

ДУБРОВНА О.В.[✉], ПРЯДКІНА Г.О.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-4884-7572
0000-0002-4548-1747

[✉] dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ВПЛИВ НАКОПИЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ НА ВМІСТ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ

Мета. Проаналізувати вплив накопичення L-проліну на вміст хлорофілу у трансгенних рослин пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази за фізіологічних та стресових умов. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta*; біохімічне визначення вмісту вільного проліну; спектрофотометричне визначення вмісту фотосинтетичних пігментів; математичної статистики. **Результати.** Показано, що вміст вільного проліну в листках трансгенних рослин за фізіологічних умов був у 1,7-1,9 рази більшим порівняно з вихідним генотипом. В умовах посухи вміст цієї амінокислоти збільшився у нетрансформованих рослин вихідних генотипів у 2,9-3,1 рази, а у трансгенних – у 4,5-4,9 рази. Кількість хлорофілу у прапорцевих листках рослин вихідних генотипів та їх трансгенних ліній за фізіологічних умов істотно не відрізнялась, тоді як за умов посухи у перших з них вона була в 1,1-1,2 рази меншою, ніж у других. Посуха знижувала вміст сумарного хлорофілу у рослин вихідного генотипу до 85-90 %, порівняно з фізіологічними умовами, в той час, як у трансгенних рослин достовірних змін не виявлено. **Висновки.** Встановлено, що за умов ґрунтової посухи підвищення вмісту проліну у генетично змінених рослин пшениці порівняно з нетрансгенними супроводжується збільшенням кількості сумарного хлорофілу (на 10-15 %), що свідчить про кращу ефективність роботи їх пігментного апарату за стресових умов.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, пролін, хлорофіл.

Останнім часом для генетичного поліпшення культурних рослин залучаються біотехнології, пов'язані із використанням генів, що контролюють метаболізм осмотично активних речовин – органічних молекул, здатних в знач-

них концентраціях накопичуватися в клітинах рослин за умов стресу, які водночас не спричиняють токсичної дії на процеси їх росту і диференціації. Одним із таких стресових метаболітів є вільний пролін. Крім добре відомої функції як інертного сумісного осмоліту, пролін за дії стресорів виконує у рослин цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, бере участь у регуляції експресії деяких генів, а також є джерелом енергії, азоту та вуглецю [1]. Рівень вільного L-проліну корегують або підсиленням його синтезу, або зниженням швидкості деградації. Практичне значення для генетичної інженерії має ген проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаний з катаболізмом проліну, оскільки часткове пригнічення його експресії може приводити до підвищення вмісту проліну і, як наслідок, рівня толерантності рослин до абіотичних стресів [2]. Зокрема, показано, що використання дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* арабідопсису підвищувало рівень акумуляції проліну (у 2-6 рази щодо нетрансгенного контролю) в рослин тютюну, які характеризувалися підвищеною толерантністю до засолення [3]. У рослин соняшника та кукурудзи введення аналогічної конструкції також обумовило істотне збільшення вмісту цієї амінокислоти (у 1,5-9,0 разів), при цьому вони відрізнялися від контрольних підвищеною толерантністю до водного дефіциту та засолення [4, 5].

З огляду на це, можна припустити, що створення рослин з підвищеним рівнем проліну може бути одним зі шляхів отримання рослин, стійких до стресових чинників, зокрема – посухи. Відомо, що однією з чутливих до дефіциту води ланок є фотосинтетичний апарат. Так, за дії посухи спостерігають зменшення інтенсивності фотосинтезу та кількості основних фотосинтетичних пігментів [6]. Важливою складовою процесу фотосинтезу є хлорофіл. За його

© ДУБРОВНА О.В., ПРЯДКІНА Г.О.

допомогою відбувається передача енергії збудження до реакційних центрів і розподіл зарядів у реакційних центрах фотосистем [7]. Завдяки перетворенню молекулами хлорофілу поглинутої листками сонячної радіації в хімічну енергію в рослинах відбуваються метаболічні, ростові та репродуктивні процеси. Тому концентрація хлорофілу, яка характеризує фотосинтетичний потенціал рослини, може слугувати опосередкованим маркером посухостійкості.

