

КУЛЕШ С. С. ✉, ДУБРОВНА О. В., СЛИВКА Л. В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

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

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ПОКОЛІННЯ T₂ З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК- СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Мета. Провести фізіолого-біохімічний аналіз трансгенних рослин пшениці м'якої насінневого покоління T₂, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази. **Методи.** Біохімічне визначення вмісту вільного L-проліну та активності ферменту проліндегідрогенази; фізіологічна перевірка росту рослин в умовах *in vitro* та *in vivo*. **Результати.** Показано, що трансгенні рослини, на відміну від контрольних, ростуть на селективному середовищі з манітом інтенсивніше, зберігаючи зелене забарвлення. Встановлено, що як за нормальних умов, так і за умов водного дефіциту рослини насінневого покоління T₂ мають підвищений рівень вільного проліну в листках порівняно з контрольними генотипами. Виявлено, що трансформанти характеризуються зниженою активністю ферменту проліндегідрогенази, що проявляється за зміни умов норма – стрес – норма. Трансгенні рослини T₂ мали більш високу стійкість до водного дефіциту порівняно з вихідними, що відображалось в характері їх росту. В умовах дефіциту ґрунтової вологи врожайність більшості трансформованих ліній була значно вищою порівняно з нетрансформованими рослинами. **Висновки.** Отримані результати дозволяють зробити висновок, що використання векторної конструкції рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh* є ефективним для створення трансгенних рослин пшениці м'якої з підвищеним рівнем стійкості до водного дефіциту.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, РНК-супресор гена проліндегідрогенази, рослини T₂, фізіолого-біохімічний аналіз.

Розвиток генетики, молекулярної біології, розробка технологій отримання рекомбінантних молекул ДНК, створення арсеналу методів генетичної інженерії рослин відкрили нові можливості як для прикладних, так і для фундамента-

льних досліджень рослинних геномів. Тотипотентність клітин рослин та здатність їх геномів інтегрувати чужорідні гени призвели до того, що за останні 10 років з метою спрямованої зміни ознак більш ніж до 60 видів рослин, зокрема й пшениці, були застосовані методи генетичної інженерії [1, 2]. Вже сьогодні в умовах лабораторій можна отримувати рослини, стійкі до біотичних (комаха-шкідників, вірусних, бактеріальних, грибних інфекцій, пестицидів, гербіцидів) та абіотичних (екстремальної температури, посухи, засолення, токсичних металів, гербіцидів, ультрафіолетового опромінення) стресових факторів.

Серед абіотичних стресорів саме посуха і викликаний нею водний дефіцит завдає більшої шкоди рослинництву, ніж усі інші стресові фактори разом. Водний дефіцит впливає на процеси росту та розвитку сільськогосподарських рослин і в кінцевому результаті призводить до зниження їх продуктивності. Існує ряд досліджень, що пов'язують стійкість до водного дефіциту з вмістом вільного L-проліну в тканинах рослин, який активно синтезується у відповідь на стресовий чинник, виступаючи в якості осмомпротектора [3]. У стресових умовах рівень амінокислоти підвищується і вона діє як осмоліт, стабілізатор субклітинних структур, має антиоксидантну дію, контролює експресію генів стресової відповіді, діє як сигнальна молекула [4–6]. Тому для генетичного поліпшення культурних рослин розглядаються можливості використання генів, які контролюють синтез та катаболізм проліну [7, 8]. Для підвищення стійкості рослин використовують стратегію накопичення проліну шляхом зниження його деградації. Ключовим ферментом, що контролює катаболізм проліну, є проліндегідрогеназа [6, 7], яка каталізує перетворення проліну в глютамінову кислоту. Використання векторних конструкцій, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*), дає змогу отримати

рослини зі збільшеним вмістом вільного L-проліну і як наслідок більшою стійкістю до абіотичних стресів [9–11]. Є позитивний досвід введення таких конструкцій у рослини соняшнику та кукурудзи, що в результаті відрізнялися від контрольних підвищеним вмістом проліну [10, 11]. Припускається, що така конструкція за рахунок РНК-інтерференції є більш ефективною для збільшення рівня вільного L-проліну. Тим не менше, доцільність її використання для підвищення рівня стрес-стійкості рослин м'якої пшениці потребує детального аналізу на фізіолого-біохімічному рівні.

