

КУЛЕШ С.С.✉, ДУБРОВНА О.В., СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО О.Г., КІРІЗІЙ Д.А., ПРЯДКІНА Г.О., СТАСИК О.О.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: s.voronova.s@gmail.com

✉ s.voronova.s@gmail.com, (099) 434-76-42

АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ХЛОРОПЛАСТАХ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК-СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Мета. Дослідити активність антиоксидантних ферментів у хлоропластах трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази.

Методи. Спектрофотометричне визначення активності ферментів. **Результати.** За оптимальних умов поливу активність супероксиддисмутази (СОД) та аскорбатпероксидази (АПО) у трансгенних рослин достовірно перевищувала ці показники у нетрансгенних форм. За дії ґрунтової посухи активність СОД у трансгенних рослин достовірно зменшувалася і становила лише 70% від активності цього ферменту у контрольних рослин, активність АПО була на 12% меншою, ніж у контролі. За водного дефіциту у трансгенних рослин пшениці зі зниженою активністю проліндегідрогенази відбувається різке підвищення (у 4–5 разів) рівня вільного L-проліну. **Висновки.** Біотехнологічні рослини пшениці зі збільшеною за оптимальних умов активністю СОД та АПО можуть характеризуватися підвищеною адаптивною пластичністю у порівнянні з рослинами вихідного сорту, у яких активність цих ферментів є нижчою. Підвищена активність антиоксидантних ферментів може бути передумовою для збільшення толерантності цих рослин до стресорів різного походження.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., трансгенні рослини, дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, L-пролін, антиоксидантні ферменти.

На сьогодні одним із перспективних підходів, які надають можливість створення нових форм сільськогосподарських рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресових чинників довкілля, зокрема й пшениці, є використання методів генетичної інженерії, а саме методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [1]. Відомо, що стійкість до посухи, засолен-

ня та температурних стресів – комплексні ознаки, а повний набір генів, що визначають такий фенотип, не відомий [2]. Існує ряд досліджень, що пов'язують ці ознаки з вмістом вільного L-проліну в тканинах рослин, який активно синтезується у відповідь на різні стресові чинники, виступаючи в якості осмопротектора [3, 4]. Вважається, що пролін регулює кислотність цитозоля і підтримує співвідношення НАД/НАДН, сприяє збереженню фотохімічної активності фотосистеми II в мембранах тилакоїдів і знижує перекисне окислення ліпідів. Додатковий синтез цієї амінокислоти підвищує загальну стійкість рослин до абіотичних стресів, оскільки пролін захищає мембрани, макромолекули і структурні елементи клітини, забезпечуючи таким чином підвищення неспецифічної стійкості [4]. У рослинах накопичення проліну під час стресу відбувається як за рахунок збільшення швидкості його синтезу, так і за рахунок пригнічення його катаболізму [5]. У ряді випадків доведена кореляція між вмістом L-проліну та підвищенням рівня стійкості трансгенних рослин [6]. Рівень вільного L-проліну можна збільшити, підсилити його синтез або знизити швидкість його деградації. Ген проліндегідрогенази, пов'язаний із катаболізмом L-проліну, має практичне значення для генетичної інженерії, оскільки часткове пригнічення його експресії може призводити до підвищення вмісту вільного L-проліну і як наслідок – рівня стійкості рослин до абіотичних стресів [7].

Встановлено, що перспективним для часткової супресії гена проліндегідрогенази є використання векторних конструкцій, у яких дволанцюговий РНК-супресор розташований як обернений повтор [8]. Припускається, що така конструкція за рахунок РНК-інтерференції є більш ефективною для збільшення рівня L-проліну. Є позитивний досвід введення конс-

© КУЛЕШ С.С., ДУБРОВНА О.В., СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО О.Г., КІРІЗІЙ Д.А., ПРЯДКІНА Г.О., СТАСИК О.О.