В літературі є свідчення, що збільшення вмісту проліну позитивно впливає на вміст фотосинтетичних пігментів [8]. Показана також позитивна кореляція вмісту проліну з інтенсивністю фотосинтезу [9]. На користь припущення, щодо покращення стану пігментного апарату у рослин пшениці з підвищеним вмістом вільного проліну можуть свідчити дані про збільшення вмісту хлорофілу за їх екзогенної обробки цією амінокислотою. Зокрема, за позакореневої обробки проліном проростків сорту пшениці Weinong 9549, які вирощували за дії кадмієвого стресу, вміст хлорофілів *a* та *b* в листках перевищував значення у контролі [10]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи був аналіз впливу накопичення L-проліну на вміст хлорофілу у трансгенних рослин пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази за фізіологічних та стресових умов.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували не-трансформовані рослини м'якої озимої пшениці нових перспективних генотипів озимої пшениці (Ук 322/17, Ук 997/19), створені в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України, та трансгенні лінії насінневого покоління T₂, отримані на їх основі, ендегенний вміст проліну в листках яких був найбільшим. Вивчали по 30 рослин кожної трансгенної лінії та 30 рослин вихідного генотипу. Трансгенні генотипи отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, яку здійснювали в процесі запилення за модифікованою методикою Чумакова [11]. В експериментах з трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Рослини трансформували бінарним вектором pBi2E, що включає інвертований повтор, який складається із фрагментів двох копій першого екзону та інтрону гена проліндегідрогенази *A. thaliana*, а також селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Інтеграцію елементів векторної конструкції встановлювали ПЛР-методом за наявністю фра-

гментів екзона та інтрона гена *ProDH1* арабідопсису та селективного гена неоміцинофосфотрансферази – *nptII*.

Відібрані після аналізу на наявність конструкції рослини висаджували у вегетаційні посудини об'ємом 10 л, заповнювали ґрунтовою сумішшю (ґрунт : пісок = 3:1) і вирощували на спеціальному майданчику. У половині посудин вихідні та трансгенні форми (по 15 рослин вихідного генотипу та по 15 рослин трансгенної лінії) вирощували за умов нормального вологозабезпечення – 70 % повної вологоємності (ПВ) ґрунту. В іншій половині посудин – вологість ґрунту у фазу розкривання піхви прапорцевого листка знижували до 30 % ПВ шляхом припинення поливу і підтримували на цьому рівні впродовж 7 діб. Після цього рослини цих варіантів поливали однаковою з рослинами контрольного варіанту кількістю води.

Середню пробу зразків для біохімічних та спектрофотометричних досліджень формували з листків 5-ти головних пагонів. Вміст вільного проліну визначали методом, заснованим на утворенні забарвленого продукту взаємодії між L-проліном і нінгідрином [12]. Загальний вміст хлорофілу та каротиноїдів визначали безмацераційним методом екстракції пігментів з листка з використанням диметилсульфоксиду за методом [13]. Для аналітичного визначення вмісту пігментів із загальної проби дрібно нарізаних листків 100 мг листового матеріалу екстрагували 10 мл диметилсульфоксиду. Потім пробірки поміщали на водяну баню (температура води 60°C) на 4 год. Після охолодження до кімнатної температури 0,5 мл отриманих екстрактів розбавляли 4,5 мл диметилсульфоксиду. Оптичну густину цього розчину визначали за допомогою спектрофотометра при довжинах хвиль 480, 649 і 665 нм. Розрахунок вмісту фотосинтетичних пігментів проводили з урахуванням об'єму розчину, кількості диметилсульфоксиду для розбавлення та величиною оптичної густини. Перерахунок вмісту пігментів на г сухої речовини проводили з урахуванням всіх розведень та маси листків.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням Microsoft Excel згідно з загальноприйнятими методами варіаційної статистики. На рисунках та в таблицях наведені значення середніх арифметичних і похибок середнього. Статистичну достовірність різниці між варіантами оцінювали при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Вміст вільного L-проліну в листках рослин вихідних генотипів за оптимальних умов поливу коливався від 27,7 до 30,3 мк %/г сирової маси, а у трансгенних був у 1,7-1,9 рази більшим: 47,1-57,3 мк % сирової маси (табл. 1).