Нами шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in vitro* отримано трансгенні рослини м'якої пшениці сорту Зимоярка, які містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази [12]. Із цих даних рослин шляхом самозапилення отримано рослини насінневого покоління T₂, трансгенна природа яких була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *pdh* та *nptII*. У зв'язку з цим метою нашої роботи був фізіолого-біохімічний аналіз створених генотипів насінневого покоління T₂.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були рослини трансгенних ліній пшениці сорту Зимоярка покоління T₂. У якості контролю використовували нетрансформовані рослини того ж сорту. Для визначення рівня толерантності до водного дефіциту зрілі зародки з насіння рослин T₂ висаджували на середовище з 0,8 М маніту. Рослини з асептичної культури адаптували в ґрунт у квітні в умовах вегетаційного дослідження. Вирощування проводилось у вегетаційних посудинах об'ємом 10 л, наповнених ґрунтом. Ґрунт для вирощування брався однорідний, попередньо вимішувався, просіювався крізь сита з отвором 3 мм. Всі посудини наповнювалися однаковим об'ємом ґрунту.

Рослини вирощували в умовах вегетаційного дослідження за нормального поливу та в умовах ґрунтової посухи. Для імітації посухи рослини на стадії виходу в трубку переводили на обмежений полив. Тривалість штучної посухи становила три тижні. Протягом першого тижня вологість ґрунту підтримували на рівні 60 % від повного вологонасичення, протягом другого – 50 %, протягом третього – 40 %. Аналізували ріст рослин в умовах водного дефіциту, вміст проліну та структурні показники урожайності.

Для вимірювання активності ферменту проліндегідрогенази у трансформантів покоління T₂ і контрольних рослин сорту Зимоярка насіння висівали у 4 вегетаційні посудини об'ємом 10 л, наповнені ґрунтосумішшю. Рослини з двох посудин (контроль та трансгенні форми) знаходилися в умовах нормального поливу. Рослини з двох інших (контроль та трансгенні форми) для імітації посухи переводили на обмежений полив. Протягом 10 діб вологість ґрунту підтримувалася на рівні 40 % від повного вологонасичення. Активність ферменту вимірювали на 10 добу посухи. Після посухи для включення механізмів відновлення після стресу, рослини рясно поливали. Через добу вимірювали активність ферменту.

Оцінюючи структурні показники урожайності, враховували висоту рослин (ВР), довжину головного колоса (ДГК), кількість зерен у головному колосі (КЗГК), кількість зерен із рослини (КЗР), масу зерен із головного колосу (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 методику, запропоновану Чинардом, із модифікаціями [13]. Активність ферменту оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ на окислення проліну, вимірюючи збільшення концентрації НАДН, що утворилося за одиницю часу [14].

Результати та обговорення

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). Додатково трансгенні рослини поміщали на середовище з комплексом стресових чинників, яке містило 0,8 М маніту та 100 мг/л канаміцину, що дало змогу чітко ідентифікувати експресію трансгенів за фенотиповим проявом.

В умовах *in vivo* також спостерігалася підвищена стійкість трансформованих рослин до водного дефіциту. Більш висока стійкість до водного дефіциту рослин T₂ у порівнянні з вихідними знайшла відображення в характері їх росту. За нормального поливу середня висота рослин вихідного сорту і трансформантів була однаковою і становила в середньому 55 см. В умовах водного стресу на стадії виходу в трубку середня висота вихідних рослин становила приблизно

45 см, а стійкі рослини мали середню висоту 55 см (рис. 2).

Також було проведено вимірювання активності ферменту проліндегідрогенази у транс-

формантів покоління T₂ і у контрольних рослин сорту Зимоярка (рис. 3).

