

ОЦЕНКА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА

***В.С. Камбурова, Ш.Э. Шерматов, И.Б. Салахутдинов, О.С. Чарышникова, Г.Ф. Маматкулова,
Ф.С. Раджабов, Ш.Х. Маматкулова***

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Доля сельскохозяйственных земель, на которые негативно влияет высокая засоленность, увеличивается во всем мире из-за естественных причин и методов ведения сельского хозяйства (Zhang et al., 2014). Эта проблема усугубляется развитием более современных методов ведения сельского хозяйства, таких как ирригация. Приблизительно 20 % обрабатываемых земель в мире и более половины всех орошаемых земель подвержены засолению (Arzani, 2008). В связи с этим проблема создания солеустойчивых сортов и линий сельскохозяйственных культур, включая хлопчатник, является одной из актуальных задач современной селекции.

РНК интерференция (RNAi) позволяет создавать «биотехнологические» сорта сельскохозяйственных культур, включая хлопчатник, путем подавления экспрессии нежелательных генов (Abdurakhmonov et al., 2016). Одним из наиболее успешных примеров коммерциализированных RNAi сортов хлопчатника является создание узбекскими учеными на основе технологии нокаута гена фитохрома A1 (*PHYA1*) биотехнологических сортов хлопчатника серии «Порлок», у которых одновременно улучшено качество волокна, урожайность, раннеспелость, устойчивость к абиотическим стрессам, включая засуху- и солеустойчивость (Abdurakhmonov et al., 2014).

Вместе с тем, необходимо отметить, что в настоящее время все большее внимание уделяется роли активных форм кислорода и антиоксидантной системы в развитии физиологических реакций растений на различные стрессовые воздействия, включая солевой стресс (Колупаев, Карпец, Ястреб, 2017; Lamaoui et al., 2018). При этом многими исследователями установлено наличие взаимной связи между активностью ферментов антиоксидантной системы и степенью устойчивости растений к засолению (Nouman et al., 2018; Saini et al., 2018). Кроме того, известно, что при абиотических стрессах изменяется ряд биохимических параметров листьев хлопчатника, таких как жирнокислотный состав (Zhang et al., 2013), содержание пролина (Zhang et al., 2014), водорастворимых сахаров и крахмала (Peng et al., 2016), и данные параметры также могут быть использованы для отбора стрессоустойчивых сортов при селекции хлопчатника. Вместе с тем, имеются данные о том, что фитохромы могут принимать участие в развитии стрессоустойчивости через систему фитогормонов (Ullah et al., 2018).

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось оценка солеустойчивости ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлок, полученных путем RNAi гена фитохрома A1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили ген-нокаутные и немодифицированные сорта и линии хлопчатника, выращенные в условиях фитотрона.

Для экстракции ферментов навеску замороженных листьев (0,3 г) измельчали в мелкий порошок, используя ступку, помещенную в ледяную баню, и пестик, который предварительно охлаждали жидким азотом, и гомогенизировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ аскорбата и 2 % (в/об) поливинилпирролидона. Затем гомогенаты центрифугировали при 20 000 g в течение 30 минут при 4° С. Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по методу Foster и Hess (1980). Общая активность каталазы (CAT) измерялась в соответствии с методом, описанным Beers и Sizer (1952), с небольшими изменениями. Активность аскорбат пероксидазы (APX) определяли согласно Nakano и Asada (1981). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) (Heath, Packer, 1968).

Содержание растворимых сахаров и крахмала в собранных экстрактах определяли антроновым методом (Seifter et al., 1950). Содержание сахарозы анализировали в ресуспендированном супернатанте в соответствии с ранее описанными протоколами (Hendrix, 1993). Содержание пролина в тканях корня и листьев измеряли по реакции с нингидрином (Bates et al., 1973).

Липиды были метил-этерифицированы 0,4 М раствором КОН, содержащем метанол и смесь равных объемов бензена и петролейного эфира (1:1, об/об), согласно методу Yu, Su (1996). Метилловые эфиры жирных кислот (ЖК) разделялись методом газовой хроматографии на газовом хроматографе (Shimadzu GC-17A или аналогичный), оснащенном водородным пламенным детектором и капиллярной колонкой SP-2330 (15 м × 0.32 мм). Температура колонки изотермическая 165° С, температура детектора – 250° С.

