

МИХАЛЬСЬКА С. І.[✉], КОМІСАРЕНКО А. Г., КУРЧІЙ В. М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

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

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.com

ГЕНИ МЕТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ В БІОТЕХНОЛОГІЇ ПІДВИЩЕННЯ ОСМОСТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ

Мета. Проаналізувати дієвість інтродукованих генів орнітин-δ-амінотрансферази (*oat*) *Medicago truncatula* та фрагментів двох копій першого екзона та інтрона гена проліндегідрогенази (*pdh*) *Arabidopsis thaliana*, що утворюють дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази пшениці, в підвищенні її продуктивності за дії осмотичного стресу. **Методи.** Визначення вмісту вільного L-проліну (Pro); активності фермента орнітин-δ-амінотрансферази (ОАТ), активності проліндегідрогенази (ПДГ), показників структури врожаю. **Результати.** Встановлено, що рослини пшениці з додатковою копією гена *oat* характеризуються підвищеною активністю ОАТ, що не відображається на вмісті Pro. Аналіз рослин з інтегрованими елементами, що утворюють дволанцюговий РНК супресор гена *pdh*, виявив зниження активності ПДГ та підвищення вмісту Pro. Виявлено, що T2 покоління біотехнологічних рослин УК 322/17 із супресором гена *pdh* та УК 95/17 із додатковою копією гена *oat* в умовах посухи характеризувалися вищими показниками ряду елементів врожаю в порівнянні з їх вихідними формами. **Висновки.** Підсилення експресії гена *oat* впливає на ростові процеси пшениці, що позитивно відображається на її продуктивності за умов водного дефіциту. Часткова супресія гена проліндегідрогенази зумовлює покращення показників продуктивності в умовах посухи за рахунок підвищеного вмісту вільного проліну.

Ключові слова: пшениця, пролін, орнітин-δ-амінотрансфераза, проліндегідрогеназа, продуктивність.

Зміна кліматичних умов, а саме тенденція до глобального потепління, стала причиною тривалих періодів посухи в усьому світі. Сучасний стан проблеми свідчить про те, що урожайність пшениці, яка є однією з найважливіших компонентів раціону людини, буде недостатньою для задоволення зростаючих потреб ринку. Тому головними задачами селекціонерів

і генетиків є створення високопродуктивних сортів пшениці з широкою агроєкологічною пластичністю [1–2]. Ключовими у вирішенні окресленого питання залишаються традиційні методи селекції, поряд із якими все більшого значення набувають ДНК-технології. На сьогодні в селекційному процесі пшениці методи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генів дозволяють досить швидко вводити рекомбінантну ДНК для цілеспрямованої модифікації генома [3–6].

Розуміння генно-інженерних принципів керування реакцією рослин на фактори стресу є передумовою створення високопродуктивних сортів. Розвиток методів молекулярного аналізу дав можливість встановити, експресія яких генів змінюється у відповідь на дію того чи іншого чинника. Зокрема, встановлено, що у відповідь на стрес відбуваються зміни рівня експресії генів, які контролюють метаболізм деяких амінокислот, у тому числі і проліну [7]. Біотехнології підвищення толерантності рослин до осмотичних стресів, пов'язані зі змінами рівня експресії генів синтезу та катаболізму вільного L-проліну, викликають значний інтерес. Численні наукові джерела описують унікальні властивості цієї амінокислоти, що дозволило їй зайняти провідне місце серед протекторних речовин. Мова йде про комплексний вплив на життєдіяльність організмів за нормальних умов і стресів, що позначається практично на всіх компартментах, починаючи від рівня нуклеїнових кислот і закінчуючи інтактним організмом. Виступаючи як сигнальна молекула в процесах росту і розвитку, вільний L-пролін може бути пов'язаний і з онтогенезом [7, 8].

У генетично-інженерних маніпуляціях важливим є вибір стратегії, завдяки якій здійснюється підвищення вмісту цієї амінокислоти до фізіологічно значущого рівня. Це може бути додаткове введення числа копій генів синтезу або часткова супресія ендогенних генів катаболізму проліну. Загалом осмотичний стрес інду-

кує експресію гена Δ 1-пірролін-5-карбоксилатсинтетази (P5KC, P5CS) – фермента синтезу проліну та гена орнітин- δ -амінотрансферази, який кодує фермент ОАТ (ЄС 2.6.11.3), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утвореннями пірролін-5-карбоксилату (P5K) та глутамату. Рівень проліну регулюється також системою його катаболізму, в якій визначальну роль відіграє пролін-дегідрогеназа. ПДГ (К.Ф. 1.5.99.8) кодується ядерним геном, знаходиться в мітохондріях і каталізує конверсію проліну в P5K [8].