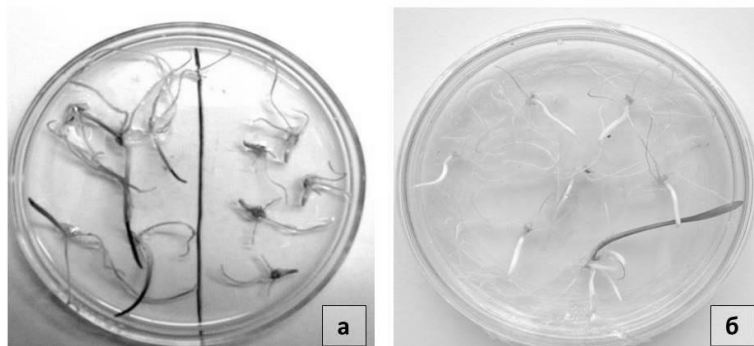


Рис. 1. Фенотиповий прояв ознак стійкості до стресових чинників у трансгенних рослин пшениці: *a* – ріст трансгенних рослин (лінія Зимоярка – 1/6) та нетрансгенних контрольних (сорт Зимоярка) на селективному середовищі з 0,8 М маніту; *б* – ріст зрілих зародків на середовищі з комплексним стресовим фактором: 0,8 М маніту + 100 мг/л канаміцину (лінія Зимоярка – 1/5).

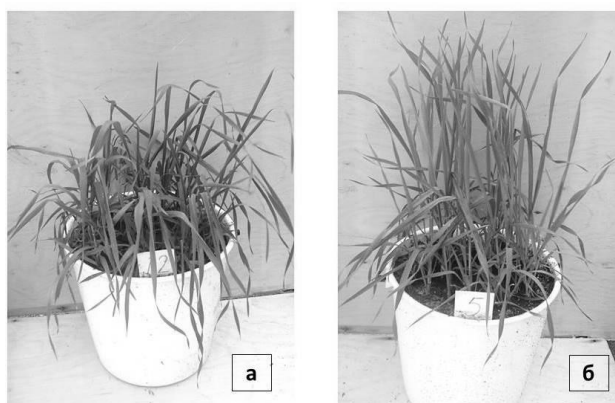


Рис. 2. Ріст рослин нетрансгенних (*a*) та трансгенних (*б*) форм.

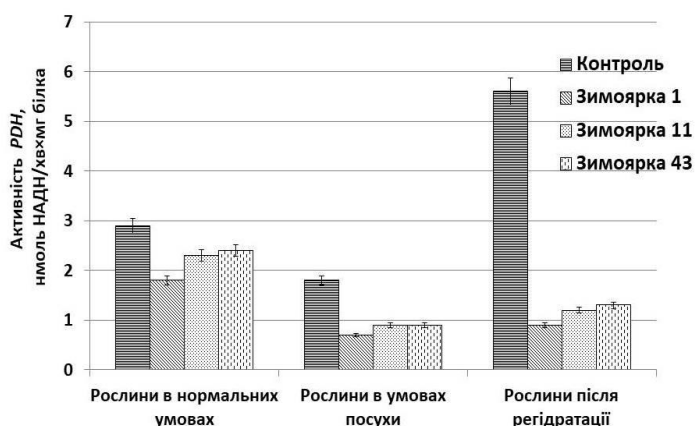


Рис. 3. Активність ферменту проліндегідрогенази в контролі та за умов посухи.

Як видно з рис. 3, трансгенні рослини в умовах нормального поливу мають дещо нижчий рівень активності ферменту. В стресових умовах експресія гена значно пригнічується як у контролі, так і у трансгенних форм. Однак в умовах відновлення після стресу у контрольних рослин активність PDH підвищується, в той час як у трансформантів активність ферменту не тільки не підвищується, а й стає меншою. Таким чином, трансформанти характеризуються зниженням активності ферменту проліндегідрогепази, що проявляється під час зміни умов норма – стрес – норма.

