

## ВИКОРИСТАННЯ ГЕНІВ МЕТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ В ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ РОСЛИН

О.В. ДУБРОВНА, С.І. МИХАЛЬСЬКА, А.Г. КОМІСАРЕНКО

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

E-mail: dubrovny@ukr.net

*В огляді літератури розглянуто фундаментальні та прикладні аспекти генетичної інженерії рослин, пов'язані з використанням генів, що контролюють синтез та катаболізм вільного проліну (Pro). Висвітлено роль цієї поліфункціональної амінокислоти в процесах формування стійкості рослин до абіотичних та біотичних стресів. Представлено сучасні дані про гени та ключові ферменти біосинтезу та деградації проліну, зокрема дельта-1-пірролін-5-карбоксилатсинтетаза (P5CS), проліндегідрогеназа (ProDH), орнітин-δ-аміотрансфераза (OAT), їх організацію та експресію в клітинах рослин. Проаналізовано основні напрями та можливості використання функціональних генів метаболізму Pro у генетичній інженерії рослин. Приділено увагу деяким членам сімейств генів транскрипційних факторів, які беруть участь у формуванні стійкості рослин до абіотичних та біотичних стресів, експресія яких позитивно корелює з експресією генів, що кодують ферменти метаболізму проліну. Узагальнено практичні результати досліджень вітчизняних та зарубіжних вчених із застосуванням генів синтезу та катаболізму проліну в генетичній інженерії злаків та інших культурних рослин. Представлено відомості про кількісні зміни вмісту цієї амінокислоти та рівень толерантності генетично модифікованих рослин однодольних та дводольних видів до різних абіотичних стресових чинників. Проаналізовано практичні розробки нового напрямку генетичної інженерії – кіРНК-технологій, його перспективність та можливості застосування для підвищення стійкості культурних рослин до екологічних стресів.*

**Ключові слова:** пролін, гени синтезу та катаболізму, трансгенні рослини, толерантність до стресових чинників.

### Вступ

Зростаючі загрози глобальних змін клімату та збільшення частоти екстремальних погодних явищ вимагають розробки нових стратегій в адаптації рослин до стресів. На даний час од-

ним із таких перспективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових генотипів культурних рослин, стійких до екологічних стресових чинників, є використання методів біотехнології, і зокрема, генетичної інженерії (Khan et al, 2015). Введення в геном реципієнта невеликого числа гетерологічних генів є швидким підходом до поліпшення толерантності рослин (Hiei et al, 2014). Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного чи декількох генів, які кодують або біохімічні шляхи, або кінцеві точки сигнальних шляхів. Ці генні продукти забезпечують певний захист проти екологічних стресів як безпосередньо, так і опосередковано. На даний час пошук регуляторних, сигнальних та структурних генів, здатних ефективно контролювати процеси стійкості до екологічних стресів, є одним із найбільш складних питань, оскільки їх функціонування може мати неоднозначні наслідки на процеси росту і розвитку на різних етапах онтогенезу рослин, а також їх продуктивність.

В останній час інтенсивно почали розроблятися новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів, шляхом інтеграції в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості (Wang et al, 2017; Joshi et al, 2017). Для генетичного поліпшення культурних рослин залучаються біотехнології, пов'язані із використанням генів, що контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин – органічних молекул, здатних в значних концентраціях накопичуватися в клітинах рослин за умов стресу, і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, досягнутий в останні десятиріччя в галузі фундаментальних дослід-

жень структурно-функціональної геноміки, теоретичних і практичних аспектів генетичної трансформації ряду культурних рослин (Hiei et al, 2014). За останні роки отримано низку важливих наукових результатів як фундаментального, так і прикладного характеру у галузі трансформації генами метаболізму проліну не тільки модельних, а й важливих сільськогосподарських рослин. У представленому огляді розглянуто літературні дані останніх років щодо фундаментальних аспектів генетичної інженерії рослин, пов'язаних з використанням генів, що контролюють синтез та катаболізм вільного проліну, а також узагальнено відомості про фізіолого-біохімічні характеристики трансгенних рослин, які несуть гени його метаболізму та вплив накопичення проліну на їхню стійкість до абіотичних стресів.

#### Пролін – поліфункціональний рослинний метаболіт

У відповідь на екологічні стреси рослини накопичують у клітинах низку метаболітів, найбільш відомими з яких є пролін, гліцин бетаїн, манітол, сорбіт, трегалоза, поліоли та поліаміни, які зазвичай нетоксичні та забезпечують захист рослин від стресу (Sharma et al, 2019). L-пролін (Pro) є одним із найбільш багатофункціональних стресових метаболітів у рослин (рисунок).

Його накопичення – добре відома фізіологічна реакція на осмотичний стрес, спричинений засоленням, посухою та іншими абіотичними факторами, при цьому відносний вклад різних біологічних функцій Pro у розвиток толерантності рослин може змінюватися залежно від стадії адаптаційного процесу, фази онтогенезу, природи, інтенсивності та тривалості дії стресового чинника.

Крім добре відомої функції як інертного сумісного осмоліту, Pro за дії стресорів виконує цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів (Hossain et al, 2014; Kolupaev et al, 2014; Meena et al, 2019), є джерелом енергії, підтримує вміст азоту та вуглецю (Sarker and Oba, 2020). Крім того, встановлено, що ця амінокислота виконує низку функцій, які не пов'язані з адаптацією рослин до дії стресорів, а необхідна для розвитку рослин у нормальних умовах.

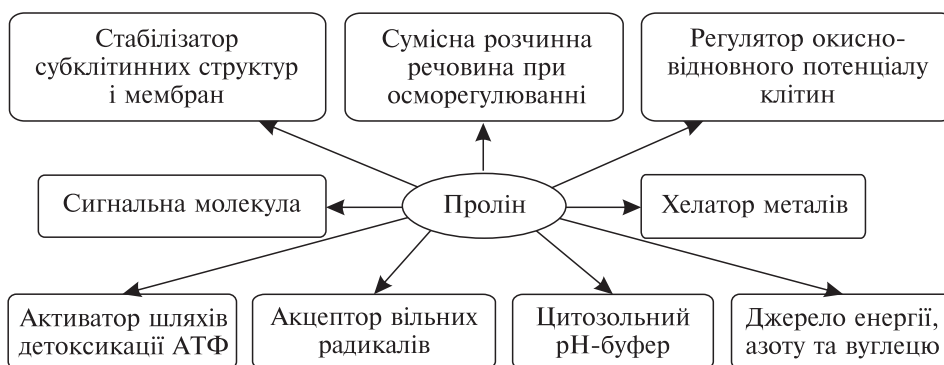
Показано, що значна кількість Pro транспортується в репродуктивні органи рослин, де його накопичення є сигналом до початку цвітіння (Schawacke et al, 1999), він необхідний для нормального розвитку пиляків та насіння (Funk et al, 2012). Розвивається також уявлення про пролін як фактор, пов'язаний з програмованою загибеллю клітин (Qamar et al, 2015) та його участь у реалізації морфогенетичного потенціалу при культивуванні *in vitro* (Tishchenko, 2013; Sergeeva et al, 2019). На користь останнього свідчать результати досліджень вмісту Pro у тканинах соняшника з різною здатністю до реалізації морфогенетичного потенціалу, де індукція пагоноутворення здійснювалася тільки з тканин з його підвищеним вмістом (Sergeeva et al, 2019).

#### Захисні функції проліну при дії стресу

Біохімічні та молекулярні механізми реалізації захисних функцій проліну під час стресу до кінця не встановлені і є предметом інтенсивних досліджень (Liang et al, 2013; Hossain et al, 2014; Kolupaev et al, 2014; Meena et al, 2019).

Пряма антиоксидантна (антирадикальна) функція для Pro не є основною, але він має явно виражені антиоксидантні властивості, зменшуючи вміст у клітині активних форм кисню (АФК). Вільний Pro, а також його кінцеві групи у складі поліпептидів, можуть прямо реагувати з пероксидом водню і синглетним киснем, формуючи стабільні вільні радикали – аддукти похідних проліну та гідроксипроліну (Liang et al, 2013; Kolupaev et al, 2014). Проте пряма реакція між пероксидом водню і Pro можлива лише за досить високих концентрацій  $H_2O_2$  (Kumar et al, 2012), що ставить під сумнів значення Pro для його детоксикації (Liang et al, 2013). Про антиоксидантні властивості Pro свідчить його здатність усувати індуквану  $H_2O_2$  фрагментацію ДНК та попереджати програмовану загибель клітин, зменшуючи вміст АФК (Qamar et al, 2015). Молекулярний механізм «гасіння» АФК за допомогою L-проліну в рослинах пояснюється у роботі (Matysik et al, 2002).

Як окрему функцію антиоксидантної дії Pro розглядається його здатність зв'язувати іони металів зі змінною валентністю і тим самим обмежувати неферментативні вільнорадикальні процеси (Liang et al, 2013; Kolupaev et al, 2014).



Основні функції проліну в клітинах рослин (за Hossain et al, 2014)

Завдяки своїм властивостям молекулярного шаперону він запобігає агрегації білків, попереджає денатурацію та стабілізує антиоксидантні ферменти (Liang et al, 2013; Hossain et al, 2014).

За високої концентрації ендogenous Pro також може діяти як регуляторна/сигнальна молекула, здатна змінювати рівні транскриптів генів, пов'язаних зі стресом, зокрема антиоксидантних ферментів (Carvalho et al, 2013). Так, ультрафіолет у поєднанні з Pro викликали диференціальну регуляцію активності різних форм супероксиддисмутази (SOD), локалізованих у різних клітинних компартментах рослин шавлії (Radyukina et al, 2011). Показано, що обробка екзогенним Pro підвищувала активність антиоксидантних ферментів, зокрема SOD, аскорбатпероксидази (APX), каталази (CAT) та пероксидази (POX) при дії іонного та окиснювального стресів у деяких видів рослин (Hossain et al, 2014; Meena et al, 2019). Разом з тим, Pro може діяти і як негативний регулятор експресії генів антиоксидантних ферментів, оскільки зменшення його кількості призводило до активації їхньої експресії (Szekely et al, 2008). У низці робіт повідомляється про реципрокні взаємовідносини між вмістом Pro та активністю антиоксидантних ферментів, зокрема SOD (Radyukina et al, 2007).

Антиоксидантна дія Pro також пов'язана з його здатністю захищати білково-ліпідні комплекси мембран та опосередковано зменшувати інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів шляхом інактивації гідроксильних радикалів та інших АФК (Saradhi et al, 1995; Kolupaev et al, 2019). Pro поряд з такими класичними антиоксидантами як глутатіон і аскорбінова кисло-

та є одним із компонентів системи клітинної редокс-сигналізації та редокс-регуляції (Aroga et al, 2016).