Доцільність використання тих чи інших генів для розробки нових методів отримання стрес-стійких форм господарсько-цінних рослин визначається всебічним дослідженням трансгенних варіантів та їх насінневих поколінь за генетичними, фізіолого-біохімічними і морфологічними характеристиками. Актуальність такого напрямку досліджень пов'язана з тим, що створення біотехнологічних рослин пшениці озимої зі зміненою експресією генів, що контролюють синтез L-проліну, передбачає підвищення рівня їх стійкості та стабільність отримання високого врожаю в умовах осмотичного стресу.

Метою нашої роботи було проаналізувати дієвість інтродукованих генів *oat* люцерни *Medicago truncatula* та фрагментів двох копій першого екзона та інтрона гена *pdh Arabidopsis thaliana*, що утворюють дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази пшениці, в підвищенні її продуктивності за дії осмотичного стресу.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було насіннєве покоління – Т2 генетично-змінених рослин пшениці озимої генотипів: УК 322/17, УК 95/17. Біотехнологічні рослини були отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму *A. tumefaciens* AGLO, що несе векторну конструкцію pBi2E і pBi-OAT [9].

Біотехнологічні рослини Т2 УК 322/17оат, УК 95/17оат (з додатковою копією гена *oat*), УК 322/17пдг, УК 95/17пдг (з дволанцюговим РНК супресором гена *pdh*) та їх вихідні форми вирощували в умовах вегетаційного дослідження, у посудинах об'ємом 10 л, наповнених ґрунтосумішшю. У фазу виходу в трубку рослин піддавали дії осмотичного стресу шляхом припинення поливу протягом 10 діб, зменшуючи вологість

ґрунту до 30 % від повної вологоємності (ПВ), після чого відновлювали полив. Контрольні рослини вихідних та трансгенних форм вирощували за умов нормального поливу. Відбір зразків для структурного аналізу проводили після закінчення вегетації у фазі повної стиглості насіння в 3-разовій повторюваності.

Вміст вільного L-проліну та активність ферментів ОАТ і ПДГ у досліджуваних варіантах визначали за нормальних умов культивування та на 10 день осмотичного стресу. Про визначали за утворенням забарвленого продукту взаємодії L-проліну з нінгідринним реактивом [10]. Активність проліндегідрогенази оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ на окислення L-проліну, шляхом вимірювання збільшення концентрації НАДН за одиницю часу (1 хв) [11]. Активність орнітин- δ -амінотрансферази (ОАТ) оцінювали як кількість фермента, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату/хв (1U) в перерахунку на 1мг білка [12]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [13].

Результати та обговорення

Для підвищення рівня стійкості важливих селекційно-цінних генотипів пшениці нами в одному випадку застосовувалася стратегія, пов'язана з активацією експресії гена орнітинамінотрансферази, шляхом введення додаткової копії гена *oat*, в іншому – шляхом супресії гена *pdh* фермента катаболізму проліну.

У ході дослідження участі ОАТ у підвищенні стійкості до осмотичних стресів рослин пшениці за рахунок синтезу проліну встановлено, що вміст амінокислоти у трансформантів УК 322/17оат в умовах нормального поливу істотно не відрізнявся від вихідного генотипу, а для УК 95/17 показники вихідної форми були навіть дещо вищі за трансгенні варіанти (рис. 1 а). За умов дії водного дефіциту рівень проліну збільшувався і в контрольних, і в генетично-змінених рослинах. При цьому для обох генотипів УК 322/17 і УК 95/17 показники вихідної і модифікованої форми були майже однаковими. Такий факт свідчить про те, що введення генетичної конструкції з додатковою копією гена *oat* не призводить до суттєвої зміни рівня вільного L-проліну в рослинах пшениці за умов норми та стресу.

Потенційно ОАТ може бути регулятором стресостійкості, оскільки цим ферментом ката-

лізується реакція взаємоперетворень ряду амінокислот, метаболізм яких пов'язаний із фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту. Катаболізм аргініну за участю ОАТ пов'язаний із процесом синтезу поліамінів, які є важливими регуляторами процесів росту та розвитку рослин. При цьому транскрипційна регуляція гена *oat* не вивчена і його роль у процесах розвитку та відповіді на стрес не встановлена [13].

