

ДУБРОВНА О.В.[✉], СЛИВКА Л.В., КУЛЕСИ С.С.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
[✉] dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ НАСІННЕВОГО ПОКОЛІННЯ T₂ З ГЕТЕРОЛОГІЧНИМ ГЕНОМ ОРНІТИН-Δ-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ

Мета. Провести фізіолого-біохімічний аналіз генетично-модифікованих рослин м'якої пшениці насінневого покоління T₂ з гетерологічним геном орнітин-Δ-амінотрансферази. **Методи.** Біохімічне визначення вмісту вільного L-проліну та активності ферменту орнітин-Δ-амінотрансферази; фізіологічна перевірка росту рослин в умовах *in vitro* та *in vivo*. **Результати.** Показано, що трансгенні рослини не відрізнялися від контрольних за оптимальних умов вирощування, проте в умовах осмотичного стресу характеризуються швидшим характером росту порівняно з контрольними генотипами. Виявлено, що рослини T₂ відрізнялися підвищеною активністю ферменту орнітин-Δ-амінотрансферази, що проявляється при зміні умов норм-стрес-норма. Встановлено, що введення генетичної конструкції, яка підвищує експресію гена *oat*, не призводить до суттєвої зміни рівня вільного L-проліну в листках рослин ні в нормі, ні за осмотичного стресу. **Висновки.** Зміни в метаболізмі трансгенних рослин дозволяють їм краще пристосовуватися до умов осмотичного стресу. Вони мають кращу адаптаційну пластичність, оскільки врожайність більшості трансформованих ліній була значно вищою порівняно з нетрансформованими рослинами, які знаходились в умовах дефіциту ґрунтової вологи.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, ген орнітин-Δ-амінотрансферази, рослини T₂, фізіолого-біохімічний аналіз.

Зростаючі загрози глобальних змін клімату та збільшення частоти екстремальних погодних явищ вимагають розробки нових стратегій в адаптації рослин до стресів та застосування для свого вирішення нових ефективних підходів. На даний час одним із таких перспективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових форм культурних рослин, стійких до абіотичних стресових чинників, є

використання методів біотехнології, і зокрема, генетичної інженерії [1–3]. Введення в геном реципієнта невеликого числа гетерологічних генів є швидким підходом до поліпшення толерантності рослин [4]. Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного або декількох генів, які кодуєть або біохімічні шляхи, або кінцеві точки сигнальних шляхів [5]. Ці генні продукти забезпечують певний захист проти екологічних стресів або безпосередньо, або опосередковано. Біотехнологічні підходи дозволяють отримувати рослини пшениці з поліпшеною толерантністю до стресів на основі вже наявних, цінних з точки зору сільськогосподарських характеристик, генотипів [6–8]. Вивчення біохімічних і фізіологічних особливостей створених рослин має фундаментальний і практичний інтерес, оскільки може дати відповідь на питання їх адаптивної пластичності за стресових умов.

Введення екзогенного гена орнітин-Δ-амінотрансферази в геном пшениці є одним з перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Цей ген кодує фермент (OAT, КФ 2.6.1.13), який каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (П5К) та глутамату [9]. Потенційно, орнітин-Δ-амінотрансфераза може бути важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну та шлях біосинтезу поліамінів. Встановлено, що надекспресія гена орнітин-Δ-амінотрансферази підвищувала рівень стійкості рослин рису і тютюну до водного дефіциту та засолення [10–12].

Нами шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro* отримано трансгенні рослини м'якої пшениці сорту Зимоярка, які несуть цільовий ген орнітин-Δ-амінотрансферази [13]. З цих рослин шляхом

самозапилення отримано рослини насінневого покоління T₂, трансгенна природа яких була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *oat* та *nptII*. У зв'язку з цим, метою нашої роботи був фізіолого-біохімічний аналіз створених генотипів насінневого покоління T₂.

Матеріали і методи

Толерантність до дефіциту води в асептичних умовах аналізували на безгормональному агаризованому середовищі МС з додаванням селективного агенту – маніту, що знижує зовнішній водний потенціал. Рослини з асептичної культури адаптували у ґрунт у квітні в умовах вегетаційного дослідження. Вирощування проводилось у вегетаційних посудинах об'ємом 10 л, наповнених ґрунтом. Ґрунт для вирощування брали однорідний, попередньо вимішували, просіювали крізь сита з отвором 3 мм. Всі посудини наповнювали однаковою кількістю ґрунту.