Для определения уровня салициловой кислоты 200 мг навески порошка растертых в жидком азоте листьев хлопчатника дважды экстрагировали 0,75 мл MeOH/H₂O/HOAc=90:9:1 (об.) в течение 1 мин на вибромешалке “Vortex”, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 мин. Экстракты объединяли и упаривали на роторном испарителе, досушивали на лиофильной сушке. Остаток диспергировали в 0,2 мл 0,05 % растворе уксусной кислоты в 15 % водном ацетонитриле на вибромешалке “Vortex”. После центрифугирования супернатант анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu Prominence LC20, включающей 4-х градиентный насос с дегазатором, диодно-матричный детектор и ручной инжектор с петлей на 20 мкл. Колонка – Supelco Discovery HS C18 (4,6×75 мм, 3 мкм), режим элюирования – изократический, подвижная фаза – 25 % водный ацетонитрил, содержащий 0,1 % ортофосфорной кислоты, скорость потока 0,7 мл/мин, детекция – 235 нм/щель 4 нм. Объем пробы 20 мкл.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA). Данные представлены как средняя $\pm$ стандартная ошибка. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в $P \leq 0,05$ считались значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в большинстве сельхозкультур, включая хлопчатник, повышенные уровни активности антиоксидантных ферментов рассматриваются как один из возможных механизмов устойчивости к абиотическим стрессам и могут являться маркерами устойчивых сортов (Hasan et al., 2018). Кроме того, анализ литературы показал, что солевой стресс вызывает активацию ПОЛ, которое часто используется в качестве индикатора вызванного солевым стрессом окислительного повреждения в мембранах (Hernandez et al., 2002). При этом у солеустойчивых растений уровень накопления МДА – конечного продукта окисления мембранных липидов снижен по сравнению с неустойчивыми сортами.

Учитывая эти данные, а также основываясь на данных об устойчивости ген-нокаутных сортов серии Порлок к абиотическим стрессам (Abdurakhmonov et al., 2014), было проведено сравнительное исследование накопления продуктов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы (рис. 1).

Результаты экспериментов показали, что накопление МДА было выше у немодифицированных сортов по сравнению с модифицированными линиями сортами, имеющими в геноме конструкцию с вектором к гену *PHYA1* (рис. 1, А). При этом наибольшее накопление продуктов ПОЛ наблюдалось у линий Кокер-312, а наименьшее у ген-нокаутной линии T₁₋₇.

Далее была исследована сравнительная активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и аскорбатпероксидаза (APX) у RNAi сортов хлопчатника (рис. 1, B-D). При этом активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT и APX) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе (активность ферментов в листьях ген-нокаутных линий и сортов была достоверно выше по сравнению с контрольным генотипом Кокер-312). При этом способность поддерживать более высокую активность этих антиоксидантных ферментов приводило к более низкому уровню ПОЛ, более высокой стабильности мембран и, следовательно, более высокой засухо- и солеустойчивости сортов серии Порлок. Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными об активности ферментов системы антиоксидантной защиты хлопчатника при солевом стрессе (Abdurakhmonov et al., 2014).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что система антиоксидантной защиты ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника с векторной конструкцией к гену фитохрома A1 имеет большую активность по сравнению с исходными и родительскими сортами и позволяют заключить о большей устойчивости модифицированных сортов к абиотическим стрессам.

Из литературных данных известно, что при абиотических стрессах изменяется ряд биохимических параметров листьев хлопчатника, таких как жирнокислотный состав (Zhang et al., 2013), содержание пролина (Zhang et al., 2014), водорастворимых сахаров и крахмала (Peng et al., 2016), содержания салициловой кислоты (Rajeshwari, Bhuvaneswari, 2017) и данные параметры также могут быть использованы для отбора стрессоустойчивых сортов при селекции хлопчатника. В связи с этим, было проведено сравнительное исследование биохимического состава листьев ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника (рис. 2).