Фундаментальна роль проліну в осмотичній регуляції та підвищенні здатності рослин протистояти зневодненню клітин, викликаному засоленням, посухою або екстремальними температурами, досить добре вивчена (Hossain et al, 2014; Slama et al, 2015). Накопичення Pro як осмотично активної органічної речовини сприяє утриманню води в клітині. Вважається, що Pro діє як цитозольний рН-буфер, знижує осмотичний потенціал клітин, підтримуючи їхній тургор, одночасно мінімізуючи потенційно шкідливе збільшення іонної сили (Kaur and Asthir, 2015). Pro також знижує індукований NaCl відтік калію, що, ймовірно, поліпшує гомеостаз  $K^+$  у рослинних клітинах, таким чином, підвищуючи толерантність до абіотичного стресу (Hossain et al, 2014). Він також здатний підвищувати термодинамічну стабільність білків та захищати макромолекулярні структури (Slama et al, 2015). Pro може брати участь у регуляції окисно-відновного балансу клітин шляхом зміни співвідношення НАДФН/НАДФ $^+$  (Szabados, Savoure, 2009; Verslues, 2010; Kolupaev et al, 2014).

Підвищення рівня Pro – фізіологічна реакція багатьох видів рослин на різні типи абіотичних та біотичних стресів (Liang et al, 2013). В умовах стресового стану Pro починає накопичуватись, збільшується його біосинтез і зменшується його деградація (Yoshida et al, 1997). За стресових умов біосинтез Pro відбувається в цитозолі через шлях глутамату, але він також може синтезуватися в мітохондріях орнітино-

вим шляхом (Xue et al, 2009). Його позитивний вплив на підвищення толерантності до осмотичного стресу вперше спостерігали у лінії бактерій, надпродукуючих цю вільну амінокислоту (Szekely et al, 2008). У рослин накопичення Pro вперше було виявлено у пажитниці багаторічної (*Lolium perenne*) (Kemble, Macpherson, 1954). Пізніше численні повідомлення підтвердили накопичення Pro за різних стресів, таких як посуха (Saeedipur, 2013), окисний стрес (Yang et al, 2009), засолення (Sripinyowanich et al, 2013), охолодження (Luo et al, 2011), перезволоження (Xu et al, 2012), висока інтенсивність освітлення та ультрафіолету (Saradhi et al, 1995), дія важких металів (Bao et al, 2011) гама-опромінення (Jan et al, 2012) та ураження патогенами (Fabro et al, 2004). Відносно невисоке підвищення вмісту Pro, зазвичай на початку дії стресора, виконує регуляторну і антиоксидантну ролі, більш істотне (на більш пізніх стадіях стресової реакції) може виконувати осмопротекторні функції (Kolupaev et al, 2014).

Водночас, участь Pro у процесах адаптації/стійкості не завжди очевидна. Про це свідчать результати аналізу трансгенних рослин (Funck et al, 2008; Gerasimova et al, 2010; Dubrovna et al, 2021), а також порівняльного вивчення вмісту Pro і рівня толерантності деяких видів рослин (Su et al, 2011). Низка аспектів біологічної функції цієї вільної амінокислоти та ролі окремих генів у системі регуляції її метаболізму залишаються недостатньо вивченими і неоднозначними (Szabados and Savoure, 2009; Meena et al, 2019). Усі наявні дані свідчать, що метаболізм Pro має складний вплив на ріст рослин і реакції на стрес, проте немає сумнівів щодо його осмопротекторної функції у підвищенні їхньої толерантності до абіотичних стресів. У зв'язку з цим, значна увага приділяється розробці нового напрямку метаболічної інженерії рослин, який пов'язаний з ідентифікацією та аналізом структурних генів, що контролюють, зокрема, синтез та катаболізм проліну (Tishchenko, 2013).

#### Гени та ключові ферменти біосинтезу та деградації проліну

Ендогенний рівень Pro рослин у нормі і за осмотичного стресу скоординовано регулюється його синтезом, катаболізмом та транспор-

том (Szabados and Savoure, 2009). Ключовими ферментами синтезу й катаболізму Pro, є відповідно, дельта-1-пірролін-5-карбоксилатсинтетаза (P5CS, КФ 2.7.2.11.1.2.1.41), дельта-1-пірролін-5-карбоксилатредуктаза (P5CR, КФ 1.5.1.2), пірролін-5-карбоксилатдегідрогеназа (P5CDH, КФ 1.5.1.12), проліндегідрогеназа (ProDH, КФ 1.5.99.8) та орнітин-δ-амінотрансфераза (OAT, КФ 2.6.1.13). Синтез та катаболізм проліну добре вивчений і описаний в оглядах (Kishor et al, 2005; Verbruggen and Hermans, 2008; Szabados and Savoure, 2009; Liang et al, 2013; Kolupaev et al, 2014; Meena et al, 2019).

Для підвищення вмісту проліну біотехнологічними методами основну увагу сконцентровано на ключових генах, що кодують ферменти його метаболізму. Чисельні дослідження виявили, що накопичення Pro, в основному, контролюється підвищенням експресії генів, що беруть участь у його біосинтезі та зниженням експресії генів його катаболізму, коли рослини зазнають впливу різних стресів (Anwar et al, 2018). Стимуляція біосинтезу Pro за дії стресорів пов'язана зі збільшенням експресії генів *P5CS* та *P5CR* (Meena et al, 2019). Накопичення Pro регулюється рівнями транскрипції *P5CS* та *ProDH* (Verbruggen and Hermans, 2008). Низка досліджень свідчить, що *P5CS* є найважливішим ферментом у біосинтезі проліну в умовах абіотичного стресу (Savoure et al, 1995). Повідомлялося про підвищену експресію гена *P5CS* за осмотичного стресу в пшениці, ячменю, томату, проса прутподібного та хрїниці крупкової (Rana et al, 2016; Bandurska et al, 2017; Guan et al, 2019; Lopez-Galiano et al, 2019; Goharrizi et al, 2020). Під час стресових станів експресія *ProDH* та *P5CDH* пригнічується, коли індукується транскрипція *P5CS* (Hein et al, 2016; Anwar et al, 2018).

#### Шляхи синтезу та катаболізму проліну

Синтез Pro відбувається двома шляхами: з використанням в якості попередника глутамату або орнітину, що синтезується з аргініну (Anwar et al, 2018). Для багатьох видів рослин за стресових умов переважним є перший шлях, другий може здійснюватися за високої доступності азоту (Kishor et al, 2005; Lehman et al, 2010). Першим шляхом глутамат відновлюється до P5C за допомогою P5C-синтази

(P5CS). Крім того, рослини можуть синтезувати Pro через орнітиновий шлях, при якому орнітин спочатку перетворюється на P5C за допомогою OAT в мітохондріях, а потім P5C або перетворюється на глутамат за допомогою P5CDH, ініціюючи шлях глутамату (Funck et al, 2008), або переноситься у цитозоль для отримання Pro за допомогою P5CR (Miller et al, 2009). Злагоджена дія генів, що кодують P5CDH і P5CR, визначає остаточне використання P5C за дії стресу (Rizzi et al, 2015).

Катаболізм Pro відбувається шляхом послідовних дій ProDH та P5CDH, які перетворюють P5C на глутамат (Szabados and Savoure, 2009). Піролін-5-карбоксилат є загальним проміжним продуктом як біосинтезу проліну, так і шляхів його катаболізму (Rizzi et al, 2015; Anwar et al, 2018). Фермент деградації проліну P5CDH відіграє важливу роль у життєдіяльності рослин. Аналіз рослин арабідопсису, мутантних за геном *P5CDH*, показав, що акумуляція P5C призводить до програмованої загибелі клітин (Qamar et al, 2015). Катаболізм Pro у мітохондріях може спричинити посилення утворення АФК (Miller et al, 2009). У рослин арабідопсису за реакції надчутливості на інфікування збудником бактеріальної хвороби томату (*Pseudomonas syringae pv tomato DC3000 AvrRpm1*) накопичення Pro супроводжувалося посиленням експресії гена *ProDH*, підвищенням активності цього ферменту і, як наслідок, збільшенням кількості P5C (Cecchini et al, 2011). У даної культури при інфікуванні цим самим авірулентним патогеном спостерігалося накопичення транскриптів гена *AtP5CS2* та підвищений вміст Pro (Fabro et al, 2004). У поєднанні з АФК P5C може функціонувати як тригер реакції надчутливості та апоптозу (Fabro et al, 2004).

Глутаматний шлях біосинтезу Pro добре відомий у рослин, але шлях орнітину недостатньо вивчений. Подібно до глутаматного шляху виявлено, що орнітиновий шлях відіграє значну роль за стресових умов у трансгенних рослин (You et al, 2012; Anwar et al, 2018). У кількох дослідженнях показано кореляцію між активністю OAT та біосинтезом Pro у трансгенних рослинах за умов водного дефіциту та засолення (Roosens et al, 2002; Wu et al, 2003; Anwar et al, 2021).

Синтез проліну ензимами P5CS і P5CR відбувається у хлоропластах і цитоплазмі, тоді як його катаболізм ферментами ProDH і P5CDH – у мітохондріях. У разі альтернативного шляху P5C генерується мітохондріальною OAT, а його перетворення до Pro здійснюється ензимом P5CR у цитоплазмі (Kishor et al, 2005; Szabados and Savoure, 2009).

Чи синтезується Pro за допомогою шляхів глутамату або орнітину, як пролін функціонує протягом стресу все ще обговорюється, оскільки існує два можливі механізми: (1) накопичення проліну, який служить осмолітом за допомогою регуляції шляхів біосинтезу Pro; та (2) зміна метаболічного потоку Pro під час стресу, що призводить до захисту клітин шляхом підтримки їх енергії та активації інших сигнальних шляхів, що сприяють виживанню клітин.

При розробці генно-інженерних біотехнологій слід враховувати деякі особливості ферментів синтезу Pro, зокрема те, що P5CS піддається зворотному інгібуванню проліном як у нормі, так і в умовах абіотичного стресу (Hong et al, 2000). Внаслідок цього може, хоча і рідко, досягатися фізіологічно значимий рівень його акумуляції для підвищення стійкості рослин. Подолати такі обмеження можна з використанням мутантного гена *P5CS*, експресія якого приводить до порушення негативного зворотного зв'язку активності ферменту P5CS та Pro (Kumar et al, 2010; Pospisilova et al, 2011). Функціонування OAT також залежить від рівня Pro, проте на її активність він безпосереднього впливу не чинить (Roosens et al, 1998).