Для імітації посухи рослини на стадії виходу в трубку переводили на обмежений полив. Протягом трьох тижнів вологість ґрунту підтримувалася на рівні: 60% – перший тиждень, 50% – другий, 40% – третій від повного вологонасичення. Аналізували ріст рослин в умовах водного дефіциту та структурні показники урожайності. У фазі повної стиглості зерна проводили аналіз елементів структури урожаю. При цьому враховували висоту рослини (ВР), довжину головного колоса (ДГК), кількість зерен з головного колоса (КЗГК), кількість зерен з рослини (КЗР), масу зерна з головного колоса (МЗГК), масу зерна з рослини (МЗР) та масу тисячі зерен (МТЗ).

Для визначення концентрації вільного L-проліну в тканинах рослин за дії осмотичного стресу, використовували методіку, запропоновану Чинардом з модифікаціями [14]. Активність орнітин-Δ-амінотрансферази аналізували згідно Vogel та Корас [15].

Результати та обговорення

Оскільки генетична трансформація пшениці з використанням гена *oat* може призводити до підвищення рівня стійкості трансгенних рослин до водного дефіциту [16], то для підтвердження активності цільового гена зрілі зародки з насіння рослин T₂ висаджували на селективне середовище з 0,8 М маніту для визначення рівня їх толерантності до водного дефіциту (рис. 1). Показано, що трансгенні рослини ростуть на

селективному середовищі з манітом швидше, зберігаючи яскраво-зелене забарвлення на відміну від контрольних, які значно відставали в рості, мали блідо-зелене забарвлення і згодом гинули.

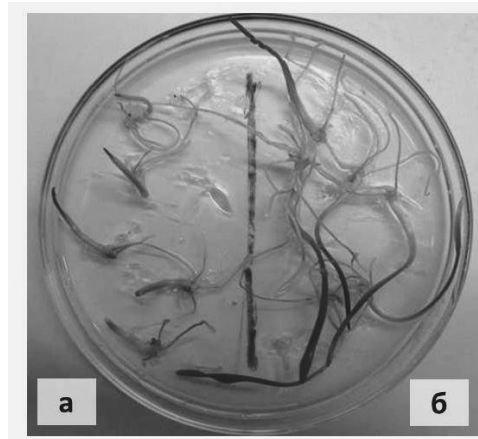


Рис. 1. Фенотиповий прояв ознак стійкості до стресових чинників у трансгенних рослин T₂ пшениці: ріст нетрансгенних (а) контрольних (сорт Зимоярка) та трансгенних (б) рослин (лінія Зимоярка-154/6) на селективному середовищі з 0,8 М маніту.

В умовах *in vivo* також спостерігалась підвищена стійкість рослин T₂ до водного дефіциту (рис. 2).

Для того щоб безпосередньо оцінити, якою мірою введена конструкція підвищує експресію гена *oat*, було проведено дослідження активності фермента орнітинамінотрансферази в листках трансформантів покоління T₂ і у контрольних рослин сорту Зимоярка. Насіння було висіяно у 4 вегетаційні посудини об'ємом 10 л, наповнені ґрунтосумішшю. Рослини з 2 посудин (контроль і трансгенні форми) знаходилися в умовах нормального поливу.

Рослини з 2 інших (контроль і трансгенні форми) для імітації посухи переводили на обмежений полив. Протягом 10 діб вологість ґрунту підтримувалася на рівні 40 % від повного вологонасичення. Активність фермента вимірювали на 10 добу посухи. Після посухи, для включення механізмів відновлення після стресу, рослини рясно поливали і через добу вимірювали активність фермента.

У нормальних умовах активність ОАТ у контрольних рослин відносно невисока (0,47±0,07 нмоль П5К/хв.*мгр білка), а у трансгенних форм приблизно у 1,5 рази більша (0,71±0,07 нмоль П5К/хв.*мгр білка).

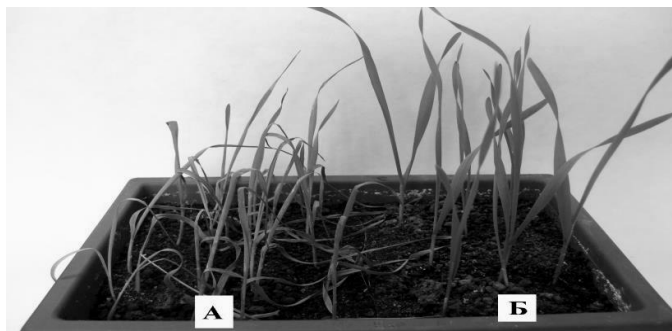


Рис. 2. Стійкість рослин до умов модельованої посухи: А – контрольні рослини за умов нестачі вологи; Б – трансгенні генотипи.