В умовах посухи вміст цієї амінокислоти збільшився й у нетрансформованих, і у трансгенних рослин. При цьому у трансгенних ліній, що містять супресор гена *ProDH*, він значно, порівняно з фізіологічними умовами, перевищував ці показники у рослин вихідних генотипів (у 2,7-3,0) рази. У варіанті з посухою вміст вільного проліну у листках нетрансформованих рослин вихідних генотипів збільшився у 2,9-3,1 рази, порівняно з варіантом з достатнім водозабезпеченням, тоді як у генетично модифікованих форм він зростав у 4,5-4,9 рази. Отже, трансгенні рослини відрізнялися підвищеним вмістом L-проліну як в нормі, та і за дії стресу. Таким чином, показано, що наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH*, призводить до підвищення рівня накопичення вільного L-проліну як за фізіологічних умов, так і за умов ґрунтової посухи.

Вміст сумарного хлорофілу ($a+b$) у прапорцевих листках рослин обох вихідних генотипів та їх трансгенних ліній за фізіологічних умов вирощування істотно не відрізнявся (табл. 2).

За дії 7-ми добової посухи вміст сумарного хлорофілу в прапорцевих листках вихідних генотипів зменшувався до 85-90 %, порівняно з

його значеннями за фізіологічних умов вирощування. Тоді як концентрація цього пігменту у листках рослин генетично модифікованих ліній істотно не відрізнялась від відповідних варіантів з достатнім водозабезпеченням (табл. 2). При цьому за умов посухи вміст сумарного хлорофілу в прапорцевих листках рослин вихідних генотипів був у 1,1-1,2 рази меншим, ніж у трансгенних ліній.

Таким чином, встановлено, що за фізіологічних умов вирощування умов вміст вільного L-проліну в листках у трансгенних рослин був у 1,7-1,9 рази вище, ніж у вихідних генотипів, а вміст сумарного хлорофілу – істотно не відрізнявся. За дії 7-ми добової посухи вміст сумарного хлорофілу у прапорцевих листках трансгенних ліній зі зниженою активністю гена *ProDH* був на 10-15 % вище, ніж у рослин вихідних генотипів. Рівень вільного проліну між ними відрізнявся значніше, ніж в контролі: у генотипів, що несуть дволанцюговий РНК-супресор гена *ProDH* арабідопсису, він був у середньому у 3 рази більше, ніж у вихідних нетрансформованих форм. Отже, підвищення рівня вільного проліну у 3 рази сприяло збільшенню вмісту сумарного хлорофілу у прапорцевих листках, тоді як майже дворазове перевищення вмісту цієї амінокислоти істотно не вплинуло на вміст пігментів. За умов посухи встановлена пряма залежність між цими показниками ($r = 0,96 \pm 0,16$), тоді як за фізіологічних умов – кореляція була слабкою.

Таблиця 1. Вміст вільного проліну в листках контрольних рослин вихідних генотипів та трансформантів покоління T₂ за фізіологічних та стресових умов

Генотип	Вміст вільного проліну, мк %/г сирової маси			
	Фізіологічні умови		Умови посухи	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Ук 322/17	30,3±2,3d	57,3±3,2c	88,0±7,9b	260,7±13,8a
Ук 997/19	27,7±2,2d	47,1±3,1c	85,9±7,8b	232,8±12,4a

Примітка. У таблицях 1 і 2 значення, позначені однаковими латинськими літерами, істотно не відрізняються між собою за $P < 0.05$.

Таблиця 2. Вміст сумарного хлорофілу в листках контрольних рослин вихідних генотипів та трансформантів покоління T₂ за фізіологічних та стресових умов

Генотип	Вміст сумарного хлорофілу ($a+b$), мк/г сухої речовини			
	Фізіологічні умови		Умови посухи	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Ук 322/17	11,9±0,6a	12,1±0,7a	10,5±0,3b	11,9±0,5a
Ук 997/19	11,6±0,6a	11,7±0,2a	10,1±0,2b	11,8±0,1a