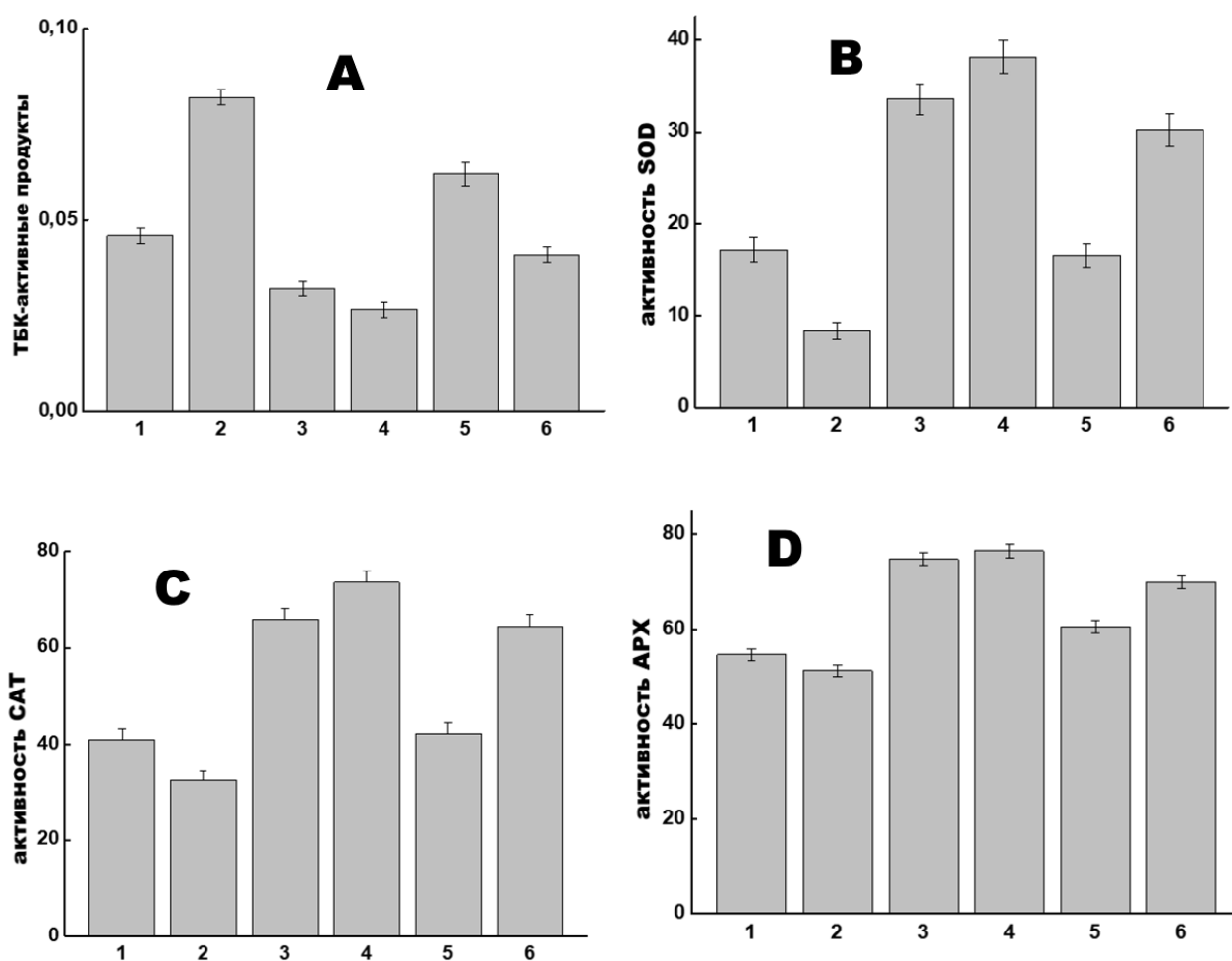


Рис. 1. Оценка активности антиоксидантной системы у модифицированных и немодифицированных сортов и линий хлопчатника. А – содержание МДА, В – активность супероксиддисмутазы, С – активность каталазы, Д – активность аскорбатпероксидазы. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31–10, 4 – Т 1–7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4); по оси ординат – накопление ТБК-активных продуктов, в μмоль МДА/мг сырого веса (А) или активность ферментов, в единицах активности /мг белка (В). $p \leq 0,01$

Первоначально было исследовано содержание и состав фосфолипидов, с которым тесно связана стабильность мембран как в нормальных условиях, так и при стрессе. Согласно полученным результатам, жирнокислотный (ЖК) состав разных генотипов хлопчатника различается (рис. 2, А). Основными ЖК во всех исследованных образцах были пальмитиновая кислота (16: 0), стеариновая (18: 0), олеиновая (18: 1), линолевая (18: 2) и линоленовая (18: 3). На эти пять ЖК приходится более 95 % общего содержания ЖК в функциональных листьях хлопчатника. При этом ЖК состав у ген-нокаутных линий и сортов содержал более высокую долю ненасыщенных ЖК (UFA) и более низкую долю насыщенных ЖК (SFA) по сравнению с таковой у контрольного немодифицированного генотипа Кокер-312.