Рослини насіннєвого покоління T₂ характеризувалися підвищеним рівнем вільного проліну в листках (порівняно з контрольними рослинами) як за нормальних умов, так і за умов водного дефіциту (рис. 4). Загалом рівень вільного проліну в наших експериментах у трансгенних рослин вищий, ніж у контрольних, у 1,5–3 рази, а за умов водного дефіциту його концентрація підвищується у 4–5 разів. На ос-

нові отриманих даних можна зробити висновок, що рослини, які несуть дволанцюговий РНК-супресор гена *pdh*, характеризуються достовірно вищим вмістом вільного проліну. Таким чином, підвищений рівень цієї амінокислоти в трансформантів може відображати активність і ефективність використаної конструкції для супресії гена *pdh*.

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.). Трансформовані рослини лінії Зимоярка 1, 11, 43, 61, які знаходилися під дією осмотичного стресу, за показниками врожайності дещо поступалися контрольним, вирощеним за оптимальних умов.

Проте врожайність більшості трансформованих ліній була значно вищою порівняно з нетрансформованими рослинами, які знаходились в умовах дефіциту ґрунтової вологи.

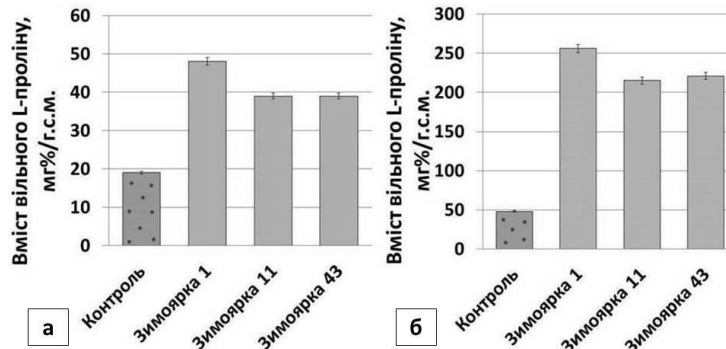


Рис. 4. Вміст вільного L-проліну в трансгенних рослин покоління T₂: а – за нормальних умов; б – в умовах посухи.

Таблиця. Показники структури врожаю рослин T₂ та контрольних рослин за дії осмотичного стресу

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	167,2±8,1	1,4±0,2	2,4±0,3	29,6±0,3
Контроль (+)	59,2±6,0*	6,6±1,2*	40,0±4,1	88,8±5,6*	0,8±0,1*	1,7±0,2*	23,4±1,8
Зимоярка-1	84,6±3,2*	9,7±0,9*	43,8±5,5	142,8±9,8*	1,2±0,1*	2,3±0,2*	27,0±0,6
Зимоярка-11	72,0±5,6	8,2±0,2	39,2±6,6	128,4±8,7	1,1±0,1	2,0±0,3	26,3±0,5
Зимоярка-43	85,2±5,2*	9,7±0,9	41,2±5,4	142,4±12,0	1,2±0,1	2,2±0,2	26,9±0,7
Зимоярка-61	86,8±4,0*	9,3±0,7	39,6±4,7	140,6±10,2	1,2±0,1	2,1±0,2	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 (-) – нетрансформовані рослини сорту Зимоярка, вирощені без осмотичного стресу, Контроль (+) – нетрансформовані рослини сорту Зимоярка, вирощені в умовах осмотичного стресу. *Різниця між контролем та дослідом достовірна за $p \leq 0,05$.

Висновки

Таким чином, використання векторної конструкції pVi2E, що містить дволанцюговий РНК-супресор гена *pdh*, є ефективним для створення трансгенних рослин м'якої пшениці з підвищеним рівнем осмотичності. Показано, що у досліджених генотипів у відповідь на дію осмотичного стресу активно відбувається накопичення вільного проліну. Встановлено, що трансгенні рослини не відрізняються від контрольних за морфологічними параметрами і строками розвитку. Виявлено позитивний зв'язок між

рівнем вільного проліну та стійкістю трансгенних рослин пшениці до осмотичного стресу, що може бути пов'язано або з впливом амінокислоти на експресію інших генів стресової відповіді рослин, або з позитивним впливом підвищеного вмісту цієї речовини на стійкість на ранніх етапах розвитку стресу.