трукції, яка містить супресор гена проліндегідрогенази у рослини кукурудзи, що в результаті містили в 1,5–4,0 рази більше вільного L-проліну і відрізнялися від контрольних рослин більшою стійкістю до абіотичних стресів [9]. За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in planta* нами було отримано трансгенні рослини м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. сорту Зимоярка, які містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази [10].

Відомо, що за дії абіотичних стресів рослини зазнають окиснювального стресу, пов'язаного з посиленням утворенням активних форм кисню (АФК) в різних субклітинних компартментах, які реагують з ДНК, ліпідами і білками, спричиняючи їх пошкодження. Серед захисних механізмів клітин від окиснювального стресу головну роль відіграють антиоксидантні ферменти, зокрема супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АПО) і каталаза [11]. У рослин збільшена активність СОД часто пов'язана з підвищеною толерантністю до стресів різного походження, що дає змогу стійким сортам і рослинам, надекспресуючим СОД, продукувати більшу біомасу в порівнянні з чутливими сортами і нетрансформованими рослинами [12]. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження активності антиоксидантних ферментів у хлоропластах і показників активності фотосинтетичного апарату у трансгенних рослин пшениці, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*).

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були трансгенні лінії пшениці сорту Зимоярка покоління T2, отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in planta*. У якості контролю використовували нетрансформовані рослини сорту Зимоярка. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили згідно з описаною методикою [10] з використанням штаму AGL0, що містить бінарну векторну конструкцію pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису та селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Трансгенний статус рослин був підтверджений методом ПЛР.

Рослини вирощували в умовах вегетаційного дослідження за нормального поливу та в умовах ґрунтової посухи. У контрольному варіанті во-

логість ґрунту складала 60–70% від повної вологості (ПВ), а в дослідному варіанті – 7 діб вологість ґрунту підтримувалася на рівні 30% ПВ. Для визначення концентрації вільного проліну в тканинах рослин використовували методику, запропоновану Чинардом, з модифікаціями [13]. Ізольовані хлоропласти пшениці отримували механічним способом за допомогою методу диференційного центрифугування з попередньо витриманих у холодильнику за температури 2–4°C у вологому фільтрувальному папері листків. Визначення активності супероксиддисмутази проводили з використанням методу фотохімічного окиснення нітротетразолієвого блакитного (НТБ) [14]. Визначення активності аскорбатпероксидази проводили за методикою Nacano, Asada [15], використовуючи аскорбат як донор електронів. Інтенсивність фотосинтезу вимірювали за контрольованих умов на установці, змонтованій на базі оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ПІАМ-5М. Освітленість у листовій камері становила 400 Вт/м², температура 25°C.

Результати та обговорення

За оптимальних умов поливу вміст вільного L-проліну в контрольних рослин був на рівні 21±3 мк%/г сирової маси, а у трансгенних у 1,5 – 2 рази більшим – від 33 до 48 мк%/г сирової маси (рис.). В умовах посухи вміст цієї амінокислоти збільшився і у контрольних, і у трансгенних форм – середньоарифметичне значення в трансгенних рослинах пшениці, що містять супресор гена *pdh*, (199±11 мк%/г сирової маси), перевищувало у 3 рази це значення у контрольних рослин (58 ± 3 мк%/г сирової маси). У рослин контролю кількість проліну збільшилася приблизно в 2,5 рази, в той час як у генетично-модифікованих форм концентрація амінокислоти, залежно від лінії, підвищилася у 4–5 разів. Таким чином, трансгенні рослини характеризуються підвищеним вмістом L-проліну як в нормі, та і за дії стресу.

За оптимальних умов поливу активність СОД у трансгенних рослин достовірно перевищувала (на 30,2%) активність ферменту у нетрансгенних форм (табл.). Активність АПО у трансгенних ліній також на 18% перевищувала цей показник у нетрансгенних рослин. Це свідчить про те, що антиоксидантна система у трансгенних рослин працює більш активно порівняно з нетрансгенними генотипами.