Далее было изучено влияние инсерции векторной конструкции на содержание свободного пролина в листьях различных сортов хлопчатника. Как видно из рис. 2, В, содержание пролина в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению. При этом наименьшее количество пролина наблюдалось у немодифицированной исходной линии Кокер-312, а наибольшее – у RNAi линии T₁₋₇.

Наряду с этим, было исследовано содержание углеводов у различных генотипов хлопчатника. Как видно из рис. 2, С, содержание растворимых сахаров, сахарозы, крахмала и отношение сахарозы / крахмал в стеблевых листьях различается в зависимости от исследуемого генотипа и зависит от наличия векторной конструкции.

При этом у RNAi линий и сортов хлопчатника отмечается более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахара / крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным линиям Кокер-312 (рис. 2, С). Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными о содержании сахаров у различных генотипов хлопчатника в условиях солевого стресса.

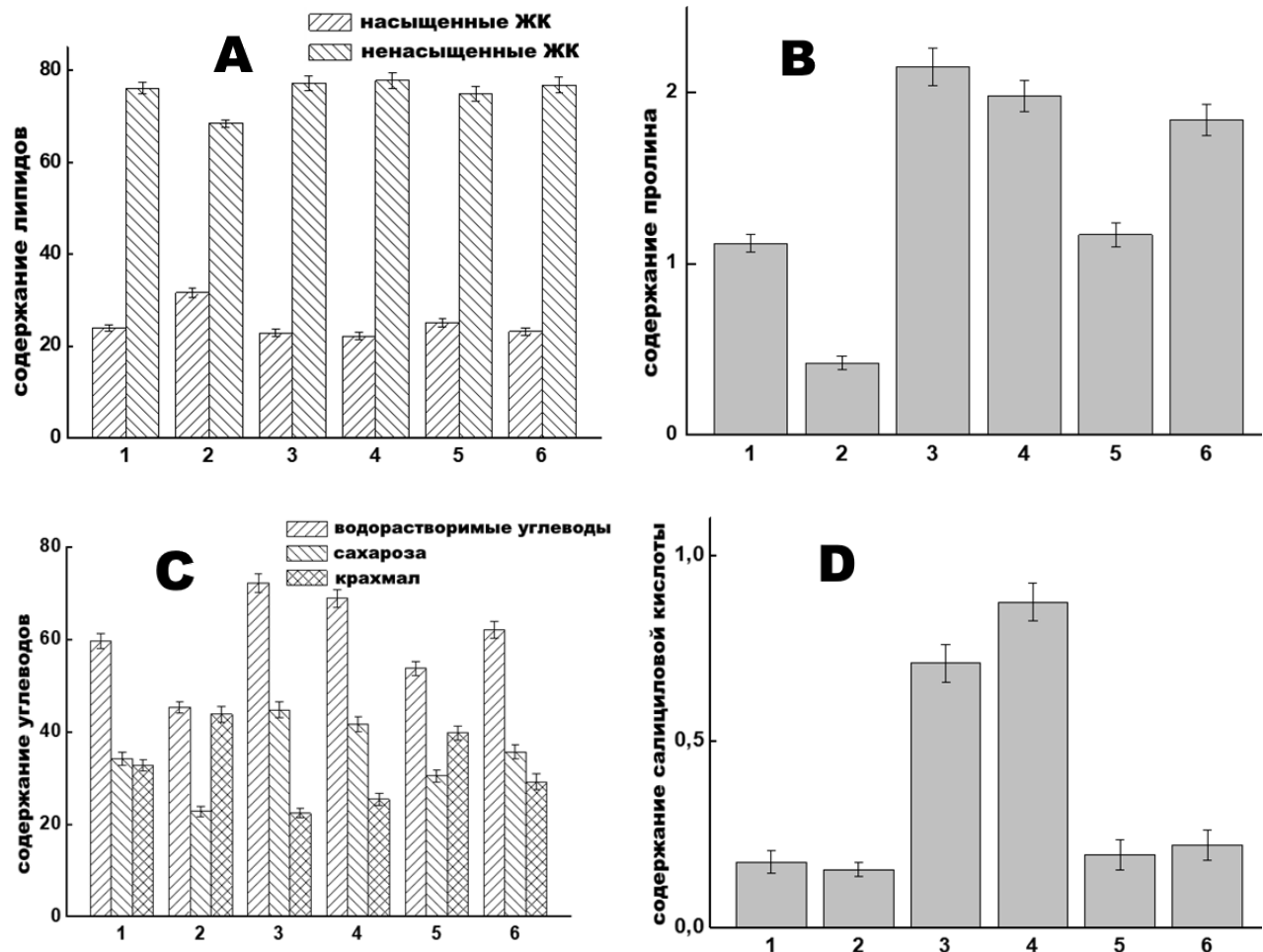


Рис. 2. Влияние инсерции RNAi конструкции к гену фитохрома A1 на биохимические параметры листьев хлопчатника. А – содержание липидов, В – содержание пролина, С – содержание углеводов, Д – содержание салициловой кислоты. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4); по оси ординат – содержание липидов (А), в процентах, содержание пролина, в мкг / г сухого веса (В), содержание углеводов, в мг / г сухого веса (С), содержание салициловой кислоты, в мкг / г веса (Д). $p \leq 0,01$

Также нами было изучено влияние инсерции RNAi конструкции к гену фитохрома A1 на содержание салициловой кислоты, которая является важной сигнальной молекулой для модуляции реакции растений на стресс (Rajeshwari, Bhuvaneshwari, 2017). Результаты исследования показали, что содержание салицилата в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению (рис. 2, D). При этом наименьшее количество салициловой кислоты наблюдалось у немодифицированной исходной линии Кокер-312, а наибольшее – у RNAi линии T₁₋₇.

Фенотипическая устойчивость ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника серии Порлок к абиотическим стрессам подтверждена молекулярными исследованиями. У данных линий и сортов наблюдалась более высокая активность антиоксидантных ферментов, более высокое содержание свободного пролина и салициловой кислоты, более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахара / крахмал по сравнению с немодифицированной контрольной линией Кокер-312.

ЛИТЕРАТУРА

- Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. Nat Comm. 5: 3062.
- Abdurakhmonov I. Yu., et al. 2016. RNA interference for functional genomics and improvement of cotton (*Gossypium* spp.). Frontiers in Plant Science. 7: 202.