Щодо ролі OAT, то є неоднозначні думки. Низка дослідників підтримує концепцію про істотну роль OAT у рециркуляції азоту через шлях аргініну, що не пов'язано з біосинтезом Pro (Funck et al, 2008; Gerasimova et al, 2011). Хоча роль OAT у підтриманні стійкості рослин до осмотичних стресів і акумуляції Pro до кінця не визначена, а наявна інформація з цього питання досить суперечлива, в літературі є окремі припущення щодо можливого механізму дії ферменту. Так, у ряді досліджень показано, що цим ферментом каталізується перетворення низки амінокислот (у тому числі і проліну), які пов'язані зі стійкістю до різних

абіотичних стресів (Canas et al, 2008; Gerasimova et al, 2011; Anwar et al, 2018). Постулюють також, що ОАТ регулює деградацію орнітину і пов'язана з системою рециркуляції азоту (Funck et al, 2008). Нещодавно виявлена взаємодія генів *AtOAT* у ліній гексаплоїдної пшениці з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу проліну та катаболізмом аргініну, підтверджує, що вони беруть участь у синтезі Pro та ремобілізації азоту (Anwar et al, 2020).

Крім цього, орнітин вважають попередником таких протекторних і регуляторних сполук як поліаміни, що залучені в дуже багато функцій рослин, у тому числі пов'язаних з адаптацією до дії стрес-факторів. Захисні ефекти поліамінів можуть бути зумовлені стабілізацією макромолекул (білків, нуклеїнових кислот) та мембранних структур, прямою дією як скавенджерів кисневих радикалів та можливих інгібіторів НАДФН-оксидази (Kolupaev and Kokorev, 2019). Як ймовірні сигнальні сполуки вони можуть індукувати антиоксидантні ферменти (Kolupaev et al, 2019).

#### Організація та експресія генів метаболізму проліну

Відомості про організацію та експресію генів, що регулюють метаболізм проліну, є для обмеженого кола одно- і дводольних видів рослин. Головним чином досліджені гени *P5CS*. На прикладі рису і арабідопсису показано, що вони складаються з 20 екзонів і 19 інтронів. У ядерному геномі цих рослин міститься по 2 копії *P5CS*, які мають досить високий рівень гомології полінуклеотидних послідовностей ДНК. Основні відмінності стосуються змін розмірів їхніх інтронів (Hu et al, 2008; Turchetto-Zolet, 2009; Saeid et al, 2011).

Показано високий рівень гомології генів *ProDH* у арабідопсису, тютюну та сої (Miller et al, 2005). Гени *P5CDH* представлені у багатьох рослин в однині. Порівняльний аналіз генів *P5CDH* злакових (пшениці, кукурудзи, рису, ячменю) показав консервативність структури полінуклеотидних послідовностей їхньої ДНК (Ma et al, 2009). Нещодавні дослідження (Anwar et al, 2020) виявили три гомеологічні гени ОАТ у геномі пшениці (*TaOAT-5AL*, *TaOAT-5BL* і *TaOAT-5DL*), які складаються з 10 екзонів і 9 інтронів. Підтверджена їхня роль у біо-

синтезі проліну через взаємодію з генами *P5CS* і *P5CR*. Аналіз промотору виявив наявність кількох елементів, які реагують на стрес, що означає їхню участь у регуляції стресу. Високий рівень гомології екзонів генів як синтезу, так і катаболізму Pro дозволяє їхню використання в гетеро- і гомологічних системах для підвищення рівня його накопичення.

Гени, що контролюють синтез та катаболізм Pro, можуть диференційно транскрибуватися у різних органах рослин і у відповідь на різні типи стресорів (Su et al, 2011). В умовах стресу експресія генів *P5CS* і *ProDH* тютюну здійснюється диференційно (Maggio et al, 2002; Ribaritz et al, 2007; Dobra et al, 2011). Аналіз мутантних за генами *P5CS1* і *P5CS2* рослин арабідопсису виявив, що перший з них переважно функціонує у відповідь на осмотичні стреси або дію абсцизової кислоти (Sharma et al, 2011). Зниження рівня Pro у таких рослинах супроводжувалося накопиченням АФК, що свідчить про антиоксидантні властивості Pro. У геномі рису також містяться 2 гени *P5CS*, один з яких (*OsP5CS1*) експресується у вегетативних та репродуктивних органах, тоді як інший (*OsP5CS2*) переважно індукується в умовах стресу і функціонує у тканинах зрілих рослин (Hug et al, 2004). Посилену експресію *TaOAT* спостерігали у тичинках і на етапі розвитку квітки пшениці (Anwar et al, 2020). Більше того, зміни рівня експресії генів під впливом одного стресора паралельно можуть призводити до підвищення толерантності трансгенних рослин і до інших типів абіотичних чинників (Mykhalska et al, 2021). Щодо генів *ProDH* рослин відомо, що їхня експресія переважно регулюється на транскрипційному рівні де- і регідратацією, а також екзогенним L-проліном. У відповідь на стрес кількість мРНК зменшується, а при регідрації- накопичується (Servet et al, 2012).

Використовуючи доступні дані мікрочіпів та кількісну ПЛР у реальному часі, було досліджено профілі експресії генів, що кодують ключові ферменти біосинтезу та деградації Pro, зокрема ОАТ, *P5CS*, *P5CR* та *ProDH* (Arabia et al, 2021). Перевірка генів-кандидатів у рисі за допомогою даних *in silico* дала вагомі докази їхньої участі у реакції на стрес. Зауважимо, що *OsOAT*, *OsP5CS1*, *OsP5CS2*, *OsP5CR* показали подібну картину експресії у кількісних резуль-

татах ПЛР порівняно з даними мікрочіпів. Однак *OsProDH* показав іншу модель експресії, яка може бути пов'язана з генотипною варіацією. Крім того, біохімічний аналіз підтвердив накопичення проліну в стресових умовах.

#### Взаємодія генів метаболізму проліну з регуляторними генами

На сьогоднішній день гени, що реагують на стрес, об'єднані у дві категорії (Shinozaki et al, 2003). Одна категорія включає функціональні гени, що кодують важливі метаболічні ферменти, такі як осмозахисні білки, ферменти детоксикації, водні канали та білки пізнього ембріогенезу. Гени, що кодують OAT, P5CDH, P5CS, P5CR та ProDH відносяться до цієї категорії. Інша категорія включає регуляторні гени, такі як транскрипційні фактори. Зареєстровано кілька сімейств генів транскрипційних факторів, які беруть участь у формуванні стійкості до абіотичних та біотичних стресів у рослин, включаючи WRKY, bZIP, MYB, NAC та AP2/ERF (Udvardi et al, 2007; Gollack et al, 2011). Експресія деяких членів цих сімейств позитивно корелює з експресією генів, що кодують ферменти метаболізму проліну (OAT, P5CDH, P5CS та P5CR). Наприклад, SNAC2, який був ідентифікований та клонований у рисі, посилює експресію генів *OAT* у трансгенних рослинах (Hu et al, 2006; You et al, 2012). Подібним чином ERF1-V із сімейства генів AP2/ERF підвищує експресію генів *OAT*, *P5CS* та *P5CR* у пшениці (Xing et al, 2017). Індукція транскрипції *ProDH* рослин арабідопсису може здійснюватись за участі транскрипційного фактора bZIP (AtbZIP11), який, у свою чергу, індукується сахарозою (Hanson et al, 2008). У промоторі генів *ProDH* цих рослин ідентифікований cis-діючий елемент АСТСАТССТ, необхідний для активації транскрипції у відповідь на гіпоосмолярність (Sato et al, 2004). Кінець цього елемента (АСТСАТ), названий пролін-реагуючим елементом (PRE), також виявлений у промоторному регіоні низки індукційних регідратацією і проліном генів (Oono et al, 2003). Крім cis-діючого елемента транскрипційного фактора bZIP у промоторі гена *ProDH* арабідопсису знаходяться cis-діючі елементи інших транскрипційних факторів, зокрема MYB і MYS (Nakashima et al, 1998), деякі чле-

ни яких також можуть бути компонентами загальної системи генетичної регуляції процесів адаптації/стійкості рослин. Аналіз *in silico* сайтів початку трансляції генів *A. thaliana* (*AtOAT*, *AtP5CS1*, *AtP5CS2*, *AtP5CR*) виявив декілька передбачуваних cis-регуляторних елементів, які розпізнаються різними класами транскрипційних факторів, включаючи AP2/EREBP, MYB, WRKY, bZIP і HD-HOX (Fichman et al, 2015). Подібні результати були отримані, коли передбачувані cis-регуляторні елементи були досліджені у рисі (Zarattini et al, 2017).

Однак існують відмінності у функціонуванні генів рослин, що беруть участь у контролі стрес-індукованого накопичення проліну глутаматним та орнітиновим шляхами. Зокрема, під час тривалого і сильного осмотичного стресу у ріпаку детектували експресію гена *BnOAT* (Xue et al, 2009). У рослин арабідопсису на ранніх етапах їх розвитку в умовах сольового стресу відбувалася транскрипція не тільки гена *AtP5CS1*, але й *OAT* (Roosens et al, 1998). Ці дані свідчать про участь і глутаматного, і орнітинового шляхів у накопиченні проліну.

Інтеграція в геном рослин трансгенів, що кодують стрес-індуцибельні транскрипційні фактори у багатьох випадках пов'язана з акумуляцією L-проліну. Зокрема, це стосується трансгенних рослин пшениці (Wang et al, 2006), риса, де відбувалася надекспресія гена *JERF3* томату (Zhang et al, 2010) і його власного гена *OsMYB3R-2* (Ma et al, 2009), арабідопсису, у якого була виявлена експресія гена *ZmbZIP72* кукурудзи (Ying et al, 2012). Разом з тим, у трансгенних рослинах тютюну з функціональним геном кукурудзи *ZmABI5*, що є негативним регулятором транскрипції генів, пов'язаних зі стрес-стійкістю, навпаки, вміст вільного Pro знижувався (Yan et al, 2012). У низці досліджень, пов'язаних з генами транскрипційних факторів, показані зміни у рівні транскрипції генів метаболізму і транспорту Pro. Зокрема, це стосується гена *OAT* трансгенних рослин риса, в яких відбувалася надекспресія гена свого власного транскрипційного фактора SNAC2 (Hu et al, 2008), гена *P5CS* люцерни, що містить транскрипційний фактор сої GmDREB1 (Jin et al, 2010), генів синтезу і транспорту проліну трансгенних *OsMYB2*-рослин риса (Yang et al, 2012).