Тобто трансгенні рослини в нормальних умовах демонструють збільшення рівня активності ОАТ порівняно з контролем, що очевидно обумовлено експресією чужорідного гена. У стресових умовах активність ферменту і в контрольних ($1,03 \pm 0,1$ нмоль П5К/хв.*мгр білка), і в трансгенних рослин ($1,6 \pm 0,2$ нмоль П5К/хв.*мг білка) підвищується приблизно у 2 рази. Проте, коли стресові фактори перестають діяти (в умовах після зняття осмотичного стресу), спостерігається значне зменшення активності ОАТ, як у контрольних ($0,57 \pm 0,07$ нмоль П5К/хв.*мгр білка), так і в трансгенних генотипів ($1,1 \pm 0,1$ нмоль П5К/хв.*мгр білка), проте останні характеризуються вдвічі більшою активністю фермента. Таким чином, трансформанти характеризуються підвищеною активністю фермента орнітин- Δ -амінотрансферази, що проявляється при зміні умов норма-стрес-норма.

Рослини насінневого покоління T_2 характеризуються рівнем вільного L-проліну в листках, практично таким же як і в контролі за умов нормального поливу, так і в штучно створених умовах водного дефіциту (рис. 3). При цьому, за своїм абсолютним значенням, вміст L-проліну як в нормі, так і при стресі не відрізнявся від контролю. Тобто наявність трансгенів суттєво не впливає на накопичення L-проліну при осмотичному стресі – і в контрольних, і в трансгенних рослин спостерігається майже однакове підвищення рівня цієї амінокислоти. Таким чином, введення генетичної конструкції, що змінює експресію гена *oat*, не призводить до суттєвої зміни рівня вільного L-проліну в листках рослин ні в нормі, ні за осмотичного стресу.

Більша стійкість до водного дефіциту рослин T_2 у порівнянні з вихідними рослинами знайшла відображення в характері їх росту. При нормальному поливі середня висота рослин вихідного сорту і трансформантів була однаковою і становила в середньому 66 см. В умовах вод-

ного стресу на стадії виходу в трубку середня висота вихідних рослин становила приблизно 45 см, а стійкі рослини мали середню висоту 55–60 см (рис. 4).

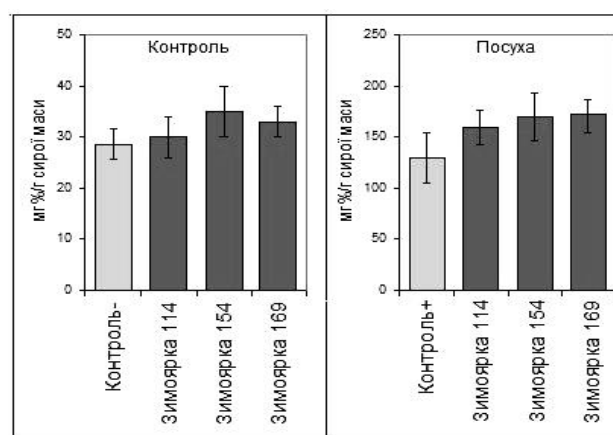


Рис. 3. Вміст вільного L-проліну у рослин покоління T_2 .



Рис. 4. Ріст рослин трансгенних і нетрансгенних форм. А – контрольні рослини; Б – трансгенні генотипи.

Відповідно до отриманих даних нами виявлено певні відмінності за показниками ВР,

КЗГК, КЗР, МЗГК, МЗР та МТЗ між трансгенними рослинами та позитивним контролем – рослинами вихідного сорту, які вирощувалися за дії водного дефіциту (табл.). Висота рослин лінії 129 становила близько 40 см. Ця лінія виявилась найменш стійкою до посухи. Показники врожайності цієї лінії були подібними до аналогічних показників нетрансформованих рослин за дії стресу. Імовірно, це пов'язано із сайленсінгом екзогенних генів.

Трансгенні рослини ліній Зимоярка-114, 154, 169, які знаходились під дією осмотичного стресу за показниками врожайності дещо поступались контрольним, вирощеним за оптимальних умов. Проте врожайність більшості трансформованих ліній була значно вищою, в порівнянні з нетрансформованими рослинами, які знаходились в умовах дефіциту ґрунтової вологи.