Оскільки за введення додаткової копії гена *oat* факту функціональності трансгена за вмістом проліну не виявлено, то зміни експресії гена встановлювали за активністю фермента орнітин- δ -амінотрансферази (рис. 1 б).

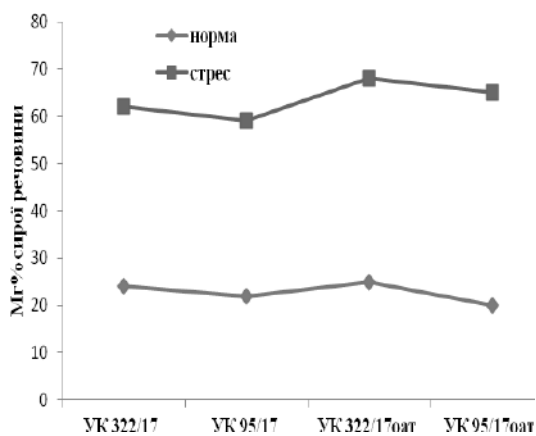
Для обох досліджуваних генотипів встановлено, що активність ОАТ в умовах посухи підвищується і у вихідній формі, і у генетично-модифікованих рослин, при чому спостерігається тенденція більшої активності ОАТ, у трансгенних варіантів як за достатнього забезпечення вологою, так за її дефіциту, що, очевидно, зумовлено експресією чужорідного гена. Оскільки з'ясовано, що збільшення активності фермента в нормальних умовах не впливає на рівень проліну, а в умовах стресу збільшується і рівень проліну, і активність фермента, то, можливо, має сенс припущення, що не збільшення активності ОАТ призводить до накопичення проліну, а навпаки, підвищений рівень амінокислоти індукуює активність фермента [15].

Використовуючи для генетичної трансформації пшениці векторну конструкцію з длРНК-супресором гена проліндегідрогенази, очікувалося, що часткове пригнічення ендогенних генів

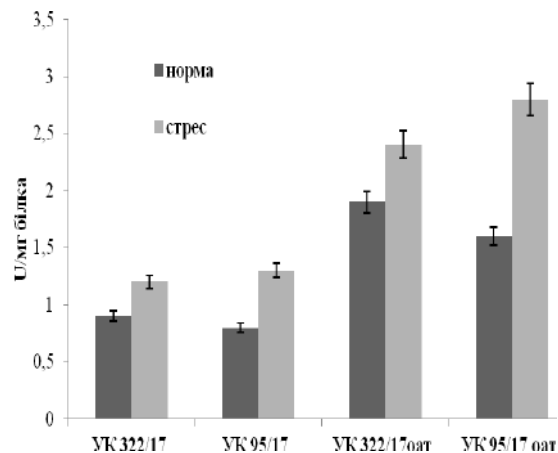
pdh трансформованих рослин буде відбуватися шляхом постраскрипційного сайленсінгу РНК, за рахунок утворення коротких інтерферуючих фрагментів, у результаті чого зниження активності проліндегідрогенази призведе до підвищення рівня Pro та осмотолерантності рослин. У процесі досліджень встановлено, що у трансформантів УК 322/17пдг та УК 95/17пдг упродовж культивування за нормальних умов вміст амінокислоти був більший майже в 1,5 раза в порівнянні з рослинами контролю (рис. 2 а).

Із тривалістю дії водного дефіциту вміст вільного Pro зростає як у контрольних, так і в біотехнологічних рослинах, причому тенденція більшої акумуляції проліну в генетично-модифікованих рослинах зберігалася, незважаючи на те, що за стресових умов у вихідних форм вміст амінокислоти збільшувався майже в три рази, тоді як у трансформованих тільки в два. Це дає підстави говорити, що збільшення Pro у генетично-модифікованих рослинах відбувається не тільки за рахунок його синтезу, а й за рахунок часткової супресії гена проліндегідрогенази. Про це свідчать і зміни активності фермента ПДГ (рис. 2 б).

Встановлено, що в умовах нормального поливу активність ПДГ у рослинах вихідних генотипів була дещо вищою, ніж у генетично-модифікованих рослинах. В умовах осмотичного стресу спостерігається пригнічення активності фермента в усіх досліджуваних варіантах, при цьому зберігається тенденція меншої активності у трансформованих рослинах.



