

УДК 581.132

**ВМІСТ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦИКОРІЮ
З ГЕНОМ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО АНТИГЕНА ESAT6**

Н. А. Матвеева, О. Ю. Кваско

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ

Вивчено особливості вмісту пігментів фотосинтетичного комплексу у трансгенних рослин *Cichorium intybus* var. *foliosum* з геном *esxA*, що кодує синтез туберкульозного антигена ESAT6. Показано, що вміст хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів у трансгенних рослин через 30 діб росту в культурі *in vitro* є вищим відповідно до 2,16, 3,76 та 1,7 разів, ніж у контрольних рослин, співвідношення хлорофілів *a/b* зменшується, а відношення суми хлорофілів до каротиноїдів збільшується у порівнянні з аналогічними показниками вихідних рослин.

Ключові слова: фотосинтетичні пігменти, трансгенні рослини, хлорофіли *a* та *b*, каротиноїди.

Вступ. Протягом останніх 30 років розроблено методи трансформації ядерного та хлоропластного геномів і коло видів трансформованих рослин дуже широке. Генетична трансформація рослин здійснюється як з суто науковою метою (наприклад, дослідження функціонування генів), так і з метою створення рослин, що синтезують певні сполуки та можуть бути використані в селекції, промисловості, медицині. Однак, досі комплексно та системно не вивчалися характеристики трансформованих рослин у порівнянні з вихідними. Разом з тим, становить інтерес вивчення того, чи впливає трансгенез – перенесення чужорідного гена – на морфологічні, біохімічні, фізіологічні параметри трансформованих рослин та з'ясування того, чи є відмінності, зокрема, у прирості біомаси, рості кореневої системи, синтезі пігментів, активності ферментів, накопиченні білку, вторинних метаболітів та ін.

Пігменти вищих рослин, хлорофіли та каротиноїди, забезпечують протікання в клітинах світлових реакцій фотосинтезу. За участі пігментів енергія кванту світла трансформується в макроергічні сполуки, які далі використовуються для синтезу в рослині органічних сполук. Вміст фотосинтетичних пігментів, динаміка їх зміни протягом вегетативного періоду є одним з показників фізіологічного стану рослин, характеристикою фотосинтетичної здатності та продукційного процесу сільськогосподарських культур.

Основними фотосинтезуючими пігментами вищих рослин є хлорофіли *a* та *b*, що являють собою Mg-вмісні порфірини. Основна їх частина включена до складу світлозбираючих комплексів, забезпечує поглинання та передачу світлової енергії до реакційних центрів, в яких відбуваються фотосинтетичні реакції. Жовті пігменти – каротиноїди – відіграють роль світлозбирання та виконують функцію захисту фотосинтетичного апарату від фотопошкодження [1].

Вміст хлорофілів у різних рослин коливається в межах 0,7-1,1 г на 1 кг зеленої маси рослин, а співвідношення хлорофілів *a* та *b* зазвичай становить близько 3:1. Вміст хлорофілів та їх співвідношення залежать від ряду факторів – рівня освітленості, температури, наявності добрив, дії токсичних сполук (наприклад, важких металів), зараженості патогенами тощо та є одним з показників фізіологічного стану і адаптивних можливостей рослин.

Відомо, що кількість хлорофілу залежить від освітленості рослин [2, 3]. При темній обробці рослин вміст хлорофілу зменшується [4, 5], а зелене та синє світло збільшує вміст хлорофілу [6].

Стресові абіогенні фактори, такі як дефіцит вологи, засоленість ґрунту, наявність токсичних металів також впливають на вміст пігментів рослин, як хлорофілів, так і каротиноїдів. Так, при наявності токсичних металів (кадмію, міді, нікелю, кобальту, цинку) кількість хлорофілу зменшується [7-11]. Зменшення вмісту води супроводжується зменшенням вмісту хлорофілів *a* та *b*, а збільшення кількості хлорофілів призводить до збільшення здатності рослин утримувати вологу [12]. Вміст хлорофілу також залежить від складу ґрунту, концентрації в ньому деяких хімічних сполук та елементів (наприклад, вмісту магнію) [13].