Таблиця. Показники структури врожаю рослин T₂ та контрольних рослин за дії водного дефіциту

Варіант	ВР, см	ДГК, см	КЗГК, шт.	КЗР, шт.	МЗГК, г	МЗР, г	МТЗ, г
Контроль (-)	92,2±2,1	9,8±0,7	45,2±4,4	187,20±8,1	1,3±0,1	2,2±0,3	28,9±0,2
Контроль (+)	49,2±6,0*	6,6±1,2*	30,7±4,1*	70,8±5,6*	0,8±0,1*	1,2±0,2*	18,4±1,2*
Зимоярка-114	84,6±3,2*	9,7±0,9	43,8±5,5*	138,8±9,9*	1,2±0,1*	2,4±0,3*	27,0±0,6*
Зимоярка-129	42,0±5,6	6,2±0,2	29,2±6,6	79,4±8,7	0,7±0,1	1,2±0,3	17,5±0,5
Зимоярка-154	85,2±5,2*	9,7±0,9*	41,2±5,4*	142±12,0*	1,1±0,1*	2,3±0,3*	26,9±0,4*
Зимоярка-169	86,8±4,0*	9,3±0,7*	39,6±4,7	141,6±10,2*	1,1±0,1*	2,4±0,3*	26,8±0,4*

Примітки: ВР – висота рослини, ДГК – довжина головного колосу, КЗГК – кількість зерна з головного колосу, КЗР – кількість зерна з рослини, МЗГК – маса зерна з головного колосу, МЗР – маса зерна з рослини, МТЗ – маса тисячі зернин, Контроль (-) – не трансформовані рослини сорту Зимоярка вирощені без осмотичного стресу, Контроль (+) не трансформовані рослини сорту Зимоярка вирощені в умовах осмотичного стресу; * – різниця між контролем та дослідом достовірна при $p \leq 0,05$.

Таким чином, проведений фізіолого-біохімічний аналіз генетично-модифікованих рослин м'якої пшениці насінневого покоління T₂ з гетерологічним геном орнітин-Δ-амінотрансферази. Показано, що трансгенні рослини не відрізнялися від контрольних за оптимальних умов вирощування, проте в умовах осмотичного стресу вони характеризуються швидшим характером росту порівняно з контрольними генотипами. Виявлено, що рослини T₂ відрізнялися підвищеною активністю ферменту орнітин-Δ-амінотрансферази, що проявляється при зміні умов норма-стрес-норма. Встановлено, що введення генетичної конструкції, яка підвищує експресію гена *oat*, не призводить до суттєвої

зміни рівня вільного L-проліну в листках рослин як у нормі, так і за осмотичного стресу.

Висновки

Генетично-модифіковані рослини м'якої пшениці насінневого покоління T₂ з гетерологічним геном орнітин-Δ-амінотрансферази більш пристосовані до умов осмотичного стресу. Вони мають кращу адаптаційну пластичність, оскільки врожайність більшості трансформованих ліній була значно вищою, в порівнянні з нетрансформованими рослинами, які знаходились в умовах дефіциту ґрунтової вологи.

Робота виконана за рахунок коштів бюджетної програми «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (КПКВК 6541230).

References

1. Goldenkova-Pavlova I.V., Mirahorli N., Maali A.R., Isaenko E., Kartel N.A., Yuryeva N.O., Abdeyeva I.A. Experimental models for the creation of transgenic plants resistant to stress factors. *Cytology and Genetics*. 2007. Vol. 41 (3). P. 44–49. [in Russian] / Голденкова-Павлова И.В., Мирахорли Н., Маали А.Р., Исаенко Е., Картель Н.А., Юрьева Н.О., Абдеева И.А. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам. *Цитология и генетика*. 2007. Т. 41 (3). С. 44–49.
2. Morgun B.V., Tishchenko E.N. Molecular Biotechnologies for Increasing the Sustainability of Cultivated Cereals to Osmotic Stress K.: Logos, 2014. 218 p. [in Russian] / Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. 218 с.

