намного менее интенсивным, чем у нетрансформированных. Причем, содержание МДА было примерно одинаковым для адаптированных при $+4^{\circ}\text{C}$ трансгенных растений и растений не адаптированных. Существенно, что наименьшее количество МДА наблюдалось у растений линии Вп-3 с наибольшей интенсивностью экспрессии гена *Osmyb4*. Полученные данные говорят в пользу большей устойчивости к отрицательным температурам трансгенных растений рапса с гетерологической экспрессией гена транс-фактора OSMYB4 риса.

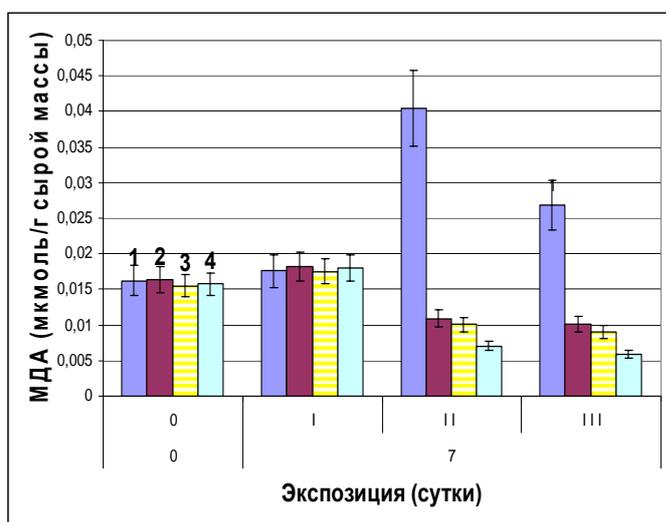


Рис. 10. Накопление МДА в листьях трансгенных и нетрансформированных растений рапса после воздействия отрицательной температуры I – растения при 24°C ; II – растения, подвергнутые замораживанию при -6°C без предварительной холодной адаптации при 4°C ; III – растения, подвергнутые замораживанию при -6°C после предварительной холодной адаптации; 1 – нетрансформированные растения; 2 – трансгенные растения линии Вп-1; 3- трансгенные растения линии Вп-2; 4 - трансгенные растения линии Вп-3

5.2. Аккумуляция растворимых сахаров и пролина трансгенными растениями рапса при воздействии отрицательной температуры

Сравниваемые линии трансгенных и нетрансформированных растений рапса различались по содержанию растворимых сахаров после воздействия температуры -6°C (2 сут), несмотря на то, что в оптимальных условиях они имели примерно одинаковый уровень (рис. 11 а,б,в,г). Причем, у всех адаптированных к $+4^{\circ}\text{C}$ линий растений, содержание растворимых сахаров было выше, чем у неадаптированных.

Интересно, что количество сахарозы почти не изменялось у нетрансформированных растений и у растений линии Вп-1 со слабой интенсивностью экспрессии гена *Osmyb4*, а содержание фруктозы и глюкозы у подвергнутых холодной адаптации растений возрастало более чем в 2 раза. При

этом следует отметить, что абсолютные значения содержания сахаров в трансгенных растениях линии Вп-1 были в 1,5 раза ниже, чем у нетрансформированных растений (рис. 11а и рис. 11б).

Накопление сахаров в растениях 2-х других групп после воздействия отрицательной температуры несколько отличалось. У растений линии Вп-2, прошедших холодovou адаптацию, было почти в 2 раза больше сахарозы, чем у растений линии Вп-3 (рис. 11в и рис. 11г). В свою очередь у растений линии Вп-3, адаптированных к +4°C, содержание фруктозы было в 1,4 раза выше, чем у неадаптированных растений. Содержание глюкозы в растениях обеих линий резко падало после воздействия отрицательной температуры.