а.



б.

Рис. 1. Вміст вільного проліну (а) та активність фермента ОАТ (б) у контрольних (вихідна форма) та генетично-модифікованих рослинах пшениці за умови нормального вологозабезпечення та водного дефіциту.

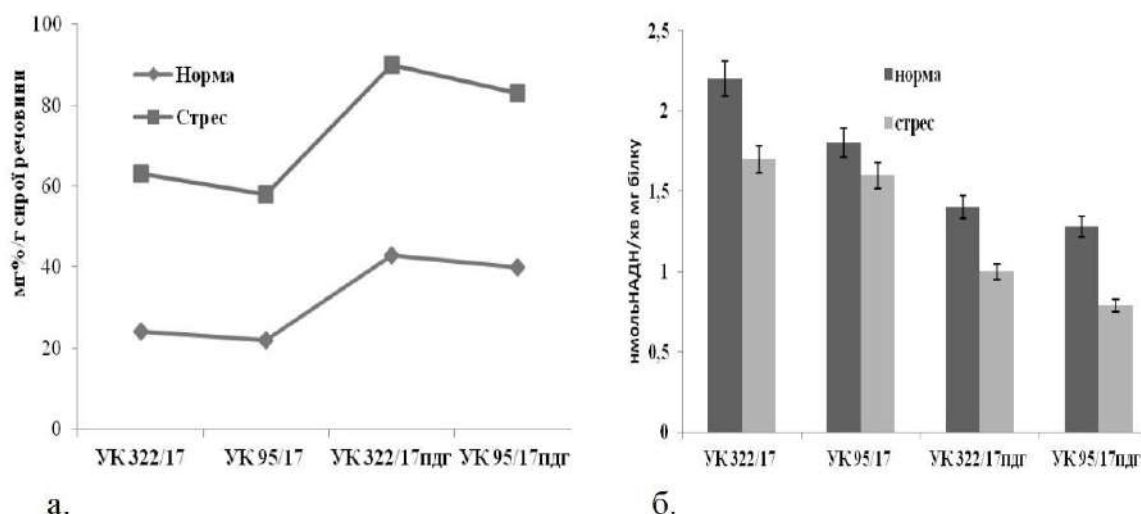


Рис. 2. Вміст вільного проліну (а) та активність фермента ПДГ (б) у вихідних формах та генетично-модифікованих рослинах пшениці за умови нормального вологозабезпечення та водного дефіциту.

Це може бути свідченням того, що інтродуковані в геном пшениці елементи гена проліндегідрогенази арабідопсису утворюють дволанцюгові ділянки, які запускають генетичний сайленсінг та спричиняють пригнічення експресії ендогенного гена проліндегідрогенази пшениці. Це відображається на зниженні активності фермента, збільшенні вмісту амінокислоти, та як результат на підвищенні стресостійкості.

Гарантованою оцінкою чутливості чи стійкості рослин до водного дефіциту є їх продуктивність в умовах дії стресового фактора. Під час оцінювання показників структури врожаю насіннєвих поколінь пшениці нами встановлено, що за умов перенесеної посухи Т2 біотехнологічних рослин УК 322/17пдг та УК 95/17оат мали перевагу за рядом елементів продуктивності над їх вихідними формами (табл.).

Зокрема, в трансгенних варіантах УК 322/17пдг за умов осмотичного стресу були більшими кількість та маса зерна з головного колоса. Достовірна перевага біотехнологічних форм спостерігалась і за масою зерна з рослини, що було результатом продуктивності додаткових пагонів, кількість яких у трансгенних варіантах усередньому становила 4–5 шт. на рослину, а у вихідного генотипу 3–4 шт.

За перенесення несприятливих кліматичних умов генетично-модифіковані рослини УК 322/17 оат менш суттєво відрізнялися за показниками структурного аналізу від вихідних форм, але мали суттєву перевагу за масою зерна з рослини та масою тисячі зерен, що свідчить про кращу виповненість зерна в умовах водного дефіциту.