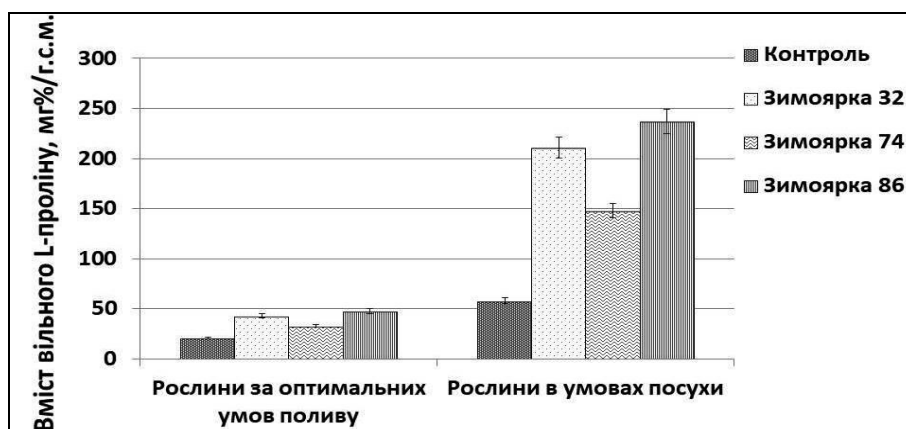


Рис. Вміст вільного L-проліну у рослин м'якої пшениці.

Таблиця. Вплив ґрунтової посухи на активність супероксиддисмутази (СОД), аскорбатпероксидази (АПО) хлоропластів та інтенсивність фотосинтезу прапорцевого листка рослин пшениці

	СОД, відн. од/ (мг хл. год.)	АПО, мкмоль АК/(мг хл. год)	Інтенсивність фотосинтезу, мг СО ₂ / (дм ² год)	Вміст сумарного хлорофілу (мг/г сухої речовини)
Вихідний сорт за умов поливу	1385,0±57,1	337,7±8,6	32,8±2,8	14,19±0,77
Вихідний сорт за умов посухи	1935,2±99,7 ^b	374,1±21,8	13,8±1,1 ^b	10,75±0,63 ^b
Трансгенні рослини за умов поливу	1803,7±85,1 ^a	396,9 ±24,3	33,0±2,9	11,90±0,50
Трансгенні рослини за умов посухи	1348,6±84,8 ^{ab}	330,8±8,8	19,3±2,1 ^{ab}	11,23±0,54

Примітки: АК – аскорбінова кислота; а – різниця між трансгенними і нетрансгенними рослинами; b – різниця між варіантами поливу достовірна за $p \leq 0,05$.

Отже, наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *pdh* призводить не тільки до підвищення рівня накопичення вільного L-проліну, а й активує антиоксидантні ферменти. За інтенсивністю фотосинтезу прапорцевого листка в умовах оптимального вологозабезпечення в трансгенних і нетрансгенних рослин відмінностей не виявлено. Вміст хлорофілу в трансгенних рослин був дещо нижчим, проте відмінності були статистично не достовірними.

Встановлено, що трансгенні рослини з підвищеною за фізіологічних умов активністю антиоксидантних ферментів мають скорочений вегетативний період і зміни у функціонуванні фотосинтетичного апарату [16] у порівнянні з нетрансгенними рослинами. Для більшості рослин із підвищеною за нормальних умов активністю СОД підтверджена вища толерантність до стресів різного походження в лабораторних експериментах і у польових дослідженнях. Та-

ким чином, біотехнологічні рослини пшениці зі збільшеною за оптимальних умов активністю супероксиддисмутази та аскорбатпероксидази можуть характеризуватися підвищеною адаптивною пластичністю у порівнянні з рослинами, у яких активність цих ферментів є нижчою. Підвищена активність антиоксидантних ферментів може бути передумовою для збільшення толерантності цих рослин до стресорів різного походження.