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

References

1. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh M.B. Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica*. 2006. Vol. 149 (3). P. 353–366. doi: 10.1007/s10681-006-9087-6.
2. Sparks C., Doherty A., Jones H. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol Biol*. 2014. Vol. 1099. P. 235–250. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_19.
3. Kolodyazhna Ya.S., Kutsokon N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses. *Cytology and Genetics*. 2009. Vol. 43 (2). P. 72–93. [in Russian] / Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам. *Цитология и генетика*. 2009. Т. 43 (2). С. 72–93.
4. Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*. 2010. Vol. 39 (4). P. 949–962. doi: 10.1007/s00726-010-0525-3.
5. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*. 2008. Vol. 35 (4). P. 753–759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6.
6. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumele. *Mol. Biol. Rep.* 2013. Vol. 40 (4). P. 3269–3279. doi: 10.1007/s11033-012-2402-5.
7. Titov S.E. Poluchenie geneticheski modifitsirovannykh rastenii tabaka (*Nicotiana tabacum* L.), ekspressiruiushchikh antismyslovii supresor gena prolindegidrogenazy: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Novosibirsk, 2008. 18 p. [in Russian] / Титов С.Е. Получение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антитысловой супресор гена пролиндегидрогеназы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2008. 18 с.
8. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 1999. Vol. 461 (3). P. 205–210.
9. Manavalan L.P., Chen X., Clarke J., Salmeron J., Nguyen H.T. RNAi-mediated disruption squalene synthase improves drought tolerance and yield in rice. *Journal of Experimental Botany*. 2012. Vol. 63 (1). P. 163–175. doi: 10.1093/jxb/err258.
10. Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Matveyeva A.Yu., Kobernik N.I., Kochetov A.V., Tishchenko O.M., 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. [in Russian] / 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-супресором гена пролиндегидрогеназы. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46 (6). С. 482–489.
11. 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] / Комисаренко А.Г., Михальська С.И., Курчій В.М., Тищенко О.М. Характеристика трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.) з дволанцюговим РНК-супресором гена пролиндегидрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 19. С. 143–147.
12. Baval A.V., Dubrovna O.V., Goncharuk O.M., Voronova S.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using calli culture. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2014. Vol. 15. P. 16–19. [in Ukrainian] / Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням каллюсних культур. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т. 15. С. 16–19.
13. Andriushchenko V.K., Saianova V.V., Zhuchenko A.A., D'achenko 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] / Андриушенко 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.
14. Mattioni C., Lacerenza N.G., Troccoli A.D., 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. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01064.x.

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

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

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF TRANSGENIC WHEAT PLANTS OF SEED GENERATION T₂ WITH DOUBLE-STRANDED RNA SUPPRESSOR OF THE PROLINE DEHYDROGENASE GENE

Aim. To carry out physiological and biochemical analysis of genetically modified plants of bread wheat of seed generation T₂ with the double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. **Methods.** Biochemical determination of free L-proline content and activity of the enzyme proline dehydrogenase; physiological examination of plant growth *in vitro* and *in vivo*. **Results.** It has been shown that transgenic plants, in contrast to control groups, grow more intensively in a selective medium with mannitol, maintaining a green color. It has been established that under normal conditions and under conditions of water deficit, plants of the T₂ have an elevated level of free proline in the leaves, compared with the control genotypes. It was found that transformants are characterized by reduced activity of the enzyme of proline dehydrogenase, which manifests itself when the norm-stress-norm conditions change. Transgenic T₂ plants had a higher resistance to aqueous deficiency compared to baseline, which was reflected in the nature of their growth. In conditions of soil moisture shortage, the yield of the most of the transformed lines was significantly higher than non-transformed plants. **Conclusions.** The obtained results allow us to conclude that the use of the pBi2E vector construct with the double-stranded RNA suppressor of the *pdh* gene is effective for the production of transgenic bread wheat plants with a high level of resistance to water deficiency.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, T₂ plants, physiological-biochemical analysis.