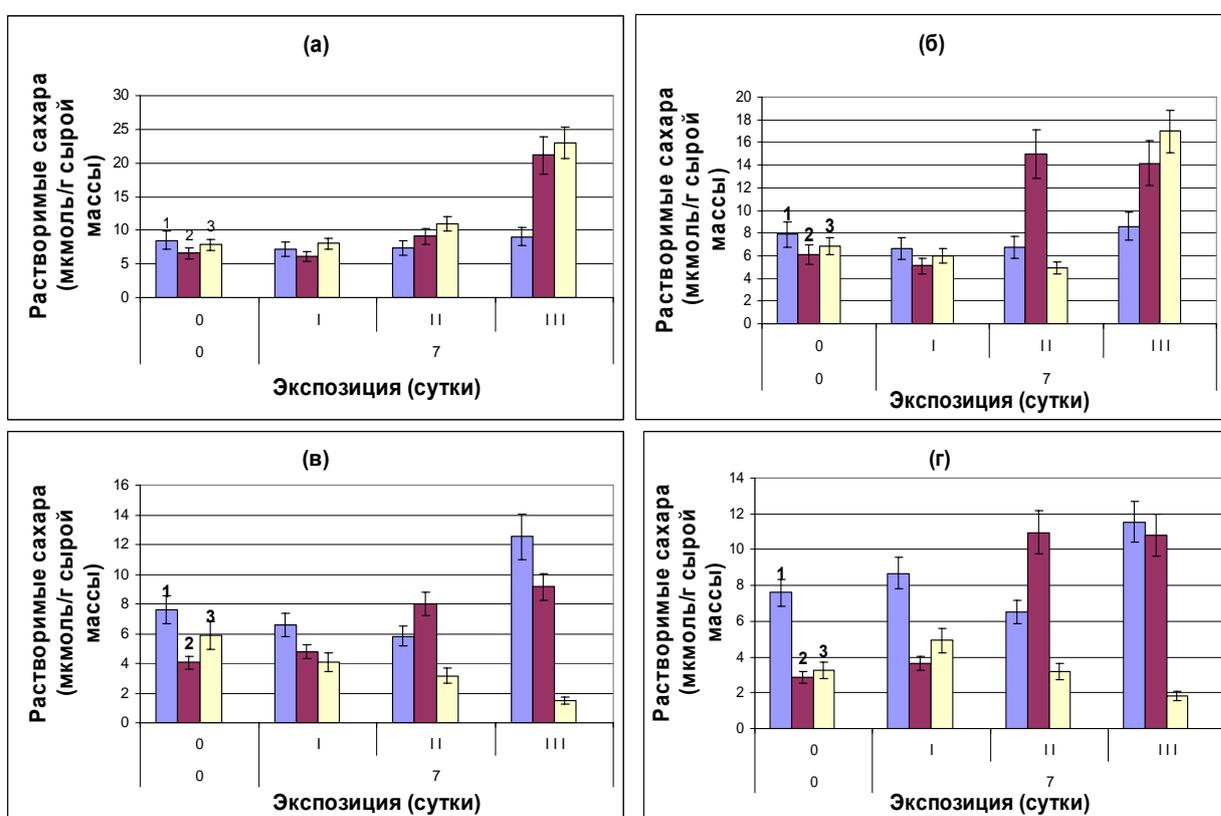


Рис. 11. Накопление растворимых сахаров в листьях трансгенных и нетрансформированных растений рапса.

Обозначения: **1 – сахароза; 2 – фруктоза; 3- глюкоза;**

I – растения при 24°C; II – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C без предварительной холодной адаптации; III – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C после предварительной холодной адаптации;

а) сахара в нетрансформированных растениях; б) сахара в трансгенных растениях линии Вп-1; в) сахара в трансгенных растениях линии Вп-2; г) сахара в трансгенных растениях линии Вп-3; I – растения при 24°C; II – растения при 4°C

Накопление пролина в листьях растений после воздействия отрицательной температуры происходило точно так же, как и в опытах по адаптации растений к

4°C (рис. 12). У нетрансформированных растений содержание пролина увеличивалось примерно в 2 раза, тогда как у трансгенных растений всех трех линий его содержание возрастало значительно интенсивнее. Это касалось как растений, прошедших предварительную холодовую адаптацию, так и неадаптированных. Абсолютные значения содержания пролина зависели от интенсивности экспрессии гена *Osmyb4*: чем интенсивнее экспрессировался трансген, тем больше накапливалось пролина. При этом увеличение содержания пролина было значительнее у растений, прошедших холодовую адаптацию.

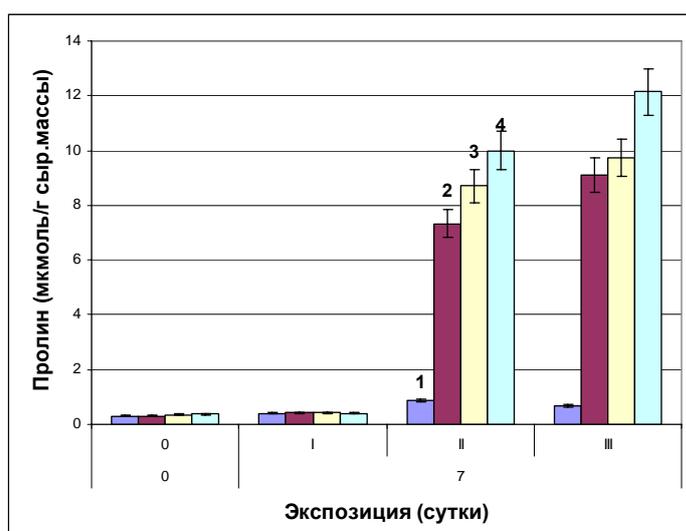


Рис. 12. Накопление свободного пролина в листьях растений рапса. I – растения при 24°C; II – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C без предварительной холодовой адаптации; III – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C после холодовой адаптации; 1 - нетрансформированные растения; 2 - трансгенные растения линии Vn-1; 3 - трансгенные растения линии Vn-2; 4 - трансгенные растения линии Vn-3