### Практичні результати використання генів метаболізму проліну в генетичній інженерії рослин

Молекулярні біотехнології на основі використання генів метаболізму L-проліну становлять інтерес для створення ліній трансгенних рослин з підвищеним рівнем осмотолерантності. Ефективність таких технологій, спрямованих на підвищення рівня акумуляції вільного L-проліну, залежить від багатьох факторів, у тому числі від типу стресора, виду рослини, використаних трансгенів і промоторів. Для підвищення рівня накопичення Pro застосовуються дві основні стратегії: 1 – додаткове введення копій кДНК, відповідальних за його синтез (*P5CS* або *OAT*); 2 – часткова супресія ендегенних генів катаболізму проліну *ProDH*, які контролюють перший етап його гідролізу. Найчастіше в молекулярних біотехнологіях застосовують векторні конструкції, створені на основі клонуваних генів *P5CS* вігні і *ProDH* арабідопсису, *OAT* арабідопсису та люцерни (таблиця).

#### Ген *P5CS*

Перше дослідження, яке показало можливість використання гена *P5CS* для підвищення рівня толерантності рослин до водного дефіциту, було проведено Кішор і співавт. (Kishor et al, 2005) на модельному об'єкті – тютюні. Інтеграція гена *P5CS* і його експресія в рослинах призводила до підвищення активності ферменту *P5CS* та 10–18-кратного збільшення вмісту Pro порівняно з контролем. При цьому в умовах водного дефіциту зменшувався осмотичний потенціал, збільшувалась біомаса коренів, покращувався розвиток квітів. Показано, що рослини тютюну з геном *P5CS* вігні мали підвищений рівень толерантності і до засолення (300 мМ NaCl) (Razavizadeh and Ehsanpour, 2010). Виявлено значне накопичення мРНК *P5CS* у листках і коренях трансгенних рослин та збільшення активності САТ і АРХ. Припущено участь гена *P5CS* у регуляції акумуляції проліну в умовах засолення. Спільно експресовані гени *OsP5CS1* і *OsP5CS2* рису в геномі тютюну підвищували накопичення Pro та зменшували окиснювальне пошкодження клітин в умовах водного дефіциту, засолення та дії важких металів (Zhang et al, 2014). Вод-

ночас показано, що високий рівень ендегенного Pro, накопиченого в листках трансгенних рослин тютюну, що несуть мутантний ген *P5CS* вігні, не сприяє осмотичній регуляції за водного дефіциту (Borgo et al, 2015). Акумуляція Pro в листках, навіть на рівні, що у 10 разів перевищує норму, не порушувала ультраструктуру хлоропластів і мітохондрій як при зрошенні, так і при дефіциті вологи. Це дослідження свідчить, що у тютюні високий рівень ендегенного Pro може бути і не пов'язаний з осмотичною регуляцією.

Підвищення рівня толерантності до водного дефіциту і/або засолення також було показано для низки трансгенних рослин однодольних та дводольних видів (Su and Wu, 2004; Yamada et al, 2005; Verdoy et al, 2006; Vendruscolo et al, 2007; Karthikeyan et al, 2011; Ghanti et al, 2011; Chen et al, 2021) в яких відбувалась надекспресія гена *P5CS*, що супроводжувалось акумуляцією Pro. Зокрема, у трансгенних рослин пшениці (Sawahel and Hassan, 2002; Vendruscolo et al, 2007), рису (Su and Wu, 2004; Karthikeyan et al, 2011), моркви (Han, Hwang, 2003), які експресують ген *P5CS* вігні, показано накопичення L-проліну та підвищення толерантності до водного дефіциту і засолення. В умовах стресу відзначено прискорений ріст пагонів і коріння та накопичення більшої біомаси. Передбачається, що толерантність *P5CS*-рослин може бути пов'язана з участю Pro у молекулярних механізмах стійкості, викликаних оксидативним стресом.

Генетично змінені рослини люцерни з надекспресією гена *P5CS* вігні накопичували значну кількість Pro і характеризувалися підвищеним рівнем осмотолерантності (Verdoy et al, 2006). Показана як тканинспецифічна, так і індукована осмотичним стресом експресія ендегенних генів метаболізму проліну *M. truncatula* – *MtP5CS1*, *MtP5CS2*, *MtOAT*. Цікавим є той факт, що підвищений рівень осмотостійкості не тільки супроводжувався акумуляцією L-проліну, але й зниженням негативного впливу засолення на азотфіксуювальну здатність. У трансгенних рослин нуту, що містять кДНК *P5CS* вігні, згідно з результатами виходу електролітів і стабільності хлоропластів, виявлено підвищення рівня толерантності до сольового стресу. В умовах хлоридного засолення



Застосування генів синтезу та катаболізму L-проліну для підвищення рівня толерантності культурних рослин до абіотичних стресів

Трансген	Вміст Pro та толерантність рослин до абіотичних стресів	Посилання
<i>Арабідонсис</i>		
<i>AtP5CS1 (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Зниження толерантності до високих температур.	Lv et al, 2011
<i>VyP5CR (Vitis yeshanensis)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту, засолення, холоду	Chen et al, 2021 Nanjo et al, 1999
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення та низьких температур.	Mani et al, 2002
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Вміст Pro знижувався за смислової орієнтації гена і підвищувався за антисмислової. В умовах сольового стресу трансгенні рослини не показували змін рівня толерантності.	
<i>Голубиний горох</i>		
<i>P5CSF129A (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Surekha et al, 2013
<i>Картопля</i>		
<i>AtP5CS (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Hmida-Sayari et al, 2005
<i>Кукурудза</i>		
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Moiseeva et al, 2012
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту	Mykhalska et al, 2014
<i>Люцерна</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro Підвищення осмотолерантності.	Verdoy et al, 2006
<i>Морква</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Han and Hwang, 2003
<i>Нут</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Ghanti et al, 2011
<i>Петунія</i>		
<i>AtP5CS (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Yamada et al, 2005
<i>OsP5CS (Oryza sativa)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Yamada et al, 2005
<i>Просо прутноподібне</i>		
<i>LpP5CS (Lolium perenne)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Guan et al, 2019
<i>Пшениця</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Sawahel and Hassan, 2002
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Vendruscolo et al, 2007

Трансген	Вміст Pro та толерантність рослин до абіотичних стресів	Посилання
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Dubrovna et al, 2020; Mykhalska et al, 2021
<i>MtOAT (Medicago truncatula)</i>	Накопичення Pro не встановлено. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Dubrovna et al, 2021; Mykhalska et al, 2021
<i>AtOAT (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту та засолення	Anwar et al, 2021
<i>Рис</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту та засолення	Su and Wu, 2004
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Zhu et al, 1998
<i>P5CSF129A (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Kumar, 2010
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Підвищення толерантності до засолення	Karthikeyan et al, 2011
<i>AtOAT (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту та засолення.	Wu et al, 2003
<i>Соняшник</i>		
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту та засолення.	Komisarenko et al, 2016
<i>Соя</i>		
<i>GmP5CS (Glycine max)</i>	Вміст Pro знижувався за антисмислової орієнтації гена і підвищувався за смислової. Підвищення толерантності до водного дефіциту та високих температур не встановлено.	De Ronde et al, 2000
<i>StP5CS (Solanum torvum)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Zhang et al, 2015
<i>Тютюн</i>		
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Razavizadeh and Ehsanpour, 2010
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Kishor et al, 2005
<i>VaP5CS (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту не встановлено.	Borgo et al, 2015
<i>OsP5CS1 i OsP5CS2 (Oriza sativa)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту, засолення та важких металів.	Zhang et al, 2014
<i>P5CSF129A (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Pospisilova et al, 2011
<i>P5CSF129A (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Hong et al, 2000
<i>P5CSF129A (Vigna aconitifolia)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту.	Gubis et al, 2007
<i>AtProDH (Arabidopsis thaliana)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до водного дефіциту, низьких температур та засолення.	Titov, 2008; Ibragimova et al, 2012

Трансген	Вміст Pro та толерантність рослин до абіотичних стресів	Посилання
<i>NtProDH (Nicotiana tabacum)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення.	Tateishi et al, 2005
<i>MtOAT (Medicago truncatula)</i>	Накопичення Pro. Підвищення толерантності до засолення	Roosens et al, 2002
<i>MtOAT (Medicago truncatula)</i>	Накопичення Pro не встановлено. Підвищення толерантності до засолення.	Gerasimova et al, 2010

також відбувалось накопичення Pro. Рослини, вирощені в умовах постійного засолення, утворювали життєздатне насіння без втрати врожайності (Ghanti et al, 2011).

Показана підвищена толерантність до водного дефіциту трансгенних рослин петунії, що містять гени *P5CS* рису або арабідопсису. У нормальних умовах генетично модифіковані рослини накопичували у 1,5–2,6 рази більше L-проліну, ніж нетрансгенний контроль. Обробка екзогенним Pro викликала його акумуляцію і обмежувала швидкість росту рослин дикого типу більшою мірою, ніж трансгенних. На швидкість росту генетично змінених рослин впливали концентрація проліну і співвідношення його вмісту до загальної кількості амінокислот (Yamada et al, 2005). Ген *P5CS* арабідопсису був перенесений і в картоплю (Hmida-Sayari et al, 2005) з метою підвищення толерантності до сольового стресу. Трансгенні рослини мали більш високий вміст Pro порівняно з контролем, що корелювало з підвищеною толерантністю до сольового стресу (100 мМ NaCl), проте відбувалось зниження врожаю та маси бульб.

Отримані трансгенні лінії проса прутноподібного з геном *LpP5CS* пажитниці багаторічної були поділені на дві групи на основі їхніх фенотипів та вмісту Pro. Лінії групи I мали відносно високий вміст Pro та підвищений вихід біомаси, у той час як лінії групи II показали низький рівень Pro, значну затримку росту та цвітіння, зниження біомаси. Під час сольового стресу фізіологічні параметри та рівні експресії генів, пов'язаних із знешкодженням реактивних форм кисню, вказували на те, що рослини групи I мали значно вищу стійкість до засолення порівняно з рослинами контролю, на відміну від рослин групи II (Guan et al, 2019).

Для підвищення стійкості до засолення ген *P5CS* від *Solanum torvum* був перенесений у геном сої (Zhang et al, 2015). Надекспресія *StP5CS* збільшувала вміст Pro, знижувала рівень перикисного окиснення мембранних ліпідів та підвищувала солестійкість рослин T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub>. Висота рослин, площа листків, відносний вміст хлорофілу та кількість стручків були значно вищими у генетично змінених рослин, ніж у рослин дикого типу.