Літературні дані, аналогічно отриманими нами, також засвідчують істотну різницю за вмістом хлорофілу між генетично модифікованими та вихідними рослинами пшениці, які відрізняються за вмістом вільного проліну. Зокрема, за умов 15-добової посухи виявлено, що вміст хлорофілу у прапорцевому листку трансгенної лінії *At-DREB1A* насіннєвого покоління T₂ сорту Lasani-08 був вищим (12,47 мг/г сирової речовини), ніж у нетрансгенної (5,75 мг/г сирової речовини), а за вмістом проліну вони відрізнялися майже у 1,5 рази [14]. Аналогічні результати отримано при порівнянні рослин вихідного сорту ярої пшениці Felder та його модифікованих ліній, що несуть промотор гена TaWRKY2 із посухостійкої пшениці Xifeng 20: трансгенні лінії мали вищий вміст хлорофілу і проліну [15]. Yu із співавторами [16] за умов 7-добової посухи показано, що навіть відносно невелике перевищення вмісту проліну (на 17-22 % порівняно з вихідною лінією) у двох генерації (T₅ та T₇) трансгенних ліній пшениці, трансформованих генами SeCspA, призвело до підвищення концентрації хлорофілу на майже 40 %. При цьому за умов посухи у ліній з більшим вмістом проліну спостерігали і менше зниження вмісту хлорофілу, порівняно з достатнім водозабезпеченням (на 44-46 %), ніж у контрольних рослини (57 %).

Аналіз літературних даних показує, що збереження більшого вмісту хлорофілу у рослин з вищим вмістом вільного проліну може бути пов'язаним з цілою низкою механізмів. Це, поперше, може бути обумовленим тим, що ця амінокислота утворює гідрофільні колоїди, які утримують воду, тобто можуть захищати рос-

линні білки від руйнування під час посухи, а також бере участь в синтезі хлорофілу та оптимізує водний обмін [17]. По-друге, акумуляція L-проліну може сприяти зниженню утворення активних форм кисню і внаслідок індукції посилення антиоксидантного захисту призводити до зменшення перекисного окиснення ліпідів та збереження цілісності тилакоїдних мембран хлоропластів [18]. По-третє, позитивний вплив накопичення рівня вільного проліну на стійкість трансгенних рослин до дефіциту вологи у ґрунті може бути пов'язаним з впливом цього осмоліту на експресію інших генів стресової відповіді рослин.

Базуючись на власних та літературних даних, можна припустити наявність взаємозв'язку між вмістом вільного проліну та хлорофілу. Це пов'язано як з тим, що накопичення проліну в листках толерантних генотипів в умовах стресу є однією з адаптивних реакцій посухостійкості, так з ослабленням негативного впливу водного дефіциту на функціональні й структурні зміни хлоропластів фотосинтетичного апарату.

Висновки

У трансгенних рослин встановлено вплив часткової супресії гена проліндегідрогенази на накопичення проліну як в умовах достатнього вологозабезпечення, так і в умовах посухи порівняно з нетрансгенними. За водного дефіциту вищий вміст сумарного хлорофілу в листках рослин трансгенних ліній, ніж у вихідних генотипів, може свідчити про послаблення негативного впливу ґрунтової посухи на рослини трансгенних ліній.

References

- Ghosh U. K., Islam M. N., Siddiqui M. N., Cao X., Khan M. A. R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*. 2022. Vol. 24 (2). P. 227–239. doi: 10.1111/plb.13363.
- Dubrovna O. V., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G. Using proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology and Genetics*. 2022. Vol. 56 (4). P. 361–378. doi: 10.3103/S009545272204003X.
- Tateishi Y., Nakagama T., Esaka M. Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique. *Physiologia Plantarum*. 2005. Vol. 125. P. 1399–3054. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00553.x.
- Komisarenko A. G., Mykhalska S. I., Kurchii V. M., Tishchenko O. M. The characterization transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants with suppressor of proline dehydrogenase gene. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2016. Vol. 19. P. 143–147. [in Ukrainian]
- Mykhalska S. I., Sergeeva L. E., Matveeva A. Yu., Kobernik N. I., Kochetov A. V., Tishchenko E. N., Morgun V. V. The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. *Plant Physiology and Genetics*. 2014. Vol. 46 (6). P. 482–489. Retrieved from: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159462>. [in Russian]
- Rehman S., Bilal M., Rana R., Tahir N., Shah M., Ayalew H., Yan G. Cell membrane stability and chlorophyll content variation in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under heat and drought conditions. *Crop and Pasture Science*. 2016. Vol. 67. P. 712–718. doi: 10.1071/CP15385.
- Chen L., Shenai P., Zheng F., Somoza A., Zhao Y. Optimal Energy Transfer in Light-Harvesting Systems. *Molecules*. 2015. Vol. 20 (8). P. 15224–15272. doi: 10.3390/molecules200815224.