Відомо, що підвищення активності СОД у трансгенних рослин може викликатися експресією не тільки гетерологічних генів СОД, але й інших генів [17, 18]. Наші експерименти також дозволяють зробити припущення, що підвищення активності антиоксидантних ферментів у трансгенних рослин пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh* може викликатися експресією гетерологічних генів.

Ґрунтова посуха спричиняла істотне (майже на 40%) підвищення активності СОД і

незначне (11%) підвищення активності АПО у рослин вихідного сорту. Водночас активність СОД у трансгенних рослин достовірно зменшувалася і становила лише 70% від активності цього ферменту у контрольних рослин. Трансгенні форми також характеризувалися активністю аскорбатпероксидази на 12% меншою, ніж у контролю. Тобто, за дії стресового чинника у нетрансгенних рослин активність антиоксидантних ферментів зростала на відміну від генетично-модифікованих форм, де їх активність, навпаки, була нижчою порівняно з оптимальними умовами поливу).

Відомо, що зростання активності антиоксидантних ферментів хлоропластів за дії посухи є типовою стресовою реакцією фотосинтетичного апарату. Зменшення надходження CO_2 всередину листка в результаті зниження продихової провідності порушує енергетичний баланс у хлоропластах і посилює генерацію активних форм кисню, в першу чергу супероксидного радикала. У рослин вихідного сорту за умов посухи суттєво знижувалася інтенсивність фотосинтезу і вміст хлорофілу, що вказує на істотні порушення фотосинтетичного метаболізму і пошкодження фотосинтетичного апарату.

Протилежна реакція, виявлена в трансгенних рослин, очевидно, пояснюється тим, що вони вже були преадаптованими до умов стресу завдяки більшому накопиченню L-проліну та більшій активності антиоксидантних ферментів. Зниження активності фотосинтезу у трансгенних рослин було меншим, ніж у рослин вихідного сорту. Якщо у нетрансгенних рослин інтенсивність фотосинтезу зменшилася на 60%, то у біотехнологічних рослин – лише на 30%. За інтенсивністю фотосинтезу за умов посухи трансгенні рослини пшениці достовірно переважали нетрансгенні форми. Цей показник у біотехнологічних рослин був на 40% більшим порівняно з рослинами вихідного сорту. При цьому трансгенні рослини за оптимального поливу і водного дефіциту практично не відрізнялися за вмістом хлорофілу, що свідчить про відсутність пошкоджень фотосинтетичного апарату, спричинених посухою. Очевидно, активність антиоксидантних ферментів хлоропластів, які є складовою частиною фотосинтетичної метаболічної системи, знижувалася у відповідності із загальним зменшенням фотосинтетичної активності за умов посухи. Крім того, за водного дефіциту у біотехнологічних рослин пшениці зі зниженою активністю проліндегідрогенази відбувається

різке підвищення (у 4–5 разів) рівня вільного L-проліну, тому немає потреби у більшій активності антиоксидантних ферментів. Втрата частки антиоксидантного захисту через знижену активність деяких ферментів може компенсуватися за рахунок інших компонентів антиоксидантної системи і часто не призводить до катастрофічних змін для рослин у стресових ситуаціях.

Підтримання високої активності антиоксидантних ферментів за звичайних фізіологічних умов росту рослин має важливе значення. Напруженість основних кліматичних факторів – температури, вологості повітря тощо – змінюється як в ході вегетації, так і впродовж доби. Крім того, фотосинтетичний апарат листка знає частих короткочасних (хвилини – десятки хвилин) змін умов функціонування за переходу у світло-тінь, поривів вітру, які змінюють співвідношення інтенсивності поглинання світлової енергії і її використання в фотосинтетичних процесах і стимулюють утворення активних форм кисню в хлоропластах. Тому підвищена активність антиоксидантних ферментів слугує ефективним механізмом швидкої протидії росту генерації АФК за осмотичного і енергетичного дисбалансів, що виникають як за дії стресів, так і за фізіологічних умов росту.