Вплив накопичення Pro на термочутливість досліджували за допомогою трансгенних рослин арабідопсису, ектопічно експресуючих ген *AtP5CS1*. Під час теплового стресу, індукованого температурою 50 °C, його експресія посилювала біосинтез Pro. Показано пригнічення росту рослин з надмірним продукуванням Pro порівняно з контрольними, що виявлялося нижчим рівнем виживання, вищим витоком іонів, збільшенням АФК та рівня малонового діальдегіду. У всіх трансгенних лініях, надпродукуючих Pro, після термічної обробки значно підвищилася активність антиоксидантних ферментів – SOD, KAT та гваяколпероксидази порівняно з нетрансгенним контролем, проте активність глутатіонредуктази та APX залишалась майже незмінною. Показано, що накопичення Pro під часу теплового стресу знижує термотолерантність, ймовірно, шляхом збільшення виробництва АФК через цикл Pro/P5C та інгібування біосинтезу абсцизової кислоти та етилену (Lv et al, 2011).

Ген *P5CR* винограду був вбудований у геном арабідопсису (Chen et al, 2021) для підвищення стійкості до водного дефіциту. Тканиноспецифічний аналіз показав, що *VvP5CR* може експресуватися у різних органах, проте найбільше – у корінні. На середовищі, що містить маніт, трансгенні рослини показали підвищен-

ну виживаність, накопичення Pro, збільшення активності SOD та POX, зменшення продохів, а також кращий ріст коренів. Крім того, *YuP5CR*-рослини мали підвищену експресію пов'язаних із посухою генів *COR15A*, *COR47*, *DREB2A*, *KINI*, *NCED3* та *RD29A*.

Слід зауважити, що у трансгенних рослинах з надекспресією гена *P5CS*, рівень Pro може не підвищуватись до осмотично істотного рівня. В цьому випадку, очевидно, активність *P5CS* інгібується своїм продуктом за типом зворотного зв'язку або Pro швидко катаболізується до глутамату (Maggio et al, 2002). Одне з біотехнологічних рішень цього питання пов'язане з порушенням негативного зворотного зв'язку Pro та активності *P5CS* за рахунок сайт-специфічної мутації за геном *P5CS*. Зокрема, отриманий і клонований ген *P5CSF129A*, при вбудовуванні якого в нормі і при стресі відбувалась акумуляція Pro (Hong et al, 2000). Так, у трансгенних  $T_1$ -рослинах рису його надекспресія в умовах засолення (150 мМ NaCl) призводила до накопичення Pro, зниження рівня окиснення ліпідів та підвищення толерантності до сольового стресу, покращення фізіологічних показників (Kumar et al, 2010). У трансгенних рослинах тютюну, конститутивно надекспресуючих ген *P5CSF129A*, крім акумуляції Pro відзначали підвищення ефективності використання води та поліпшення деяких показників фотосинтезу, зокрема вмісту хлорофілу. Дефіцит вологи призводив до зменшення всіх параметрів газообміну і зниження вмісту хлорофілу, однак при цьому збільшувалася кількість пігментів ксантофільного циклу (Pospisilova et al, 2011). Сурєка та співав. (Surekha et al, 2013) також трансформували голубиний горох геном *P5CSF129A*. Отримані трансгенні рослини  $T_1$  за дії сольового стресу (200 мМ NaCl) накопичували в 4 рази більше Pro порівняно з нетрансгенними та краще розвивалися. У них відзначений більший вміст хлорофілів, відносний вміст води та нижчі рівні перекисного окиснення ліпідів під час стресу.

Водний дефіцит, що моделювався манітолом за температури 32 і 42 °С, спричиняв підвищення вмісту Pro у нетрансгенних рослин сої, у той час як часткова супресія гена *P5CR* у генетично змінених рослин, що несуть антисмисловий супресор цього гена, навпаки при-

води до зниження рівня біосинтезу Pro (De Ronde et al, 2000). Таким чином, було підтверджено зв'язок між трансляцією *P5CR* та накопиченням Pro, оскільки його акумуляція була помітно зменшена внаслідок введення антисмислового супресора гена *P5CR*.

### Ген *ProDH*

Ген проліндегідрогенази, пов'язаний з катаболізмом Pro, має практичне значення для генетичної інженерії, оскільки часткове пригнічення його експресії може приводити до підвищення вмісту Pro і, як наслідок, рівня толерантності рослин до абіотичних стресів (Tishchenko, 2013).

Щоб дослідити роль Pro-катаболізму у рослинах, були створені трансгенні форми арабідопсису зі зміненими рівнями *ProPDH* за допомогою смислової (рослини *ProPDH-S*) та антисмислової (рослини *ProPDH-AS*) стратегій (Nanjo et al, 1999; Mani et al, 2002). Трансгенні рослини *ProPDH-AS* накопичували більше Pro, ніж рослини дикого типу, були більш толерантними до низьких температур та засолення (Nanjo et al, 1999). Показано зниження до 50 % вмісту Pro у рослинах *ProPDH-S* в умовах сольового стресу та збільшення його кількості на 25 % у рослин *ProPDH-AS*, незважаючи на значне варіювання рівнів їхніх мРНК і ферментного білка (Mani et al, 2002). Подібна тенденція рівня Pro спостерігалася в насінні рослин обох типів без видимого впливу на його проростання або ріст пагонів. У даному випадку збільшення Pro у трансгенних рослин не підвищило їх толерантність до сольового стресу.

Відкриття коротких інтерферуючих РНК та з'ясування їхніх функцій як можливих регуляторних молекул, надало нові можливості для регуляції процесів адаптації/стійкості рослин та привело до розробки нового напряму генетичної інженерії – кіРНК-технологій. Однак, відомості, що свідчать на користь регуляторної ролі кіРНК у рослин, вкрай обмежені і стосуються лише окремих культур. Один з передбачуваних механізмів змін експресії гена *P5CDH* в умовах стресу пов'язують з ендогенними кіРНК, що утворюються в результаті розщеплення пари природних *cis*-антисмислових транскриптів. Зокрема, встановлено підвищення рівня толерантності рослин арабідопсису до засолення

з використанням пари генів *P5CDH* та *SRO5*, в результаті транскрипції яких формувалися кіРНК розміром 24 п.н. (Borsani et al, 2005). Ці початкові дослідження показали перспективність технологій коротких інтерферуючих РНК для підвищення осмотолерантності одно- та дводольних рослин.

Для пригнічення експресії генів у рослин за допомогою РНК-інтерференції застосовують різноманітні генетичні конструкції. Зокрема встановлено, що перспективним для часткової супресії гена *ProDH* є використання векторних конструкцій в яких дволанцюговий РНК-супресор розташований як обернений повтор (Manavalan et al, 2012). Припускається, що така конструкція за рахунок РНК-інтерференції є більш ефективною для збільшення рівня L-проліну.

Порівняльний аналіз рослин тютюну, трансформованих з використанням векторних конструкцій, що містять антисмисловий і дволанцюговий РНК-супресор, створених на основі гена *ProDH* арабідопсису, показав можливість підвищення рівня акумуляції Pro (Tateishi et al, 2005; Titov, 2008; Ibragimova et al, 2012). Рослини T<sub>5</sub>, що несли антисмисловий РНК-супресор, накопичували Pro та мали підвищену толерантність до водного дефіциту і знижених температур (-2, +2 °C) (Ibragimova et al, 2012). Рослини, що містили дволанцюговий РНК-супресор характеризувалися підвищеною толерантністю до засолення (Tateishi et al, 2005; Titov, 2008), що супроводжувалося накопиченням Pro у 1,2–6 разів більшим щодо нетрансгенного контролю, тоді як різниця в показниках акумуляції цієї амінокислоти у рослинах, що містили антисмислові конструкції, варіювала у межах 1,5–3 рази (Titov, 2008). Активність ProDH склала 4,9–32,2 % від активності у клітинах дикого типу (Tateishi et al, 2005).

Є позитивний досвід введення конструкції, що містить дволанцюговий РНК-супресор гена *ProDH* арабідопсису, у рослини соняшника та кукурудзи, які у результаті накопичували у 1,5–9,0 разів більше Pro і відрізнялися від контрольних підвищеною толерантністю до водного дефіциту та засолення (Tishchenko et al, 2014; Mykhalska et al, 2014; Komisarenko et al, 2016). На відміну від інших досліджень, автори за-

стосовували летальні для рослин дикого типу дози стресорів, що моделюють *in vitro* умови водного дефіциту і сульфатно-хлоридного засолення. Такий підхід дозволив виключити невизначеності, пов'язані з невідповідністю оцінок рівня експресії гена *ProDH* і осмотолерантності, тим самим надавши можливість однозначної відповіді на питання про доцільність часткової супресії ендегенних генів. Трансгенні рослини T<sub>0</sub>–T<sub>4</sub> цих культур перевершували вихідні генотипи за висотою, характеризувалися вищими показниками біомаси. Генетично змінені рослини соняшника перевищували контроль за вмістом хлорофілів (*a*, *b*, *a+b*) та каротиноїдів (Komisarenko et al, 2016). Встановлена перехресна стійкість до водного дефіциту і сульфатно-хлоридного засолення *ProDH1*-рослин кукурудзи (Sergeeva et al, 2019). У роботі Моїсєєвої та співавт. (Moiseeva et al, 2012) показано підвищення рівня Pro у проростках трансгенних рослин кукурудзи, що несуть аналогічну векторну конструкцію, при низьких рівнях хлоридного засолення.

Аналогічні результати були отримані у ярої та озимої пшениці (Dubrovna et al, 2020; Komisarenko et al, 2020; Mykhalska et al, 2021). Показано, що наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* арабідопсису призводить до збільшення рівня накопичення Pro як за оптимальних, так і стресових умов (2,6–4,1 раза) та підвищення толерантності до дії ґрунтової посухи. За дефіциту ґрунтової вологи генетично змінені рослини за показниками структури зернової продуктивності значно перевищували відповідні значення нетрансформованих рослин. Аналіз активності антиоксидантних ферментів (SOD та APX) у хлоропластах трансгенних рослин показав, що за фізіологічних умов антиоксидантна система у них працює більш активно порівняно з нетрансгенними генотипами (Dubrovna et al, 2020). Показано, що за високої концентрації ендегенний Pro може діяти як регуляторна/сигнальна молекула, здатна змінювати рівні транскриптів генів, пов'язаних зі стресом (Carvalho et al, 2013). Зокрема, трансгенні рослини *Swingle citrumelo*, що несуть мутантний ген *P5CSF129A Vigna aconitifolia*, з високим ендегенним рівнем накопичення проліну, за нормального водозабезпе-

чення мали вдвічі вищі рівні транскриптів генів різних ізоформ аскорбатпероксидази (*APX1*, *APXcl*), каталази (*CAT2*) та супероксиддисмутази (*Cu/ZnSOD2*), ніж контрольні рослини, що вказує на вплив високого рівня проліну на їх експресію. Однак, незважаючи на отримані дані про вплив Pro на кількість транскриптів генів антиоксидантних ферментів, механізми цього ефекту залишаються незрозумілими.