8. Othmani A., Ayed S., Slama-Ayed O., Slim-Amara H., Younes M. B. Durum wheat response (*Triticum durum* Desf.) to drought stress under laboratory conditions. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2019. Vol. 12 (2). P. 3–6. doi: 10.9790/2380-1202010104.
9. Sharma V., Kumar A., Chaudhary A., Mishra A., Rawat S., Basavaraj Y. B., Shami V., Kaushik P. Response of wheat genotypes to drought stress stimulated by PEG. *Stresses*. 2022. Vol. 2 (1). P. 26–51. doi: 10.3390/stresses2010003.
10. Bekka S., Abrous-Belbachir O., Djebbar R. Effects of exogenous proline on the physiological characteristics of *Triticum aestivum* L. and *Lens culinaris* Medik. under drought stress. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2018. Vol. 111 (2). P. 477–491. doi: 10.14720/aas.2018.111.2.20.
11. Chumakov M. I., Moiseeva E. M. Technologies of Agrobacterium plant transformation *in planta*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. P. 657–666. doi: 10.1134/S0003683812080017.
12. Bates L. S., Waldren R. P., Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soils*. 1973 Vol. 39. P. 205–207. doi: 10.1007/BF00018060.
13. Wellburn A. P. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 1994. Vol. 144 (3). P. 307–313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
14. Noor S., Ali S., Rehman H., Ullah F., Ali, G. M. Comparative study of transgenic (DREB1A) and non-transgenic wheat lines on relative water content, sugar, proline and chlorophyll under drought and salt stresses. *Sarhad Journal of Agriculture*. 2018. Vol. 34 (4). P. 986–993. doi: 10.17582/journal.sja/2018/34.4.986.993.
15. Gao H., Wang Y., Xu P., Zhang Z. Overexpression of a WRKY transcription factor TaWRKY2 enhances drought stress tolerance in transgenic wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. P. 997. doi: 10.3389/fpls.2018.00997.
16. Yu T. T., Xu Z. Z., Guo J. J., Wang Y. Y., Abernathy B., Fu J. J., Chen X., Zhou Y. Y., Chen M., Ye X. X. Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene SeCspA. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 27–25. doi: 10.1038/srep44050.
17. Meena M., Divyanshu K., Kumar S. Swapnil P., Zehra A., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R. S. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*. 2019. Vol. 5 (12). 02952. doi: 10.1016 %2Fj.heliyon.2019.e02952.
18. Kaur G., Asthir B., Bains N. Modulation of proline metabolism under drought and salt stress conditions in wheat seedlings. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2018. Vol. 55. P. 114–124. Retrieved from: <http://nopr.niscares.in/handle/123456789/44345>.

DUBROVNA O. V., PRIADKINA G. O.

Institute of Plant Physiology and Genetics of the Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17

THE EFFECT OF FREE PROLINE ACCUMULATION ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN TRANSGENIC WHEAT PLANTS

Aim. To analyze the effect of L-proline accumulation on chlorophyll content in transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene under physiological and stress conditions. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*; biochemical determination of free proline content; spectrophotometric determination of photosynthetic pigments content; of mathematical statistics. **Results.** It was shown that the content of free proline in the leaves of transgenic plants under physiological conditions was 1.7-1.9 times higher compared to the original genotype. Under conditions of drought, the content of this aminoacid increased in non-transformed plants of the original genotypes by 2.9-3.1 times, and in transgenic plants – by 4.5-4.9 times. The amount of chlorophyll in the flag leaves of plants of the original genotypes and their transgenic lines under physiological conditions did not differ significantly, while under drought conditions in the first of them it was 1.1-1.2 times less than in the second. Drought reduced the total chlorophyll content in plants of the original genotype to 85-90 %, compared to physiological conditions, while no significant changes were found in transgenic plants. **Conclusions.** It was established that under conditions of soil drought, the increase in proline content in genetically modified wheat plants compared to non-transgenic ones is accompanied by an increase in the amount of total chlorophyll (by 10-15 %), which indicates a better efficiency of their pigment apparatus under stressful conditions.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, proline, chlorophyll.