5.3. Аккумуляция общих фенолов и антоцианов

Данные, представленные на рис. 13а и 13б, подтверждают результаты, полученные нами ранее по накоплению общих фенолов и антоцианов в процессе адаптации растений рапса к 4°C (рис. 7 и рис. 8). Конститутивные уровни как общих фенолов (рис. 13а), так и антоцианов (рис. 13б) у всех линий растений были одинаковы при температуре 24°C. Понижение температуры вызывало повышение уровня накопления этих соединений; абсолютное значение которых зависело от специфики линии и характера температурной обработки. В нетрансформированных растениях накопление как общих фенолов (рис. 13а), так и антоцианов было незначительным. Похожие результаты были и при изучении накопления антоцианов (рис. 14б).

В трансгенных растениях рапса уровень накопления фенолов и антоцианов условиях холодовой обработки зависел от интенсивности экспрессии гена *Osmyb4*. Так, если в неадаптированных и адаптированных растениях линии Vn-1 содержание общих фенолов увеличивалось в 1,5 и в 2,1 раза, а антоцианов - в 2,5 и

2,7 раза, соответственно, то в растениях линий с большей интенсивностью экспрессии трансгена накопление фенолов и антоцианов было значительно выше. Растения линии Вп-3, неадаптированные к 4°C, накапливали в 3 раза больше общих фенолов и в 5.5 раза больше антоцианов по сравнению нетрансформированными растениями, тогда как аккумуляция этих соединений в растениях, прошедших холодовую адаптацию, возрастала в 4 (рис. 13а) и в 7,4 раза (рис. 13б) соответственно.

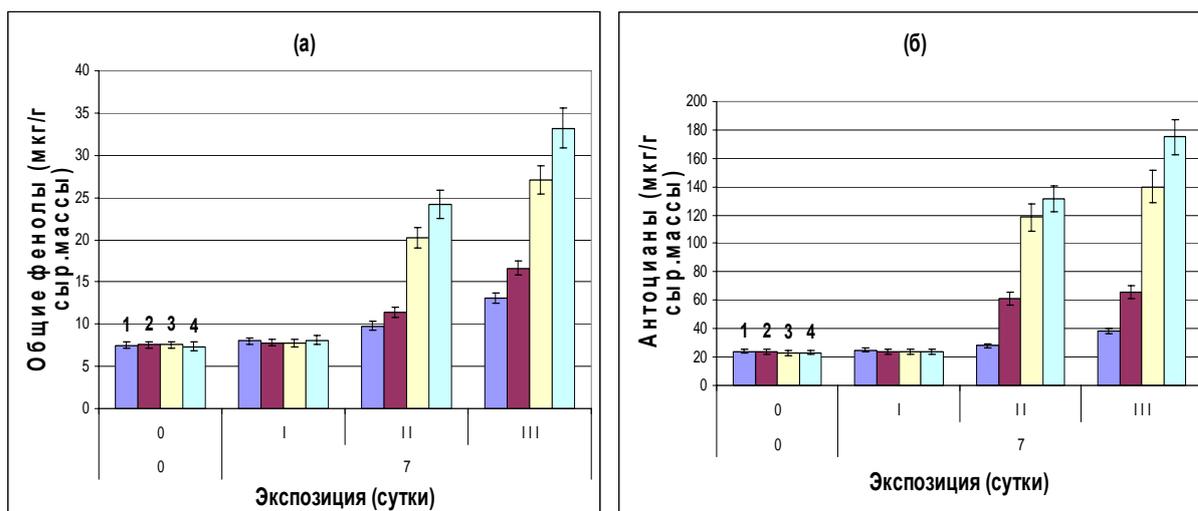


Рис. 13. Накопление общих фенолов (а) и антоцианов (б) в листьях трансгенных и нетрансформированных растений риса

I – растения при 24°C; II – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C без предварительной холодной адаптации при 4°C; III – растения, подвергнутые замораживанию при –6°C после предварительной холодной адаптации.