Стресові фактори впливають не тільки на загальний вміст пігментів фотосинтетичного комплексу, але й на їх співвідношення. Співвідношення хлорофілів *a/b* та суми хлорофілів (*a+b*) до каротиноїдів характеризує здатність рослин пристосовуватися до різних умов (наприклад, до зміни інтенсивності освітлення, зволоження, дії токсичних сполук). Так, при дії нікелю в рослинах кукурудзи співвідношення *a/b* зростало на початку обробки металом (до 8 діб) та зменшувалося при тривалій обробці (більше 13 діб) [9]. При тривалій дії іонів калію доля хлорофілу *a* та каротиноїдів зменшувалася, в той час як доля хлорофілу *b* збільшувалася. Іони Na^+ та Ca^{2+} справляли аналогічну дію на співвідношення пігментів [14].

Отже, вміст пігментів фотосинтетичного комплексу залежить від низки абіогенних та біогенних факторів і змінюється у стресових для рослин умовах. Перенесення чужорідного гена до геному рослин може розглядатися як стресовий фактор. В культурі *in vitro* синтез пігментів відрізняється від такого у рослин в природних умовах. Разом з тим, становить інтерес дослідити, чи відбуваються індуковані шляхом перенесення гена (генів) зміни кількості хлорофілів і каротиноїдів у трансформованих рослинах та

порівняти вміст фотосинтетичних пігментів при культивуванні трансгенних рослин на середовищах, що відрізняються за наявністю/відсутністю регуляторів росту. В подальшому планується дослідження особливостей синтезу фотосинтетичних пігментів у ти самих рослин в умовах *in vivo*. Представлена робота є частиною досліджень фізіологічних та біохімічних відмінностей трансформованих рослин листового цикорію *Cichorium intybus* var. *foliosum* L. з геном *esxA*, що кодує синтез туберкульозного антигена ESAT6.

Матеріали і методи. Вихідним матеріалом для отримання трансгенних рослин було насіння цикорію сорту Пала росса (агрофірма “Елітсортнасіння”, Україна). Насіння стерилізували протягом 1 хв. у 70% етанолі, 10 хв. у 25% розчині препарату “Білізна” (НПФ “Біолайт”, Україна), промивали дистильованою водою (60 хв.) та пророщували на агаризованому середовищі MS [15] при 16 –годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Трансформацію проводили шляхом інкубування сім’ядоль цикорію у суспензії бактерій *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 з геном *esxA* секреторного білка ESAT6. Після трансформації експланти переносили на агаризоване середовище MS з регуляторами росту (2,5 мг/л кінетину (DUCHEFA Biochemie B.V. The Netherlands) і 0,5 мг/л α-нафтилуксусної кислоти (НУК, DUCHEFA Biochemie B.V. The Netherlands) та антибіотиками (25 мг/л канаміцину (“Київмедпрепарат”, Україна) і 500 мг/л цефотаксиму (“Дарниця”, Україна), а через 1 місяць – на середовище MS з 0,5 мг/л кінетину, 0,05 мг/л НУК, 25 мг/л канаміцину і 500 мг/л цефотаксиму для селекції зелених трансгенних рослин. Регенеровані рослини укорінювали на середовищі MS з антибіотиками в тих же концентраціях. Для досліджень рослини розмножували шляхом відділення бокових пагонів та вирощували на середовищах MS та MS з 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК).

Вміст пігментів визначали у 30-денних рослин спектрофотометричним методом, екстракцію пігментів проводили ацетоном [16]. Подрібнену наважку (0,5 г) розтирали в ступці, переносили на фільтр Шота (загальний об’єм розчинника 10 мл) та фільтрували. Сумарну концентрацію зелених пігментів (C_{a+b}) в екстрактах визначали при довжині хвилі 652 нм та обчислювали за формулою:

$$C_{a+b} = 29 D_{652} \text{ (мг/л)}$$

Концентрацію хлорофілів *a* (C_a) і *b* (C_b) визначали при довжині хвиль 665 і 649 нм і розраховували за формулами:

$$C_a = 11,63 D_{665} - 2,39 D_{649} \text{ (мг/л);}$$

$$C_b = 20,11 D_{649} - 5,18 D_{665} \text{ (мг/л).}$$

Концентрацію каротиноїдів ($C_{к+кс}$) визначали при довжині хвилі 440 нм за формулою:

$$C_{к+кс} = 4,695 D_{440} - 0,268 C_{a+b} \text{ (мг/л).}$$

Вміст пігментів розраховували відповідно їх концентрації у розчині та масі вихідного матеріалу у мг/г маси листків. Контролем слугували нетрансформовані рослини того ж сорту, що вирощувалися *in vitro* в аналогічних умовах (склад живильного середовища, освітлення, температура). Статистичну обробку проводили за допомогою програми EXEL (0,05).

Результати та їх обговорення. Нами досліджено особливості вмісту хлорофілу у трансгенних рослинах цикорію, що містили ген *esxA* туберкульозного антигена ESAT 6 у порівнянні з нетрансформованими рослинами. Через 30 днів вміст хлорофілу *a* при вирощуванні на середовищі MS у трансформованих рослинах виявився вищим у 1,7-2,16 рази ніж у контрольних рослинах, що вирощувалися в тих же умовах (рис.1, а). Схожа картина спостерігалася і для хлорофілу *b* – вміст його у трансгенних рослинах був вищий у 2,38-3,76 рази у порівнянні з контрольними (рис. 1, б).

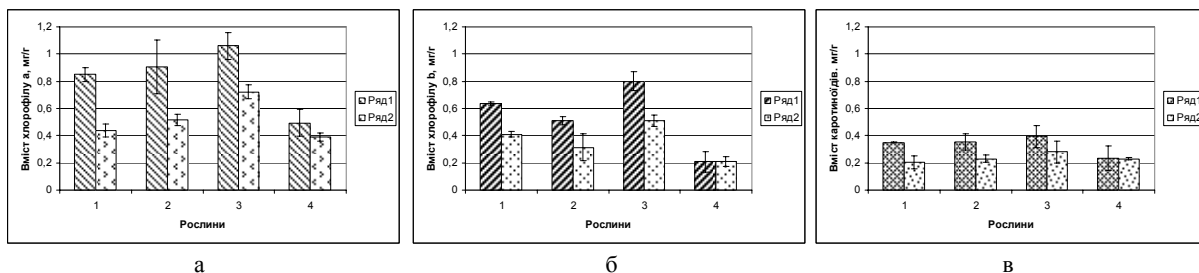


Рис. 1 – Вміст хлорофілів *a* (а), *b* (б) і каротиноїдів (в) у трансгенних (1-3) та контрольних (4) рослинах на середовищах MS (ряд 1) і MS+0,5 мг/л ІМК (ряд 2)

Різниця у вмісті каротиноїдів між трансгенними та контрольними рослинами виявилася меншою, ніж різниця у вмісті хлорофілів. Так, на середовищі MS у трансгенних рослин концентрація каротиноїдів була вищою лише у 1,5-1,7 рази. Каротиноїди слугують захистом фотосинтетичного апарату від стресових факторів та поліпшують адаптаційні характеристики рослин. Отже, збільшення кількості каротиноїдів у 30-денних трансформованих рослинах може свідчити про більшу адаптаційну здатність цих рослин у порівнянні з вихідними.

Індолілмасляна кислота є регулятором росту, додавання якого до живильного середовища призводить до більш швидкого росту кореневої системи у порівнянні з наземною частиною рослин. При куль-

тивуванні рослин цикорію на середовищі, що містило ІМК, показники вмісту хлорофілів та відмінності між трансгенними та нетрансформованими рослинами були меншими, ніж на середовищі без ІМК. Так, вміст хлорофілів *a* та *b* у трансгенних рослинах був вищим відповідно у 1,07-1,8 та 1,5-2,5 рази у порівнянні з контрольними.