- Arzani A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. In Vitro Cell Dev Biol Anim 44: 373–383.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205–207.
- Beers R.F., Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 195: 133–140.
- Foster J.G., Hess J.L. 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. Plant Physiol 66: 482–487.
- Hasan M.M., et al. 2018. Molecular and Physio-Biochemical Characterization of Cotton Species for Assessing Drought Stress Tolerance. Int. J. Mol. Sci. 19: 2636.
- Heath R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in Isolate Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189–198.
- Hendrix D.L. 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. Crop Sci 33(6): 1306–1311.
- Hernandez J.A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses // Plant Cell Environ., V. 23, 2002, P. 853–862.
- Lamaoui M. et al. 2018. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. Frontiers in Chemistry. 6: 26.
- Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. PCPhy 22(5): 867–880.
- Nouman W., et al. 2018. Variation in Plant Bioactive Compounds and Antioxidant Activities Under Salt Stress. In Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 77–102.
- Peng J., et al. 2016. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. PLoS ONE. 11 (5): e0156241.
- Rajeshwari V., Bhuvaneshwari V. 2017. Salicylic Acid Induced Salt Stress Tolerance in Plants. Int J Plant Biol Res 5(3): 1067.
- Saini P., et al. 2018. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. In Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective, eds. Zargar S.M., Zargar M.Y.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 127–154.
- Seifter S., et al. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch. Biochem 25(1): 191–200.
- Ullah A., et al. 2017. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. Plant Biotechnology Journal. 15: 271–284.
- Yu H.G., Su W.A. 1996. Studies on relationship between fatty acids desaturation of PSII membrane and low temperature photoinhibition of cucumber. Acta Biochimica Biophysica Sinica 12: 227–233.
- Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. J Plant Res. 126: 293–304.
- Zhang X., et al. 2014. Genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase gene family in *Gossypium raimondii* and the function of their corresponding orthologs in tetraploid cultivated cotton. BMC Plant Biol. 14: 345.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. 2017. Функционирование антиоксидантной системы растений при солевом стрессе. Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія. 42: 23–45.