Таблиця. Структурний аналіз врожаю контрольних (вихідна форма УК 322/17 та УК 95/17) і Т2 генетично-змінених (з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази та з додатковою копією гена орнітинаміотрансферази) рослин озимої пшениці за умов водного дефіциту

Показник	УК 322/17	УК 322/17 пдг	УК 322/17 оат	УК 95/17	УК 95/17 пдг	УК 95/17 оат
ВР	84,6±1,9	87,3±2,1	90,3±1,8	83,2±2,4	83,7±1,6	93,1±2,1
ДГК	8,6±0,6	9,3±0,2	9,8±2,1	8,0±0,2	8,1±0,5	8,6±0,3
ККГК	16,7±0,7	18,6±0,3	18,2±0,4	15,4±0,3	15,7±0,7	16,3±0,5
КЗГК	34,7±3,9	46,2 ±2,4	47,6±3,3	38,0±2,0	42,7±3,2	40,9±2,5
МЗГК	1,6±0,4	2,2±0,2	1,9±0,3	1,9±0,1	2,1±0,3	2,0±0,4
МЗР	6,3±0,8	11,5±0,3	8,2±1,0	9,7±1,8	8,9±1,1	12,0±0,9
МТЗ	41,1±1,2	43,5±0,9	44,1±0,8	46,0±0,7	45,1±0,4	48,6±1,5

Примітки: ВР (см) – висота рослини (головного колоса); ДГК (см) – довжина головного колоса; ККГК (шт.) – кількість колосків у головному колосі; КЗГК (шт.) – кількість зерен у головному колосі; МЗГК (г) – маса зерна з головного колоса; МЗР (г) – маса зерна з рослини; МТЗ (г) – маса тисячі зерен; КП – коефіцієнт господарської продуктивності.

Біотехнологічні рослини УК 95/17 із супресором гена проліндегідрогенази за основними показниками продуктивності не мали достовірної переваги над вихідною формою, тоді як генетично-модифіковані форми з додатковою копією гена орнітинамінотрансферази характеризувалися значно вищими показниками господарської продуктивності і над вихідним генотипом, і над трансгенними рослинами з супресованим геном катаболізму проліну. Зокрема маса зерна з рослини в умовах водного дефіциту була вищою в 1,3 раза в порівнянні з контрольними варіантами та рослинами УК 95/17 пдг.

Доречно відзначити, що біотехнологічні рослини з додатковою копією гена *oat* відрізнялися достовірно більшими значеннями висоти стебла (різниця складала до 10 см). Крім того, вони характеризувалися утворенням більшої кількості продуктивних стебел та краще розвинутою кореневою системою, що підтверджує участь ОАТ в ростових процесах. Формування у генетично-модифікованих рослинах більшої кількості продуктивного стеблостою та потужна коренева система зумовили кращі ростові показники та продуктивність рослин в умовах ґрунтової посухи.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про позитивний вплив інтегрованих трансгенів на показники продуктивності пшениці за умов стресової дії водного дефіциту. При цьому виявлено генотипову залежність врожайності біотехнологічних рослин, що може свідчити про те, що, окрім впливу трансгенів, реагування на стрес визначається біологічними особливостями генотипу.

Встановлено, що рослини пшениці з додатковою копією гена орнітин-δ-амінотрансферази характеризуються підвищеною активністю фермента ОАТ, що не відображається на вмісті вільного L-проліну. У генетично-модифікованих рослинах з інтегрованими елементами, що утворюють дволанцюговий РНК супресор гена *pdh*, зниження активності проліндегідрогенази корелює з підвищенням вмісту вільного проліну.

Висновки

Підсилення експресії гена *oat* у Т2 пшениці спричиняє покращення показників росту, що позитивно відображається на продуктивності рослин за умов водного дефіциту. Часткова супресія гена проліндегідрогенази зумовлює підвищення показників врожайності під час дії посухи за рахунок збільшення вмісту вільного L-проліну.

Підсилення експресії гена *oat* у Т2 пшениці спричиняє покращення показників росту, що позитивно відображається на продуктивності рослин за умов водного дефіциту. Часткова супресія гена проліндегідрогенази зумовлює підвищення показників врожайності під час дії посухи за рахунок збільшення вмісту вільного L-проліну.