Висновки

Таким чином, аналіз активності антиоксидантних ферментів у хлоропластах трансгенних рослин пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази показав, що за фізіологічних умов антиоксидантна система у трансгенних рослин працює більш активно порівняно з нетрансгенними формами. Наші експерименти також дозволяють зробити припущення, що підвищення активності антиоксидантних ферментів у трансгенних рослин пшениці може викликатися експресією гетерологічних генів. Встановлено, що за умов водного дефіциту активність антиоксидантних ферментів у біотехнологічних рослин порівняно нижча, ніж у контрольних, що, очевидно, пояснюється меншою напруженістю стресу в трансгенних генотипів, які вже є преадаптованими до несприятливих умов. За водного дефіциту у біотехнологічних рослин пшениці зі зниженою активністю проліндегідрогенази різко підвищується рівень вільного L-проліну, зберігається істотно вища активність фотосинтетичного апарату, що, ймовірно, зменшує потребу у більшій активності антиоксидантних ферментів. Підтримання

достатнього пулу антиоксидантних ферментів може бути механізмом для швидкої протидії метаболічним порушенням, що супроводжують-

ся ростом генерації АФК, які відбуваються за умов посухи.

Література

- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 1–11.
- Agarwal S., Grover A. Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006. Vol. 25. P. 1–21.
- Vahdati K., Lotfi N. Abiotic Stress Tolerance in Plants with Emphasizing on Drought and Salinity Stresses in Walnut. *Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture*. 2013. Vol. 10. P. 307–365.
- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2009. Vol. 15. P. 89–97.
- Колупаєв Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Пролін: фізіологічні функції і регуляція вмісту в рослинах в стресових умовах *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біол.* 2014. Вип. 2. С. 6–22.
- Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В. и др. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы. *Генетика*. 2006. 42 (2). С. 278–281.
- Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений. *Физиология и биохим. культ. растений*. 2013. Т. 45 (6). С. 488–500.
- Manavalan L., Chen X., Clarke J., Salmeron J., Nguyen H. RNAi- mediated disruption squalen synthase improves drought tolerance and yield in rice. *J. Experimental Botany*. 2012. Vol. 63. P. 163–175.
- Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю., Коберник Н.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н., Моргун В.В. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных трансгенных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46 (6). С. 482–489.
- Воронова С.С., Бавол А.В., Дубровна О.В. Генетична трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням штаму АGLO, який містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегидрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 126–130.
- Hasanuzzaman M., Hossain A., Teixeira J., Fujita M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defence is a key factor. Crop stress and its management: perspectives and strategies. Springer Netherlands. 2012. P. 261–315.
- Vahdati K. Abiotic Stress Tolerance in Plants with Emphasizing on Drought and Salinity Stresses in Walnut. *Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture*. 2013. Vol. 10. P. 307–365.
- Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourn. *Изв. Акад. наук Молд. ССР*. 1981. Т. 4. С. 55–60.
- Beyer W., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 161 (2). P. 559–566.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22 (5). P. 867–880.
- Deng B., Dong H. Ectopic expression of riboflavin-binding protein gene TsRfBP paradoxically enhances both plant growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 2013. Vol. 32 (1). P. 170–181.
- Rai A., Singh M., Shah K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in *ZAT12*-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 61. P. 108–114.
- Wan X., Wan X., Tan J., Lu S. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. *Physiol Plant.* 2009. Vol. 136 (1). P. 30–44.