Індолилмасляна кислота є регулятором росту, додавання якого до живильного середовища призводить до більш швидкого росту кореневої системи у порівнянні з наземною частиною рослин. При культивуванні рослин цикорію на середовищі, що містило ІМК, показники вмісту хлорофілів та відмінності між трансгенними та нетрансформованими рослинами були меншими, ніж на середовищі без ІМК. Так, вміст хлорофілів *a* та *b* у трансгенних рослинах був вищим відповідно у 1,07-1,8 та 1,5-2,5 рази у порівнянні з контрольними.

Вміст каротиноїдів у трансгенних рослин цикорію на середовищі з ІМК виявився меншим, ніж на середовищі MS – відповідно 0,021-0,028 та 0,035-0,039 мг/г сирової маси. Достовірних відмінностей вмісту каротиноїдів у трансгенних та контрольних рослин при культивуванні на цьому середовищі не виявлено.

Відмінності у вмісті хлорофілів та каротиноїдів при вирощуванні трансгенних рослин цикорію на середовищах MS та MS+ІМК свідчать про те, що трансформовані рослини є більш чутливими до наявності регулятора росту (ІМК), адже при культивуванні контрольних рослин на досліджуваних середовищах достовірних відмінностей у вмісті фотосинтезуючих пігментів не виявлено.

Співвідношення *a/b* та $(a+b)/\text{каротиноїди}$ зазвичай в нормі є стабільним, але реагує на вплив екстремальних факторів: співвідношення *a/b* зменшується при несприятливих умовах, а відношення вмісту хлорофілів до каротиноїдів збільшується. За літературними даними, відношення *a/b* у нормально розвинутих рослин становить 2,5–3 [17].

В наших експериментах співвідношення хлорофілів *a/b* через 30 діб росту на середовищі MS коливалося у трансформованих рослин від 1,35 до 1,8, в той час як у контрольних дорівнювало 2,4 (рис. 2, а). Відношення вмісту хлорофілів до вмісту каротиноїдів у трансформованих рослин становило 4-4,7, а у контрольних було нижчим –3 (рис. 2). Співвідношення хлорофілів *a/b* на середовищі з ІМК у трансформованих рослин становило 1,05-1,64, у контрольних –1,85, а відношення хлорофілів до каротиноїдів – відповідно 3,6-4,39 та 2,61 (рис.2, б).

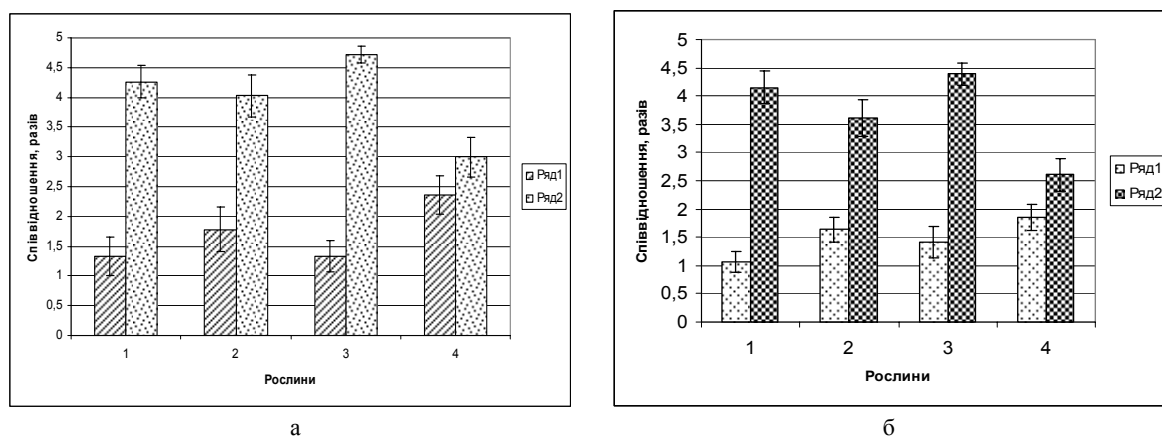


Рис.2 – Відношення вмісту хлорофілів *a/b* (ряд 1) та суми хлорофілів до каротиноїдів (ряд 2) у трансгенних (1-3) та контрольних рослин (4) на середовищі MS (а) та MS+ІМК (б)

Таким чином, додавання ІМК до живильного середовища дещо зменшувало співвідношення *a/b* та хлорофілів до каротиноїдів, причому такий ефект спостерігався як у трансгенних, так і у контрольних рослин.