### Ген $\delta$ -OAT

Потенційно, OAT 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. Введення екзогенного гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази у геном рослин є одним з перспективних методів створення стійких до абіотичних стресів генотипів (Roosens et al, 2002; Wu et al, 2003; Anwar et al, 2020, 2021; Dubrovna et al, 2021).

Отримано трансгенні рослини тютюну, що несуть кДНК OAT арабідопсису (Roosens et al, 2002) та люцерни (Gerasimova et al, 2011). Встановлено, що трансгенні *AtOAT*-лінії синтезували більше Pro порівняно з нетрансгенним контролем. В умовах сольового стресу спостерігалось збільшення частоти проростання насіння і нарощування біомаси генетично змінених рослин порівняно з рослинами дикого типу (Roosens et al, 2002). Підвищення рівня толерантності до засолення (300 мМ NaCl) також показано у трансгенних *MtOAT*-рослин тютюну порівняно з контрольними, у яких спостерігалась затримка росту (Gerasimova et al, 2010). Виявлено пригнічення формування коріння як у контрольних, так і у *MtOAT*-рослин, відсутність між ними відмінностей за змістом Pro. Припускають, що участь OAT у молекулярних механізмах стресостійкості не пов'язана з додатковим синтезом Pro.

Надекспресія гена *AtOAT* у трансгенних рослин рису збільшувала вміст Pro у 5–15 разів у листках і корінні порівняно з таким у рослин дикого типу в умовах водного дефіциту та засолення (Wu et al, 2003). Спостерігалось уповільнення росту трансгенних рослин у міру збільшення концентрації NaCl, проте менше

порівняно з нетрансгенним контролем, а також підвищення середньої продуктивності рослин на 12–41 %. Трансгенні рослини пшениці з надеспресією *AtOAT* також виявили підвищену толерантність до водного дефіциту та засолення за рахунок збільшення накопичення Pro (Anwar et al, 2020). Автори показали, що власні *TaOAT* гени брали участь у синтезі Pro та ремобілізації азоту, оскільки вони взаємодіяли з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу Pro та катаболізмом аргініну. Крім того, робиться висновок, що експресія *AtOAT* підвищує посухостійкість пшениці та толерантність до засолення не тільки завдяки підвищенню біосинтезу Pro, але й за рахунок регуляції антиоксидантної системи. Сучасні дослідження також виявляють у трансгенних рослин пшениці з надекспресією гена *AtOAT* активацію глутаматного шляху за дії водного та сольового стресу та підвищену експресію генів *TaP5CS1* та *TaP5CR* (Anwar et al, 2021).

У трансгенних рослин пшениці з додатковою копією гена OAT люцерни виявлено підвищену толерантність до дії ґрунтової посухи (Komisarenko et al, 2019; Dubrovna et al, 2021). У рослин T<sub>1</sub>–T<sub>3</sub> показано підвищення активності OAT (у 1,5–1,6 раза), проте вони суттєво не відрізнялися від вихідних за вмістом Pro ні за фізіологічних умов, ні за умов стресу. Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що OAT безпосередньо не впливає на накопичення Pro, викликане стресом (Funck et al, 2008; Gerasimova et al, 2010). Однак трансгенні рослини краще ростуть в умовах дефіциту води, що підтверджує певну роль OAT у набутті стресостійкості. За умов недостатнього вологозабезпечення біотехнологічні лінії перевищували контроль за масою та довжиною коренів, кількістю продуктивних стебел, вмістом хлорофілу та показниками продуктивності (Dubrovna et al, 2021). Збільшення біомаси *MtOAT*-рослин за дії посухи може бути пов'язане з накопиченням орнітину, який є проміжною сполукою у біосинтезі аргініну, де шлях розходиться з утворенням проліну та поліамінів, які залучені у дуже багато функцій рослин, у тому числі пов'язаних з адаптацією до дії стрес-факторів (Kalamaki et al, 2009; Kolupaev et al, 2019). Тому цілком ймовірно, що підвищене накопичення

орнітину в рослинах, що надекспресують *OAT*, пов'язане з продукцією пулу захисних сполук, що призводить до підвищення толерантності.

Підсумовуючи, слід зазначити, що аналіз даних світової та вітчизняної літератури свідчить про актуальність і перспективність досліджень генів метаболізму проліну для генетичного поліпшення культурних рослин, у тому числі для забезпечення підвищеного рівня толерантності до абіотичних стресів. На сьогодні вже досліджено структуру та функції низки цих генів та розпочато їхнє використання при створенні генетично модифікованих рослин. Отримано трансгенні рослини різних видів, які характеризуються поліпшеними якісними та кількісними ознаками порівняно з не-трансформованими, як за нормальних умов вирощування, так і в умовах стресів. Однак спроби збільшення вмісту Pro у рослинній клітині генно-інженерними методами досі не дали однозначної відповіді про повний спектр його функцій у складному багатоступінчастому процесі адаптації рослин до стресу. У літературі вже є багато свідчень прямого зв'язку між рівнем накопичення Pro і стрес-толерантністю генетично змінених рослин. У той же час, позитивний вплив збільшення його вмісту на адаптацію трансгенних рослин до стресу поки що відзначають не для всіх культур та умов. Більшість створених рослин була перевірена у контрольованих лабораторних умовах на ранній стадії росту і зазнавали стресу протягом короткого періоду. Такі експерименти можуть не передбачити реакції рослини від сходів до стадії дозрівання та розмноження у польових умовах (Mansour and Ali, 2017). Крім того, у польових умовах трансгенні рослини можуть зазнавати множинних стресів, таких як засолення, посуха та екстремальні температури, які можуть пригнічувати захисні ефекти вбудованого гена. Той рівень стійкості до абіотичного стресу, який передбачався спочатку, не був повністю досягнутий у багатьох трансгенних рослин, трансформованих одним геном (Ashraf and Akram, 2009). Майбутні дослідження мають бути зосереджені на поєднанні різних стратегій, таких як мультигенний підхід для одночасного включення у трансгенну рослину більш ніж одного гена. У цьому контексті гени, що син-

тезують осмопротектори, повинні коекспресуватися з іншими генами, пов'язаними зі стресом, такими як транскрипційні фактори, транспортери іонів та інші функціональні гени. У контрольованих умовах доцільно проводити оцінку трансформантів на стійкість до комбінованої дії стресорів, яка зустрічається у природі (посуха і високі температури або засолення і високі температури). Результат генетичних маніпуляцій з накопиченням проліну у рослин слід також розглядати з точки зору його місця у багатокомпонентній стрес-протекторній системі та його впливу на інші компоненти цієї системи.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Публікація містить результати досліджень, проведених в рамках фінансованого Кабінетом Міністрів України проекту «Створення високопродуктивних сортів культурних рослин з підвищеним адаптивним потенціалом до несприятливих умов навколишнього середовища (КПКВК 6541230; № держреєстрації 0120U002100).

#### USING OF PROLINE METABOLISM GENES IN PLANT GENETIC ENGINEERING

*O.V. Dubrovna, S.I. Mykhalska, A.G. Komisarenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska st. 31/17, Kyiv, 03022, Ukraine

E-mail: dubrovny@ukr.net

The literature review considers fundamental and applied aspects of plant genetic engineering related to the use of genes that control the synthesis and catabolism of free Proline (Pro). The role of this polyfunctional amino acid in the processes of formation of plant resistance to abiotic and biotic stresses is highlighted. Current data on genes and key enzymes of proline biosynthesis and degradation, including delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), proline dehydrogenase (ProDH), ornithine- $\delta$ -aminotransferase (OAT), their organization and expression in plant cells are presented. The main directions and possibilities of using functional genes of metabolism Pro in the genetic engineering of plants are analyzed. Attention is paid to some members of the families of genes of transcription factors involved in the formation of plant resistance to abiotic and biotic stresses, the expression of which is positively correlated

with the expression of genes encoding enzymes of proline metabolism. The practical results of researches of domestic and foreign scientists with the use of genes of synthesis and catabolism of proline in genetic engineering of cereals and other cultivated plants are generalized. Information on quantitative changes in the content of this amino acid and the level of tolerance of genetically modified plants of monocotyledonous and dicotyledonous species to various abiotic stressors is presented. The practical developments of a new direction of genetic engineering – siRNA-technologies, its prospects and possibilities of application for increase of resistance of cultivated plants to ecological stresses are analyzed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anwar A, She M, Wang K, Ye X. (2018) Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives Int J Mol Sci 19: 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>
- Anwar A, She M, Wang K, Ye X. (2020) Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine aminotransferase (TaOAT) encoding genes BMC Plant Biol 20: 187–187. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2>
- Anwar A, Wang K, Wang J. (2021) Expression of Arabidopsis Ornithine Aminotransferase (AtOAT) Encoded Gene Enhances Multiple Abiotic Stress Tolerances in Wheat. Plant Cell Rep (preprint) <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-175437/v1>
- Arabia S, Shah M, Sami A et al. (2021) Identification and expression profiling of proline metabolizing genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* to reveal their stress-specific transcript alteration Physiol Mol Biol Plants 27(7):1469–1485. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01023-0>
- Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, and Bhatla SC. (2016) Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants Free Radical Res 50(3):291–303. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1118473>
- Ashraf M, Akram N. (2009) Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison Biotechnol Adv 27:744–752. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.026>
- Bandurska H, Niedziela J, Pietrowska-Borek M et al. (2017) Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin Plant Physiol Biochem 118:427–437. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.006>
- Bao T, Sun T, Sun L. (2011) Effect of cadmium hyperaccumulation on antioxidative defense and proline accumulation of *Solanum nigrum* L. Afr J Biotechnol 10(37):7198–7206
- Borgo L, Marur CJ, Vieira LGE. (2015) Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants Acta Sci. Agron 37:191–199. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19097>
- Borsani O, Zhu J, Verslues EP et al. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis Cell 123:1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.035>
- Canas RA, Villalobos DP, Diaz-Moreno SM et al. (2008) Molecular and functional analyses support a role of ornithine- $\delta$ -aminotransferase in the provision of glutamate for glutamine biosynthesis during pine germination Plant Physiol 148:77–88. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122853>
- Carvalho K, Campos MK, Domingues DS et al. (2013) The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo* Mol Biol Rep 40:3269–3279. doi: 10.1007/s11033-012-2402-5
- Cecchini NM, Monteoliva M, Alvarez ME. (2011) Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms Plant Signal Behav 6(8):1195–1197. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167163>
- Chen C, Cui X, Zhang P et al. (2021). Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic Arabidopsis Plant Physiology and Biochemistry 168:188–201. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.10.004
- De Ronde JA, Spreeth MH, Cress WA. (2000) Effect of antisense *L*-D1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress Plant Grow Regul 32(1):13–26. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.014>
- Dobra J, Vankova R, Havlova M et al. (2011) Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery Plant Physiol 168(13): 1588–1597. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.009>
- Dubrovna OV, Priadkina GO, Mykhalska SI, Komisarenko AG. (2021) Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene Agric Sci Pract 8(1):25–39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
- Dubrovna OV, Stasik OO, Priadkina GO et al. (2020) Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the



- proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency Agric Sci Prac 7(2):24–34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
- Fabro G, Kovács I, Pavet V et al. (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis Mol Plant-Microbe Interact 17:343–350. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.343>
- Fichman Y, Gerdes SY, Kovács H et al. (2015) Evolution of proline biosynthesis: Enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation Biol Rev 90:1065–1099. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/brv.12146>
- Funck D, Stadelhofer B, Koch W. (2008) Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis BMC Plant Biol 8:40. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
- Funck D, Winter G, Baumgarten L, Forlani G. (2012) Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development BMC Plant Biol 12. doi: 10.1186/1471-2229-12-191
- Gerasimova SV, Ibragimova SS, Kochetov AV, Shumny VK. (2011) Functions of delta-ornithine aminotransferase in plants Advances in modern biology 131(6):531–542
- Gerasimova SV, Kolodyazhnaya YaS, Titov SE et al. (2010) Tobacco transformants expressing the Medicago truncatula ornithine aminotransferase cDNA Rus J Genet 46(7):1000–1003. doi: 10.1134/S102279541007015X
- Ghanti SKK, Sujata KG, Kumar BMV et al. (2011) Heterologous expression of P5CS gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield Biol Plant 55(4):634–640. <https://bp.ueb.cas.cz/pdfs/bpl/2011/04/04.pdf>
- Goharrizi KJ, Moosavi SS, Amirmahani F et al. (2020) Assessment of changes in growth traits, oxidative stress parameters, and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanisms in Lepidium draba plant under osmotic stress induced by polyethylene glycol Protoplasma 257:459–473. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01457-0>
- Golldack D, Luking I, Yang O. (2011) Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. Plant Cell Rep 30:1383–1391. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1068-0>
- Guan C, Huang YH, Cen HF et al. (2019) Overexpression of the Lolium perenne L. delta1-pyrroline 5-carboxylate synthase (LpP5CS) gene results in morphological alterations and salinity Page 17/21 tolerance in switchgrass (Panicum virgatum L.). Plos One 14: e0219669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219669>
- Gubis J, Vankova R, Cervená V et al. (2007). Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought S Afr J Bot 73:505–511. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.03.011>
- Han K, Hwang C. (2003) Salt tolerance enhanced by transformation of a P5CS gene in carrot J Plant Biotechnol, 5:157–161
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A et al. (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase1 and proline dehydrogenase 2 Plant J 5(3):935–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03385.x>
- Hein JA, Sherrard ME, Manfredi KP, Abebe T. (2016) The fifth leaf and spike organs of barley (Hordeum vulgare L.) display different physiological and metabolic responses to drought stress BMC Plant Biol 16:248. <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-016-0922-1>
- Hiei Y, Ishida Y, Komari T. (2014) Progress of cereal transformation technology mediated by Agrobacterium tumefaciens Front Plant Sci 5:628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Hmida-Sayari A, Gargouri-Bouزيد R, Bidani A et al. (2005) Overexpression of Δ<sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants Plant Sci 169:746–752, doi 10.1016/j.plantsci.2005.05.025
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS. (2000) Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress Plant Physiol 122(4):1129–1136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129>
- Hossain MA, Hoque MA, Burritt DJ, Fujita M. (2014) Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling Ed. P. Ahmad. Academic Press is an imprint of Elsevier 477–521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
- Hu H, Dai M, Yao J et al. (2006) Over expressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc Natl Acad Sci USA 103:12987–12992. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604882103>
- Hu H, You J, Fang Y et al. (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice Plant Mol Biol 67(1–2):169–181. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9309-5>
- Hur J, Jung KH, Lee CH, An G. (2004) Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice Plant Sci 167:417–426. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.009>

- Ibragimova YaS, Gerasimova SV, Kochetov AV. (2012). The role of the proline dehydrogenase gene in maintaining stress resistance in plants. *Plant Physiol* 59(1):99–107. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167163>
- Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar. (2012) Antioxidant modulation in response to gamma induced oxidative stress in developing seedlings of *Psoralea corylifolia* L *J Environ Radioact* 113:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.05.019>
- Jin T, Chang Q, Li W et al. (2010) Stress-inducible expression of GmDREB1 conferred salt tolerance in transgenic alfalfa *Plant Cell, Tissue, Organ Cult* 100:219–227. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-0099628-5>
- Joshi R, Anwar K, Das P et al. (2017) Overview of Methods for Assessing Salinity and Drought Tolerance of Transgenic Wheat Lines In *Wheat Biotechnology*; Springer: New York, NY, USA: 83–95. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8\_5
- Kalamaki MS, Merkouropoulos G, Kanellis AK. (2009) Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signal Behav* 4(11): 1099–1101. doi: 10.4161/psb.4.11.9873
- Karthikeyan A, Pandian SK, Ramesh M. (2011) Transgenic indica rice cv. ADT 43 expressing a D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene from *Vigna aconitifolia* demonstrates salt tolerance *Plant Cell Tissue Organ Culture* 107(3):383–395. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9989-4>
- Kaur G, Asthir B. (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance *Biol Plant* 59(4):609–619. doi: 10.1007/s10535-015-0549-3
- Kemble A, Macpherson HT. (1954) Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting *Biochem J* 58(46). <https://doi.org/10.1042/bj0580046>
- Khan MS, Ahmad D, Khan MA (2015) Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced stress tolerance. *Electron J Biotech* 18:257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.04.002>
- Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN et al. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance *Curr Sci* 88(3):424–438. <https://www.jstor.org/stable/24110209>
- Kolupaev YuE, Karpets YuV, Kabashnikova LF. (2019) Antioxidative System of Plants: Cellular Compartmentation, Protective and Signaling Functions, Mechanisms of Regulation (Review) *Appl Biochem Microbiol.* 55(5):419–440
- Kolupaev YuE, Kokorev OI. (2019) Participation of polyamines in regulation of redox homeostasis in plants *The bulletin of Kharkiv national agrarian university Series biology* 1(46):6–22. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
- Kolupaev YuE, Vainer AA, Yastreb TO. (2014) Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions *The bulletin of Kharkiv national agrarian university Ser Biol* 2 (32):6–22
- Komisarenko AG, Mykhalska SI, Kurchii VM. (2020) Osmotolerance of T4 generation monocotyledonous and dicotyledonous plants with suppressed expression of proline catabolism gene *Plant physiology and genetics* 52(5):434–448. <https://doi.org/10.15407/frg.2020.05.434>
- Komisarenko AG, Mykhalska SI, Kurchii VM. (2019) Productivity of winter wheat plants with the additional copy of ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene under water deficit conditions *Factors of experimentation evolution of organism* 25:247–252. <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v25.1171>
- Komisarenko AG, Mykhalska SI, Kurchii VM et al. (2016) The characterization transgenic sunflower (*Helianthus Annuus* L.) plants with suppressor of pro-line dehydrogenase gene *Factors of experimental evolution of organisms* 19:143–147. <http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/article/view/653>
- Kumar V, Shriram V, Kavi Kishor PB et al. (2010) Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing *P5CSF129A* gene *Pant Biotech Rep* 4(1):37–48. <https://doi.org/10.1007/s11816-009-0118-3>
- Kumar NS, Zhu W, Liang X et al. (2012) Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Rad Biol Med* 53:1181–1191. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.002105
- Lehman S, Funck D, Szabados L, Rentsch D. (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39(4):949–962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF. (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 19:998–1011. <https://doi.org/10.1089ars.2012.5074>
- Liu C, Xue Z, Tang D et al. (2018) Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice *Plant J.* <https://doi.org/10.1111/tpj.14072>
- Lopez-Galiano MJ, Garcia Robles I, Gonzalez-Hernandez AI et al. (2019) Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress *Plants* 8:201. <https://doi.org/10.3390/plants8070201>
- Luo Y, Tang H, Zhang Y. (2011) Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperatures *J Agric Sci* 3:89–95
- Lv W.-T, Bin Lin, Min Zhang, Xue-Jun Hua. (2011) Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seed-