Reference

- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 1–11.
- Agarwal S., Grover A. Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006. Vol. 25. P. 1–21.
- Vahdati K., Lotfi N. Abiotic Stress Tolerance in Plants with Emphasizing on Drought and Salinity Stresses in Walnut. *Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture*. 2013. Vol. 10. P. 307–365.
- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2009. Vol. 15. P. 89–97.
- Kolupaev Yu. E., Vainer AA, Yastreb TO. Proline: physiological functions and regulation of the content in plants under stress conditions *Newsletter. Kharkiv. nat. agrarian. un-tu. Ser. Biol.* 2014. Vip. 2. P. 6–22.
- Kolodyazhnaya Ya. S., Titov S. Ye., Kochetov A. V et al. Evaluation of the salt tolerance of tobacco plants *Nicotiana tabacum*, carrying an antisense suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Genetics*. 2006. 42 (2). P. 278–281.
- Tischenko E.N. Genetic engineering using L-proline metabolism genes to increase plant osmotolerance. *Physiology and biochemistry. cult. plants*. 2013. Vol. 45 (6). P. 488–500.
- Manavalan L., Chen X., Clarke J., Salmeron J., Nguyen H. RNAi- mediated disruption squalen synthase improves drought tolerance and yield in rice. *J. Experimental Botany*. 2012. Vol. 63. P. 163–175.
- Mikhalskaya S.I., Sergeeva L.E., Matveeva A.Yu., Kobernik N.I., Kochetov A.V., Tishchenko E.N., Morgun V.V. Increase in free proline in osmotolerant transgenic maize plants with double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Plant physiology and genetics*. 2014. Т. 46 (6). S. 482–489.

10. Voronova S.S., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Genetic transformation in planta of bread wheat with the use of a strain AGLO carrying a vector pBi2E with double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Factor of Experimental Evolutionary Organisms*. 2015. T. 17. P. 126–130.
11. Hasanuzzaman M., Hossain A., Teixeira J., Fujita M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defence is a key factor. *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. Springer Netherlands. 2012. P. 261–315.
12. Vahdati K. Abiotic Stress Tolerance in Plants with Emphasizing on Drought and Salinity Stresses in Walnut. *Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture*. 2013. Vol. 10. P. 307–365.
13. Andryushchenko V.K., Sayanova V.V., Zhuchenko A.A. et al. Modification of proline determination method for detection of drought-resistant forms of the genus *Lycopersicon* Tourn. *Izv. Acad. Sciences of Mold. SSR*. 1981. S. 4. P. 55–60.
14. Beyer W., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 161 (2). P. 559–566.
15. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22 (5). P. 867–880.
16. Deng B., Dong H. Ectopic expression of riboflavin-binding protein gene TsRfBP paradoxically enhances both plant growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 2013. Vol. 32 (1). P. 170–181.
17. Rai A., Singh M., Shah K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in *ZAT12*-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 61. P. 108–114.
18. Wan X., Wan X., Tan J., Lu S. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. *Physiol Plant.* 2009. Vol. 136 (1). P. 30–44.

KULESH S.S., DUBROVNA O.V., SOKOLOVSKA-SERGIENKO O.G., KIRIZIY D.A., PRIADKINA G.O., STASIK O.O.

*Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: s.voronova.s@gmail.com*

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CHLOROPLASTS OF TRANSGENIC PLANTS OF WHEAT WITH DOUBLE-STRANDED RNA-SUPPRESSOR OF THE PROLINEDEHYDROGENASE GENE

Aim. To investigate the activity of antioxidant enzymes in chloroplasts of transgenic wheat plants variety Zymoyarka containing a double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene. **Methods.** Spectrophotometrical determination of the activity of enzymes. **Results.** Under physiological conditions, the activity of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in transgenic plants significantly exceeded these indices in non-transgenic forms. Under soil drought, the activity of SOD in transgenic plants decreased significantly and amounted to only 70 % of the activity of this enzyme in control plants, the activity of APX was 12 % lower than that of control. The water deficit increased sharply (4–5 times) the level of free L-proline in transgenic wheat plants with reduced activity *pdh*. **Conclusions.** Biotechnological plants of wheat with increased activity of SOD and APX under optimum conditions can be characterized by increased adaptive plasticity compared to plants of original variety with lower activity of the enzymes. The increased activity of antioxidant enzymes may be a prerequisite for increasing the tolerance of these plants to stressors of different origins.

Keywords: *Triticum aestivum* L., transgenic plants, double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene, L-proline, antioxidant enzymes.