1 - нетрансформированные растения; 2 - трансгенные растения линии Вп-1;

3 - трансгенные растения линии Вп-2; 4 - трансгенные растения линии Вп-3

Представленные выше данные однозначно свидетельствуют о том, что способность трансгенных растений риса, подвергнутых действию отрицательной температуры, аккумулировать пролин, растворимые фенолы и антоцианы в процессе адаптации к холоду зависит от интенсивности экспрессии трансгена *Osmyb4* риса. Однако этого нельзя сказать о динамике содержания растворимых сахаров (рис. 11) и, тем более, об активности антиоксидантных ферментов (данные не приведены). Если принять во внимание тот факт, что трансгенные растения риса с суперэкспрессией гена *Osmyb4*, предварительно адаптированные к 4°C, сохраняли, в отличие от нетрансгенных растений, свою жизнеспособность после жесткого низкотемпературного воздействия (–6°C, 2 сут), то вклад пролина,

растворимых фенолов и антоцианов в повышение устойчивости представляется достаточно убедительным.

Заключение

На основании полученных в работе экспериментальных результатов можно сделать заключение, что трансформация растений рапса геном *Osmyb4* приводит к снижению способности полученных трансгенных линий накапливать растворимые сахара при гипотермии. Снижение способности этих растений накапливать сахара при низкой температуре компенсируется их способностью интенсивно накапливать пролин, который, подобно сахарам, обладает осморегуляторным и множественным стресс-протекторным действием (Кузнецов, Шевякова, 1999). Содержание пролина в процессе холодовой адаптации трансгенных растений возрастало в 20 – 30 раз (рис. 6 и 12).

Вполне вероятно, что снижение способности трансгенных растений рапса, экспрессирующих *Osmyb4* ген риса, накапливать растворимые сахара с антиоксидантными свойствами может сопровождаться стимуляцией биосинтеза вторичных метаболитов, обладающих, например, антиоксидантными свойствами (Michalak, 2006; Chalker-Scott, 1999). В пользу этого свидетельствует тот факт, что трансгенные растения рапса при температуре 4°C испытывали значительно меньший окислительный стресс, чем растения дикого типа (рис. 4 и рис. 10).

Проверка этого предположения показала, что в процессе адаптации к низкотемпературному стрессу растения рапса с гетерологической суперэкспрессией *Osmyb4* гена обнаруживают способность к интенсивной аккумуляции общих фенолов и флавоноидов (рис. 7а, б; рис. 13а), а также антоцианов (рис. 8, 13б), обладающих мощным антиоксидантным эффектом (Michalak, 2006; Chalker-Scott, 1999). Причем, растения линий Vn-2 и Vn-3, обладающие более интенсивной экспрессией гена *Osmyb4*, в отличие от линии Vn-1, обнаруживали повышенную способность к аккумуляции фенольных соединений и антоцианов в условиях гипотермии (рис. 7, 8 и 13), что достаточно прямо указывает на возможную связь между интенсивностью экспрессии гена *Osmyb4* транс-фактора риса с проявлением его биологической активности. Все эти закономерности проявляются не только в процессе низкотемпературной холодовой адаптации растений, но и в стрессорном ответе нетрансформированных и трансгенных растений на действие отрицательной температуры.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что гетерологическая экспрессия *Osmyb4* гена риса в растениях рапса сопровождается повышением их устойчивости к действию низких положительных и отрицательных температур. В основе этого явления лежит способность транскрипционного фактора OSMYB4 стимулировать аккумуляцию совместимых осмолитов, прежде всего, пролина, а также антиоксидантных соединений фенольной природы и антоцианов. Это подтверждает идею, согласно которой продукт *Osmyb4* гена играет особую интегрирующую роль в стрессорном ответе растений на повреждающее воздействие, координируя экспрессию многих генов различных метаболических путей, следствием чего является формирование защитных механизмов и повышение стресс-толерантности.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в процессе генеративного размножения растений рапса с гетерологической суперэкспрессией гена *Osmyb4* транс-фактора риса трансген наследуется и экспрессируется.
2. Представлены экспериментальные доказательства того, что полученные трансгенные растения рапса обладают повышенной устойчивостью к низким положительным и отрицательным температурам, о чем свидетельствует: (а) более активное, по сравнению с растениями дикого типа, накопление биомассы при +4°C; (б) сохранение трансгенными растениями, в отличие от нетрансформированных растений, жизнеспособности после 2-х суток экспозиции при -6°C; (в) меньший окислительный стресс, который испытывают трансгенные растения при +4°C по сравнению с формами дикого типа, и, наконец, (г) способность поддерживать водный статус при гипотермии.
3. Впервые продемонстрировано, что суперэкспрессия гена транс-факторного белка риса в растениях рапса в процессе холодной адаптации сопровождается интенсивной аккумуляцией общих фенолов и флавоноидов; что, очевидно, лежит в основе снижения уровня МДА в условиях низкотемпературного стресса и повышения холодоустойчивости.
4. Показано, что при низкой положительной температуре трансгенные растения рапса накапливают пролина в 20-30 раз больше, чем нетрансформированные растения. При этом, в отличие от ранее исследованных трансгенных растений

арабидопсиса, яблони и томатов с геном *Osmyb4*, в условиях гипотермии содержание растворимых сахаров в трансгенных растениях рапса было ниже по сравнению с растениями дикого типа.

5. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интенсивная гетерологическая экспрессия гена *Osmyb4* в растениях рапса сопровождается не только интенсивной аккумуляцией совместимых осмолитов, но и биосинтезом антиоксидантных соединений фенольной природы. Отсюда следует, что в условиях низкотемпературного стресса транскрипционный фактор *OSMYB4* регулирует гены различных метаболических путей, интегрируя тем самым защитные системы организма, которые лежат в основе повышения холодоустойчивости растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **А. Гомаа**, Н.В. Радионов, Г.Н. Ралдугина. Наследование генов *nptII* и *Osmyb4*, встроенных в растения рапса (*Brassica napus* L.). // Тезисы докладов Международной научной конференции "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера". Апатиты, Мурманская обл. 2009. С.97.

2. **Гомаа А.**, Радионов Н.В., Ралдугина Г.Н. Действие пониженных температур на трансгенные растения рапса (*Brassica napus* L.), содержащих ген трансфакторного белка *OSMYB4* // Тезисы докладов X молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва. 2010. С.19.

3. **Гомаа А.**, Бурмистрова Н.А., Радионов Н.В., Ралдугина Г.Н. Влияние низкой положительной температуры на трансгенные растения рапса (*Brassica napus* L.), содержащие ген трансфакторного белка *OSMYB4*. // Тезисы докладов III Всероссийского симпозиума "Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности". Москва. 2010. С.34.

4. **Гомаа А.**, Бурмистрова Н.А., Радионов Н.В., Ралдугина Г.Н. Ответ трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.), содержащих встроенный ген риса *Osmyb4*, на действие пониженной положительной температуры // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума "Растение и стресс". Москва. 2010. С.419.

5. **Goma A.**, Burmistrova N.A., Radionov N.V., Raldugina G.N. The response of transgenic *Brassica napus* plants expressing *Osmyb4* gene from rice (*Oryza sativa*) to low temperature // Proceedings of the VI Moscow International Congress

“Biotechnology: state of the art and prospects of development” (Moscow, March 21 – 25, 2011), Moscow, 2011. P. 236.

6. Бурмистрова Н.А., **Гомаа А.**, Ралдугина Г.Н. Содержание растворимых сахаров и холодоустойчивость растений рапса со встроенным геном *Osmyb4* // Тезисы докладов Международной конференции «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды» (Петрозаводск 20-24 июня 2011 г.). Петрозаводск. 2011 (в печати).

7. Ралдугина Г.Н., **Гомаа А.М.**, Бурмистрова Н.В., Радионов Н.В. Экспрессия гена *Osmyb4*, встроенного в растения рапса (*Brassica napus* L.), увеличивает устойчивость трансгенных растений к охлаждению и замораживанию, Тезисы докладов VII съезда Общества физиологов растений России. Международная конференция «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». (Нижний Новгород, Россия, 4-10 июля, 2011). Нижний Новгород. Россия. 2011 (в печати).

8. Бурмистрова Н.А., **Гомаа А.М.**, Ралдугина Г.Н., Изменение содержания растворимых сахаров и пролина при адаптации к холоду растений рапса (*Brassica napus* L.) со встроенным геном *Osmyb4*. Тезисы докладов VII съезд Общества физиологов растений России. Международная конференция «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». (Нижний Новгород, 4-10 июля 2011), Нижний Новгород, Россия, 2011 (в печати).

9. **Гомаа А.М.** Бурмистрова Н.А., Радионов Н.В., Ралдугина Г.Н. Влияние низкой положительной температуры на трансгенные растения рапса (*Brassica napus* L.) с геном трансфакторного белка *OSMYB4* // Вестник РУДН. 2011. №2. С. 51-60

10. **Гомаа А.М.**, Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Радионов Н.В., Кузнецов Вл.В. Стрессорный ответ трансгенных растений рапса с геном *Osmyb4* трансфакторного белка риса на действие низкой положительной температуры // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 6 (принято к печати).