

УДК 577.21

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА *L*-ПРОЛИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ОСМОТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ

Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

В обзоре рассмотрены генетические и физиологические аспекты генетической инженерии, связанные с использованием генов, контролирующих синтез и катаболизм *L*-пролина. Обсуждена перспективность этого направления генетической инженерии для повышения осмотолерантности культурных растений.

Ключевые слова: *P5CS*, *ProDH*, δ -ОАТ, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация.

Одно из актуальных направлений современных биотехнологий связано с созданием форм культурных растений с повышенным уровнем устойчивости к стрессам, вызванным водным дефицитом, засолением, экстремальными температурами. Для генетического улучшения культурных растений привлекаются молекулярные биотехнологии, связанные с использованием генов, контролирующих метаболизм «совместимых» осмотически активных веществ — органических молекул, способных в значительных концентрациях накапливаться в клетках растений в условиях стресса, не оказывая токсического действия на процессы их роста и дифференциации. Среди них особый интерес представляет *L*-пролин (Pro, пролин).

Всесторонние генетические и физиолого-биохимические исследования, в том числе с применением методов генетической инженерии и экспериментального мутагенеза, сформировали точку зрения о пролине как полифункциональной аминокислоте, принимающей участие в сложных интегральных процессах адаптации/устойчивости растений к абиотическим стрессам. Развивается также представление о Pro как сигнальной/регуляторной молекуле в ходе роста, дифференциации клеток и их программированной гибели, а также как о факторе, связанном с реализацией морфогенетического потенциала при культивировании *in vitro* [5, 12, 27, 33, 53].

Повышение уровня свободного пролина — физиологическая реакция многих видов растений на разные типы абиотических стрессов. Эту аминокислоту рассматривают в качестве запасной формы углерода и азота, молекулярного шаперона, стабилизирующего клеточные структуры, возможного антиоксиданта, регулятора клеточного редокс-потенциала, а также сигнала в адаптивных реакциях на абиотические и биотические стрессы [12, 50, 53, 57]. Предполагается, что Pro понижает

осмотический потенциал клеток, поддерживая их тургор. Его позитивное влияние на повышение уровня устойчивости к осмотическому стрессу впервые наблюдали у линии бактерий, сверхпродуцирующей эту свободную аминокислоту [54]. В дальнейшем аналогичные результаты были получены при исследовании ряда видов растений. Вместе с тем участие пролина в процессах адаптации/устойчивости не всегда очевидно. Об этом свидетельствуют результаты анализа трансгенных растений [25, 34, 50], а также сравнительного изучения содержания Pro и уровня толерантности некоторых диких видов растений [52]. Ряд аспектов биологической функции этой свободной аминокислоты и роли отдельных генов в системе регуляции ее метаболизма остаются недостаточно изученными и неоднозначными [50, 53, 57].

Гены и ферменты путей биосинтеза пролина. Эндогенный уровень пролина растений в норме и при осмотическом стрессе координированно регулируется его синтезом, катаболизмом и транспортом [39]. Для повышения уровня свободного пролина биотехнологическими методами основное внимание сконцентрировано на ключевых генах, кодирующих ферменты его синтеза или катаболизма. Синтез Pro происходит двумя путями: с использованием в качестве предшественника глутамата или орнитина, синтезирующегося из аргинина. В условиях стресса для многих видов растений преимущественным является первый путь, второй же может осуществляться при высокой доступности азота [27].

Глутамат превращается в глутаматполуальдегид бифункциональным ферментом D1-пирролин-5-карбоксилатсинтетазой (P5CS, КФ 2.7.2.11.1.2.1.41). На первоначальном этапе образуется глутамин-гамма-семиальдегид с последующей спонтанной циклизацией в D1-пирролин-5-карбоксилат (P5C). Далее интермедиат P5C превращается в пролин ферментом D1-пирролин-5-карбоксилатредуктазой (P5CR, КФ 1.5.1.2). Что касается второго пути, то орнитин сначала трансаминируется орнитин- δ -аминотрансферазой (δ -OAT, КФ 2.6.1.13), также продуцируя P5C, а затем этот интермедиат ферментом P5CR превращается в пролин. Катаболизм пролина осуществляется посредством последовательного функционирования FAD-зависимой пролиндегидрогеназы (ProDH, КФ 1.5.99.8) с образованием P5C, а также P5C дегидрогеназы (P5CDH, КФ 1.5.1.12), превращающей P5C в глутамат. Синтез пролина ферментами P5CS и P5CR происходит в хлоропластах и цитоплазме, тогда как его катаболизм ферментами ProDH и P5CDH — в митохондриях. В случае альтернативного пути P5C генерируется митохондриальной δ -OAT, а его превращение в пролин осуществляется ферментом P5CR в цитоплазме [27, 53].