Відомо, що найбільша ефективність фотосинтетичного апарату забезпечується за таким співвідношенням пігментів: хлорофілів *a* - близько 50%, *b* – 30%, каротиноїдів – 20 %, оскільки основну функцію у складі світлозбирального комплексу виконує хлорофіл *a*, а хлорофіл *b* та каротиноїди є додатковими та захисними пігментами.

За відсотковим вмістом хлорофілу *a* трансформовані рослини цикорію практично не відрізнялися від контрольних, причому це не залежало від складу живильного середовища. Разом з тим, доля хлорофілу *b* у загальному вмісті фотосинтетичних пігментів трансгенних рослин була більша, а каротиноїдів менша, ніж у нетрансформованих рослин.

Отже, у 30-денних трансгенних рослин цикорію, як на середовищі MS, так і в присутності ІМК, зменшено співвідношення хлорофілів *a/b* і підвищено вміст хлорофілів *a* та *b* у порівнянні з контрольними. Наведені результати можуть свідчити про збільшення розмірів фотосистеми II, більшу тіневитривалість рослин та, можливо, кращі адаптаційні характеристики фотосинтетичного апарату трансгенних рослин у порівнянні з контрольними. Разом з тим, зменшення співвідношення хлорофілів *a/b* та збільшення відношення вмісту хлорофілів до каротиноїдів у трансгенних рослин подібне до реакції рослин на дію

абіогенних стресових факторів. В той же час, не можна однозначно стверджувати, що в даному випадку має місце класична реакція рослин на стрес, адже загальний вміст пігментів (хлорофілів та каротиноїдів) у трансгенних рослин виявився вищим, ніж у контрольних, в той час як при дії стресів зменшується загальний вміст пігментів, у першу чергу хлорофілу *a*.

Висновки. Вивчення особливостей вмісту фотосинтетичних пігментів, хлорофілів та каротиноїдів, у трансгенних рослинах листового цикорію з геном туберкульозного антигену ESAT6 показало достовірні відмінності у кількості хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів при культивуванні на середовищі MS, причому вміст хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів у трансгенних рослинах був більший відповідно у 1,7-2,16, 2,38-3,76 та 1,5-1,7 рази у порівнянні з контрольними. В той же час, на середовищі з ІМК відмічено меншу різницю у вмісті хлорофілів, а достовірні відмінності у вмісті каротиноїдів у трансформованих та контрольних рослинах при вирощуванні у цих умовах відсутні.

Співвідношення хлорофілів *a/b* на середовищі MS у трансформованих рослин було меншим, ніж у контрольних, а відношення вмісту хлорофілів до вмісту каротиноїдів збільшувалося. Це відбувалося за рахунок збільшення відсотку хлорофілу *b* у трансформантів та зменшення відсотку каротиноїдів.

Отримані результати дозволяють припустити, що перенесення чужорідних генів впливає на вміст фотосинтетичних пігментів у трансгенних рослин, призводить до підвищення вмісту як хлорофілів, так і каротиноїдів (MS) або тільки хлорофілів (MS+ІМК). Зміни у вмісті фотосинтетичних пігментів, у тому числі, у співвідношенні хлорофілів *a/b* та суми хлорофілів до каротиноїдів у порівнянні з контролем, збільшення відсотку хлорофілу *b* (з 22% в контролі до 35 % у трансгенних рослин), можливо, є адаптаційною реакцією фотосинтетичного апарату трансгенних рослин до стресового фактору – перенесення чужорідних генів.