3. Tishchenko O.M., Mikhals'ka S.I., Morgun B.V. Genetic engineering and cell selection for enhancing osmotolerance of cultivated plants. *Plant physiology and genetics*. 2016. Vol. 48 (3). P. 257–266. [in Ukrainian] / Тищенко О.М., Михальська С.І., Моргун Б.В. Генетична інженерія та клітинна селекція для підвищення осмотолерантності культурних рослин. *Фізіологія рослин і генетика*. 2016. Т. 48 (3). С. 257–266.
4. Hiei Y., Ishida Y., Komary T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 628. doi: 10.3389/fpls.2014.00628.
5. Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J Exp Bot*. 2010. Vol. 61 (12). P. 3211–3222. doi: 10.1093/jxb/erq152.
6. Mamrutha H., Rakesh K., Karnam V., Sharma P., Kumar R., Tiwari V. Genetic transformation of wheat– present status and future potential. *J. of Wheat Research*. 2014. Vol. 6, (2). P. 107–119.
7. Binka F., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection Cassettes. *J. of Applied Genetics*. 2012. Vol. 53. P. 1–8. doi: 10.1007/s13353-011-0064-y.
8. Dubrovna O.V., Morgun B.V. The current state of the research of *Agrobacterium*-mediated wheat transformation. *Plant physiology and genetics*. Vol. 50, No. 3. P. 187–217. [in Ukrainian] / Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. Т. 50 (3). С. 187–217.
9. Stranska J., Kopesny D., Tylichova M., Snégaroff J., Šebela M. Ornithine delta-aminotransferase: An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants. *Plant Signal Behav*. 2008. Vol. 3 (11). P. 929–935.
10. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed*. 2002. Vol. 9. P. 73–80.
11. Wu L., Fan Z., Guo L. Over-expression of an Arabidopsis OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Sci. Bull*. 2003. Vol. 48 (23). P. 2594–2600.
12. Vendruscolo E., Schuster I., Pileggi M. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Plant Physiol*. 2007. Vol. 164 (10). P. 1367–1376. doi: 10.1016/j.jplph.2007.05.001.
13. Goncharuk O.M., Dubrovna O.V. Receipt of Genetically-Modified Wheat Plants with the Ornithine- Δ -Aminotransferase heterologous gene. *Factors of Expedient Evolution of Organisms*. 2018. Vol. 22. P. 222–227. [in Ukrainian] / Гончарук О.М., Дубровна О.В. Отримання генетично-модифікованих рослин пшениці з гетерологічним геном орнітин- Δ -амінотрансферази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 22. С. 222–227.
14. Andriushchenko V.K., Saianova V.V., Zhuchenko A.A., D'iachenko N.I., Chilikina L.A., Drozdov V.V., Korochkina S.K., Cherep G.I., Medvedev V.V., Niutin Iu.I. Modification of the method for determining proline to identify drought-resistant forms of the genus *Lycopersicon* Tourn. *Izvestiia Akademii Nauk Moldavskoi SSR*. 1981. Vol. 4. P. 55–60. [in Russian] / Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., Дьяченко Н.И., Чиликина Л.А., Дроздов В.В., Корочкина С.К., Череп Г.И., Медведев В.В., Нютин Ю.И. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourn. *Изв. Акад. наук Молд. ССР*. 1981. Т. 4. С. 55–60.
15. Vogel R.H., Kopac M. Some properties of ornithine δ -transaminase from *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1960. Vol. 37. P. 539–540.
16. Tishchenko E.N. Genetic engineering using the L-proline metabolism genes to enhance osmotic tolerance of plants. *Plant Physiology and Genetics*. 2013. Vol. 45 (6). P. 488–500. [in Russian] / Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений. *Физиология растений и генетика*. 2013. Т. 45 (6). С. 488–500.

DUBROVNA O.V., SLIVKA L.V., KULESH S.S.

Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF TRANSGENIC WHEAT PLANTS OF SEED GENERATION T₂ WITH HETEROLOGOUS ORNITHINE- Δ -AMINOTRANSFERASE GENE

Aim. To carry out physiological and biochemical analysis of genetically modified plants of bread wheat of seed generation T₂ with the heterologous ornithine- Δ -aminotransferase gene. **Methods.** Biochemical determination of free L-proline content and ornithine- Δ -aminotransferase enzyme activity; physiological examination of plant growth in *in vitro* and *in vivo* conditions. **Results.** It was shown that transgenic plants did not differ from the controls under optimal conditions of cultivation. It was determined that transgenic plants under the conditions of osmotic stress are characterized by faster growth in comparison with control genotypes. It was found that T₂ plants differed in the increased activity of the ornithine- Δ -aminotransferase enzyme, which is manifested when the norm-stress-norm conditions change. It was found that the introduction of a genetic construct that increases the expression of the oat gene does not lead to a significant change in the level of free L-proline in the leaves of plants, either in normal, or in terms of osmotic stress. **Conclusions.** Changes in the metabolism of transgenic plants allow them to better adapt to adverse conditions. They have better adaptive plasticity, since the yield of most of the transformed lines was significantly higher, compared to non-transformed plants that were under groundwater deficit.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, ornithine- Δ -aminotransferase gene, T₂ plants, physiological-biochemical analysis.