References

1. Morgun V.V., Dubrovna O.V., Morgun B.V. Modern biotechnologies for stress-resistant wheat plants. *Fiziologiya rasteniy i genetika*. 2016. Vol. 48, No. 3. P. 196–213. doi: 10.15407/frg2016.03.196. [in Ukrainian]
2. Ahmed H.G.M.D., Li M., Khan S.H., Kashif M. Early selection of bread wheat genotypes using morphological and photosynthetic attributes conferring drought tolerance. *J. of Integrat. Agric.* 2019. Vol. 18, No. 11. P. 2483–2491. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62083-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62083-0).
3. Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 115, No. 3. P. 971–980. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.971>.
4. Richardson T., Thistleton J., Higgins T.J., Howitt C., Ayliffe M., Efficient agrobacterium transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2014. Vol. 119, No. 3. P. 647–659. doi: 10.1007/s11240-014-0564-7.
5. Mykhalska S.I., Komisarlenko A.G., Tishchenko O.M. Development of methods of wheat *Agrobacterium*-mediated transformation. *Fakty eksperyment. evolyutsiyi orhanizmiv*. 2015. Vol. 17. P. 213–216. [in Ukrainian]
6. Goncharuk O.M., Dubrovna O.V. Obtaining genetically modified wheat plants with the heterologous gene of ornithine-δ-aminotransferase. *Fakty eksperyment. evolyutsiyi orhanizmiv*. 2018. Vol. 22. P. 222–227. doi: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.952>. [in Ukrainian]
7. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2009. Vol. 1, No. 2. P. 89–97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.
8. Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*. 2011. Vol. 157. P. 292–304. doi: 10.1104/pp.111.183210.
9. Komisarlenko A.G., Mykhalska S.I., Kurchii V.M. Productivity of winter wheat plants with the additional copy of ornithine-δ-aminotransferase gene under water deficit conditions. *Fakty eksperyment. evolyutsiyi orhanizmiv*. 2019. Vol. 25. P. 247–252. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171>.
10. Andriushchenko V.K., Sayanova V.V., Zhuchenko A.A., Diyachenko N.I., Chilikina L.A., Drozdov V.V., Korochkina S.K., Cherep G.I., Medvedev V.V., Niutin Yu.I. The modification of proline estimation method for detection drought tolerant forms of genus *Lycopersicon Tourn.* *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR*. 1981. No. 4. P. 55–60. [in Russian]

11. Mattioni C., Lacerenza N.G., Troccoli A., de Leonardis A.M., di Fonzo N. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* 1997. Vol. 101. P. 787–792. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01064.x>.
12. Lin C.C., Kao C.H. Regulation of ammonium-induced proline accumulation in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation.* 2001. Vol. 35. P. 69–74. <https://doi.org/10.1023/A:1013832630830>.
13. Dospekhov B.A. Methods of field experiment. 1985. Moscow: Agropromizdat, 351 s. [in Russian].
14. Gerasimova S.V., Ibragimova S.S., Kochetov A.V., Shumny V.K. Functions of delta-ornithine aminotransferase in plants. *Advances in modern biology.* 2011. Vol. 131, No. 6. P. 531–542. [in Russian]
15. Sharma S., Verslues P.E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a pre-dominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ.* 2010. Vol. 33, No. 11. P. 1838–1851. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02188.x.

MYKHALSKA S.I., KOMISARENKO A.G., KURCHII V.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

GENES OF PROLINE METABOLISM IN BIOTECHNOLOGY OF INCREASING WHEAT OSMOSTABILITY

Aim. To analyse effectiveness of introduced genes of ornithine- δ -aminotransferase (*oat*) *Medicago truncatula* and fragments of two copies of first exon and intron of the gene prolinedehydrogenase (*pdh*) of *Arabidopsis thaliana*, that form double stranded RNA suppressor of gene of the prolinedehydrogenase wheat, in the increase of her productivity for the actions of osmotic stress. **Methods.** Determination of the content of free L-proline (Pro); of the activity of the enzyme ornithine- δ -aminotransferase (OAT), the activity of proline dehydrogenase (PDG), indicators of crop structure. **Results.** It was found that wheat plants with an additional copy of the *oat* gene are characterized by increased OAT activity, which is not reflected in the Pro content. Analysis of plants with integrated elements that form a double-stranded RNA suppressor of the *pdh* gene found a decrease in PDG activity and an increase in Pro content. It was found that T2 generation of biotechnological plants UK 322/17 with suppressor of the *pdh* gene and UK 95/17 with an additional copy of the *oat* gene, in drought conditions were characterized by higher rates for a number of crop elements compared to their original forms. **Conclusions.** Increased expression of the *oat* gene leads to improved wheat growth, which has a positive effect on plant productivity in conditions of water deficiency. Partial suppression of the proline dehydrogenase gene causes improved performance due to the increased content of free proline during drought. **Keywords:** wheat, transgenic plants, proline, ornithine- δ -aminotransferase, proline dehydrogenase, soil drought, grain productivity.