РЕЗЮМЕ

Изучены особенности содержания фотосинтетических пигментов в трансгенных растениях цикория с геном *esxA*, кодирующим синтез туберкулезного антигена ESAT6. Показано, что содержание хлорофиллов и каротиноидов у трансгенных растений через 25 суток роста в культуре *in vitro* выше, чем в контрольных растениях, соотношение хлорофиллов *a/b* уменьшается, а отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам увеличено по сравнению с аналогичными показателями исходных нетрансформированных растений.

Ключевые слова: фотосинтетические пигменты, трансгенные растения, хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды.

SUMMARY

The features of maintenance of photosynthetic pigments are studied in transgenic plants of chicory with the gene of *esxA*, encoding the synthesis of tubercular antigen of ESAT6. It is shown that maintenance of chlorophylls and carotenoids at transgenic plants in 25 days of growth in the culture of *in vitro* higher, than in control plants, correlation of chlorophylls *a/b* diminishes, and attitude of sum of chlorophylls toward carotenoids is megascopic as compared to the analogical indexes of the parent untransformed plants.

Keywords: photosynthetic pigments, transgenic plants, chlorophylls *a* and *b*, carotenoids.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Scheer H. Chlorophylls and carotenoids in: Encyclopedia of Biological Chemistry / H. Scheer. – 2004. – P. 430-437.
2. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves / H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, M. Döll, et al. // Photosynthesis Res. – 1981. – Vol. 2, No 2. – P. 115-141.
3. Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll protein levels to high-light and low-light growth conditions / H. K. Lichtenthaler, G. Kuhn, U. Prenzel, et al. // Z. Naturforsch. – 1982. – Vol. 37, No 1. – P. 464-475.
4. Effects of light on the photosynthetic apparatus and a novel type of degradation of the photosystem I peripheral antenna complexes under darkness / J. Y. Yamazaki, Y. Kamimura, K. Nakayama, et al. // J. Photochem. Photobiol. B. – 2000. – Vol. 55, No 1. – P. 37-42.
5. Is light quality involved in the regulation of the photosynthetic apparatus in attached rice leaves? / J. Y. Yamazaki, Y. Kamimura, K. Nakayama, et al. // Photosynth. Res. – 2010. – Vol. 105, No 1. – P. 63-71.
6. Zhang R.H. Effects of shading light quality at seedling stage on the photosynthesis and growth of ginger / R.H. Zhang, K. Xu // Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. – 2008. – V. 19, N 3. – P.499-504.
7. Bajguz A. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide / A. Bajguz // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – Vol. 4, No 2. – P. 362-368.
8. Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) / D. Goel, A.K. Singh, V. Yadav, et al. // Protoplasma. – 2010. – Vol. 1, No 3. – P. 125-128.
9. Drażkiewicz M.. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays* / M. Drażkiewicz, T. Baszyński // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2010. – Vol. 73, No 5. – P. 982-986.
10. Zengin F.K. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings / F.K. Zengin, S. Kirbag // J. Environ. Biol. – 2007. – Vol. 28, No 3. – P. 561-566.
11. Zengin F.K. The effects of Co^{2+} and Zn^{2+} on the contents of protein, abscisic acid, proline and chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings / F.K. Zengin // J. Environ. Biol. – 2006. – Vol. 27, No 2. – P. 441-448.
12. Кушниренко М. Д. Реакция хлоропластов растений различной устойчивости к засухе на водный стресс / М. Д. Кушниренко // Проблемы засухоустойчивости растений. – М.: Наука, 1978. – С. 72-81.

13. Ясар Ф. Действие засоления на антиокислительные защитные системы, перекисное окисление липидов и содержание хлорофилла в листьях фасоли / Ф. Ясар, С.Элиальтиглу, К. Ильдис // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 6. – С. 869-873.
14. Кулагин А. А. Древесные растения и биологическая консервация промышленных загрязнителей / А. А. Кулагин, Ю. А. Шагиева. – М.: Наука, 2005. – 190 с.
15. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15, No 3. – P. 473-496.
16. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин. Практикум. / М. М. Мусієнко. – Київ, 1995. – 191 с.
17. Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1975. – С. 154-170.

Надійшла до редакції 13.05.2010 р.