- lings during heat stress *Plant Physiol* 156:1921–1933. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175810>
- Ma Q, Dai X, Xu Y et al. (2009) Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes *Plant Physiol* 150(1):244–256. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133454>
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P et al. (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J* 3(16):699–712. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01389.x>
- Manavalan LP, Chen X, Clarke J et al. (2012) RNAi-mediated disruption squalen synthase improves drought tolerance and yield in rice *J Exp Bot* 63:163–75. doi: 10.1093/jxb/err258
- Mani S, Van de Cotte B, Van Montagu M et al. (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis* *Plant Physiol* 128:73–83. <http://hdl.handle.net/1854/LU-153944>
- Mansour MMF, Ali EF. (2017) Evaluation of proline functions in saline conditions *Phytochemistry* 140:52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
- Matysik J, Bhalu BA, Mohanty P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants *Curr Sci* 82:525–532. <http://www.iisc.ernet.in/cursci/mar102002/525.pdf>
- Meena M, Divyanshu K, Kumar S et al. (2019) Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions *Heliyon* 5(12):02952. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02952
- Miller G, Honig A, Stein H et al. (2009). Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes *J Biol Chem* 284:26482–26492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009340>
- Miller G, Stein H, Honig A et al. (2005) Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate proline accumulation *Planta* 222(1):70–79. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1518-4>
- Moiseeva EM, Agaponov DA, Veshkov VA et al. (2012) Elevated proline content in maize plants expressing a fragment of the proline dehydrogenase gene in antisense orientation *Plant Physiol* 59(3):457–460. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443712020070>
- Mykhalska SI, Komisarenko AG, Kurchii VM. (2021) Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability Factors of experimentation evolution of organism 28:94–99. <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v28.1382>
- Mykhalska SI, Sergeeva LE, Matveeva AYU et al. (2014) The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene *Plant Physiol Genet* 46(6):482–489. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159462>
- Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T et al. (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs in *Arabidopsis* *Plant Physiol* 18(4):1233–1241. <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.118.4.1233>
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y et al. (1999) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* *FEBS Lett* 461:205–210. doi 10.1016/S0014-5793(99)01451-9
- Oono Y, Seki M, Nanjo T et al. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7,000 full-length cDNA microarray *Plant J* 34(6):868–887. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01774.x>
- Pospisilova J, Haisel D, Vankova R. (2011) Responses of transgenic tobacco plants with increased proline content to drought and/or heat stress *AJPS* 2(3):318–324. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2011.23036>
- Qamar A, Mysore K, Senthil-Kumar M. (2015) Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front Plant Sci* 6:503. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00503>
- Rana V, Ram S, Nehra K et al. (2016) Expression of genes related to Na<sup>+</sup> exclusion and proline accumulation in tolerant and susceptible wheat genotypes under salt stress *Cereal Res Commun* 44:404–413. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.009>
- Radyukina NL, Kartashov AV, Ivanov YuV et al. (2007) Comparative analysis of the functioning of defense systems in representatives of halophyte and glycophyte flora under conditions of progressive salinity *Plant Physiol* 54(6):902–912
- Radyukina NL, Shashukova AV, Makarova SS et al. (2011) Exogenous proline modifies differential expression of superoxide dismutase genes in UV-B-irradiated *Salvia officinalis* plants *Russ J Plant Physiol* 58:51–59. <https://doi.org/10.1134/S1021443711010122>
- Razavizadeh R, Ehsanpour A. (2010) Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants *Biol Lett* 46(2):63–75. <https://doi.org/10.2478/v10120-009-0002-4>
- Ribaritz A, Abdulaev A, Tashpulatov A et al. (2007) Two tobacco proline dehydrogenases are differentially

- regulated and play a role in early plant development *Planta* 225(5):1313–1324. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0429-3>
- Rizzi Y, Monteoliva M, Fabro G et al. (2015) P5CDH affects the pathways contributing to proline synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions *Front Plant Sci* 6:572. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00572>
- Roosens NH, Thu TT, Iskandar HM et al. (1998) Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana* *Plant Physiol* 117:263–271. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.263>
- Roosens NH, Bitar FA, Loenders K et al. (2002) Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants *Mol Breed* 9(2):73–80. <https://doi.org/10.1023/A%3A1026791932238>
- Saeid MA-R, Ammari TG, Irshaid LA et al. (2011) Cloning and expression patterns of the *HvP5CS* gene from barley (*Hordeum vulgare*) *J of Food Agric Environ* 9(3–4):279–284.
- Saeedipour S. (2013) Relationship of grain yield, ABA and proline accumulation in tolerant and sensitive wheat cultivars as affected by water stress *PNAS India*. doi: 10.1007/s40011012-0147-5
- Saradhi PP, Arora S, Prasad K. (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation *Biochem Biophys Res Com* 209(1–5). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1461>
- Sarker U, Oba S. (2020) The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants *Front Plant Sci* 11:1354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559876>
- Satoh R, Fujita Y, Nakashima K et al. (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis* *Plant Cell Physiol* 45:309–317. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch036>
- Savoure A, Jaoua S, Hua XJ et al. (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana* *FEBS Lett* 372(1):13–19. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00935-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00935-3)
- Sawahel AH, Hassan. (2002) Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnol Lett* 24:721–725. doi: 10.1023/A:1015294319114
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D. (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen *Plant Cell* 11(3):377–392. doi: 10.1105/tpc.11.3.377
- Sergeeva LE, Mykhalska SI, Komisarenko AG. (2019) Modern biotechnologies for increasing plant resistance to osmotic stresses. Kyiv: Kondor, 160 p.
- Servet C, Ghelis T, Richard L et al. (2012) Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci* 1(17):607–620. <https://doi.org/10.2741/3947>
- Sharma S, Verslues PE. (2010) 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* 33(11):1838–1851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02188.x>
- Sharma S, Villamor JG, Verslues PE. (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential *Plant Physiol* 157:292–304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
- Sharma A, Shahzad B, Kumar V et al. (2019) Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress *Biomolecules* 9(7):E285
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses *Curr Opin Plant Biol* 6:410–417. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00092-x](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00092-x)
- Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Savouré A. (2015) Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress *Ann Bot* Feb 115(3):433–447. doi: 10.1093/aob/mcu239
- Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B et al. (2013) The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.) *Environ Exp Bot* 86:94–105
- Su J, Wu R. (2004) Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis *Plant Sci* 166(4):941–948. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.004>
- Su M, Li X-F, Ma X-Y et al. (2011) Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment *Ibid* 181:652–659. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.002>
- Surekha C, Nirmala Kumari K, Aruna L et al. (2013) Expression of the *Vigna aconitifolia P5CSF129A* gene in transgenic pigeon pea enhances proline accumulation and salt tolerance *Plant Cell Tissue Organ Cult* 116:27–36. doi 10.1007/s11240-013-0378-z
- Szabados L, Savoure A. (2009) Proline: A multifunctional amino acid *Trends Plant Sci* 15:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>

- Szekely G, Abraham E, Cseplo A et al. (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis *Plant J* 53:11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>
- Tateishi Y, Nakagama T, Esaka M. (2005) Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique *Physiol Plant* 125:1399–3054. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00553.x>
- Tishchenko EN. (2013) Genetic engineering using genes of L-proline metabolism to increase the osmotolerance of plants *Plant physiology and genetics* 45(6):488–500. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
- Tishchenko OM, Komisarenko AG, Mykhalska SI et al. (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using the LBA4404 strain carrying the pBi2E plasmid with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytol Genet* 48(4): 218–226. doi: 10.3103/S0095452714040094
- Titov SE. (2008) Obtaining genetically modified plants tobacco (*Nicotiana tabacum* L), expressing antisense suppressor of proline dehydrogenase gene Thesis for the degree of candidate of biological sciences Institute of Cytology and Genetics RAS, Novosibirsk
- Turchetto-Zolet AC, Margis-Rinheiro M, Margis R. (2009) The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis *Mol Genet Genom* 281(1):87–97. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0396-4>
- Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M et al. (2007) Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment *Plant Physiol* 144:538–549. <https://doi.org/10.1104/pp.107.098061>
- Vendruscolo EC, Schuster I, Pileggi M et al. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat *Plant Physiol* 164(10):1367–1376. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.007.05.001>
- Verbruggen N, Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: A review *Amino Acids* 35:P.753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Verdoy D, Coba de la Peca T, Redondo FJ et al. (2006) Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress *Plant Cell Environ* 29:1913–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01567.x>
- Verslues PE. (2010) Quantification of water stress-induced osmotic adjustment and proline accumulation for *Arabidopsis thaliana* molecular genetic studies *Meth Mol Biol* 639:301–315. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0\_19
- Wang JW, Yang FP, Chen XQ et al. (2006) Induced expression of DREB transcriptional factor and study on its physiological of drought tolerance in transgenic wheat *Acta Gen Sinica* 33:468–476. [https://doi.org/10.1016/s0379-4172\(06\)60074-7](https://doi.org/10.1016/s0379-4172(06)60074-7)
- Wang K, Liu H, Du L et al. (2017) Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties *Plant Biotech J* 15:614–623. <https://doi.org/10.1111/pbi.12660>
- Wu L, Fan Z, Guo L et al. (2003) Over-expression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice *Chinese Sci Bull* 48(23):2594–2600. <https://link.springer.com/article/10.1360/03wc0218>
- Xing L, Di Z, Yang W et al. (2017) Overexpression of ERF1-V from *Haynaldia villosa* Can Enhance the Resistance of Wheat to Powdery Mildew and Increase the Tolerance to Salt and Drought Stresses *Front Plant Sci* 8:19–48. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01948>
- Xu FY, Wang XL, Wu QX et al. (2012) Physiological responses differences of different genotype sesames to flooding stress *Adv J Food Sci Technol* 4:352–356
- Xue X, Liu A, Hua X. (2009) Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus* *BMB Rep* 42:28–34. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.1.028>
- Yamada M, Morishita H, Urano K et al. (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress *J Exp Bot* 56(417):1975–1981. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri195>
- Yan F, Deng W, Wang X et al. (2012) Maize (*Zea mays* L.) homologue of ABA-insensitive (ABI) 5 gene plays a negative regulatory role in abiotic stresses response *Plant Grow Regul*. doi: 10.1007/s10725-012–9727-x
- Yang A, Dai X, Zhang WH. (2012) A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice *J Exp Bot* 63(7):2541–2556. <https://doi.org/10.1093/jxb/err431>
- Yang S-L, Lan S-S, Gong M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings *J Plant Physiol* 166:1694–1699. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.006>
- Ying S, Zhang DF, Fu J et al. (2012) Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* *Planta* 235(2):253–266. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1496-7>
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K. (1997) Regulation

- of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress *Plant Cell Physiol* 38:1095–1102. [https://doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093)
- You J, Hu H, Xiong L. (2012) An ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene *OsOAT* confers drought and oxidative stress tolerance in rice *Plant Sci* 197:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.002>
- Zarattini M, Forlani G. (2017) Toward Unveiling the Mechanisms for Transcriptional Regulation of Proline Biosynthesis in the Plant Cell Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Front Plant Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00927>
- Zhang H, Liu W, Wan L et al. (2010) Functional analyses of ethylene response factor *JERF3* with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice. *Transgen Res* 19(5):809–818. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-009-9357-x>
- Zhang W, Tang J, Liu Y et al. (2014) Co-expression of rice *OsP5CS1* and *OsP5CS2* genes in transgenic tobacco resulted in elevated proline biosynthesis and enhanced abiotic stress tolerance *Chin J Appl Environ Biol* 20(4):717–722. doi: 10.3724/SP.J.1145.2014.03010
- Zhang G, Zhu W, Junyi G et al. (2015) Enhanced Salt Tolerance of Transgenic Vegetable Soybeans Resulting from Overexpression of a Novel Delta(1)-Pyrroline-5-carboxylate synthetase Gene from *Solanum torvum* Swartz *Horticulture, Environ Biotechnol* 56(1):94–104. doi: 10.1007/s13580-015-0084-3
- Zhu B, Su J, Chang M et al. (1998) Overexpression of a  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice *Plant Sci* 139:41–48. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00175-7

Надійшла в редакцію 20.01.22  
Після доопрацювання 25.02. 22  
Прийнята до друку 18.07.22