Следует отметить особенности ферментов синтеза Pro, которые необходимо учитывать при разработке молекулярных биотехнологий. P5CS подвергается обратному ингибированию пролином в норме и в условиях абиотического стресса [21]. В результате этого может, хотя и редко, не достигаться физиологически значимый уровень его аккумуляции для повышения стресс-устойчивости растений. Преодолеть такие ограничения можно с использованием мутантного по P5CS гена, экспрессия которого приводит к нарушению отрицательной обратной связи активности фермента P5CS и пролина [29, 40]. Функционирование δ -OAT также зависит от уровня Pro, однако на его активность пролин непосредственного влияния не оказывает [43].

P5CS, *ProDH* являются ферментами, лимитирующими скорость метаболизма пролина в норме и в условиях стресса. Относительно роли δ -ОАТ существуют неоднозначные мнения. Рядом исследователей поддерживается концепция о существенной роли фермента δ -ОАТ в рециркуляции азота через путь аргинина, что, по-видимому, не связано с биосинтезом пролина [17]. В пользу того, что δ -ОАТ имеет отношение к повышению уровня устойчивости растений, свидетельствуют результаты исследований трансгенных растений риса и табака [61]. Немаловажную роль в жизнедеятельности растений играет и второй фермент деградации пролина. Анализ растений арабидопсиса, мутантных по гену *P5CDH*, показал, что аккумуляция *P5C* приводит к запрограммированной гибели клеток. Считается, что *Pro* и *P5C/Glu*-полуальдегид могут быть связующим звеном между стрессовым ответом и гибелью клеток [4]. Один из предполагаемых механизмов, касающихся изменений экспрессии *P5CDH* в условиях стресса, имеет отношение к эндогенным siRNAs, образующимся в результате расщепления пары природных *cis*-антисмысловых транскриптов [11]. На современном этапе для генетического улучшения культурных растений молекулярными биотехнологиями основное внимание уделяется генам *P5CS* и *ProDH*.

Сведения об организации и экспрессии генов, регулирующих метаболизм свободного пролина, имеются для ограниченного круга одно- и двудольных видов растений. Главным образом исследованы гены *P5CS*. На примере риса и арабидопсиса показано, что они состоят из 20 экзонов и 19 интронов. В ядерном геноме этих растений содержится по 2 копии *P5CS*, которые имеют достаточно высокий уровень гомологии полинуклеотидных последовательностей ДНК. Основные различия касаются изменений размеров их интронов [16, 19, 22, 45, 48, 57, 60].

Гены *ProDH* также кодируются ядерным геномом. Судя по информации, имеющейся для арабидопсиса, табака, сои, им свойственен достаточно высокий уровень гомологии [35, 39]. В отличие от *ProDH* и *P5CS* гены *P5CDH*, контролирующие второй этап катаболизма пролина, представлены у многих растений в единственном числе. Сравнительный анализ генов *P5CDH* злаковых (пшеницы, кукурузы, риса, ячменя) показал консервативность структуры и полинуклеотидных последовательностей их ДНК [31]. Высокий уровень гомологии экзонов генов как *P5CS*, так и *ProDH*, позволяет использовать их в гетеро- и гомологичных системах для повышения уровня накопления *Pro*. Наиболее часто в молекулярных биотехнологиях применяют векторные конструкции, созданные на основе клонированных генов *P5CS* вигны и *ProDH* арабидопсиса (таблица).

Согласно результатам исследований пространственно-временной экспрессии генов, гомологичные копии *P5CS* и *ProDH* связаны с реакцией на стресс и/или с пролиферацией, дифференцировкой клеток растений. В условиях стресса их экспрессия осуществляется дифференциально [15, 23]. В частности, анализ мутантных по генам *p5cs1* и *p5cs2* растений арабидопсиса выявил, что первый из них преимущественно функционирует в ответ на осмотические стрессы или АБК [50]. Снижение уровня *Pro* в таких растениях сопровождалось накоплением активных форм кислорода, что дает основание предполагать наличие у пролина свойств антиоксиданта. В геноме риса также содержатся 2 гена *P5CS*, один из которых (*OsP5CS1*) экспрессируется в вегетативных и репродуктивных органах, тогда как другой (*OsP5CS2*) преимущественно индуцируется в условиях стресса и функционирует в тканях зрелых растений

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Результаты генно-инженерных работ, направленных на повышение уровня устойчивости растений к абиотическим стрессам, с использованием генов синтеза и катаболизма L-пролина культурных растений

| Трансгенное растение (источник гена, фенотип, молекулярно-генетическая и физиолого-биохимическая характеристики) | Литературный источник |
|--|-----------------------|
| <i>Пшеница</i> | |
| <p>Повышение уровня устойчивости к водному дефициту трансгенных растений пшеницы, несущих ген <i>P5CS Vigna aconitifolia</i> под контролем промотора – комплекса АИРС</p> <p>Накопление свободного пролина. Предполагается, что толерантность АИРС::<i>P5CS</i>-растений главным образом может быть связана с участием Pro в молекулярных механизмах устойчивости, вызванных оксидативным стрессом</p> | [56] |
| <i>Рис</i> | |
| <p>Увеличение количества синтезируемых мРНК и аккумуляция свободного пролина в трансгенных растениях риса, транскрибирующих ген <i>p5cs</i> нута под контролем стресс-индуцибельного или конститутивного промотора.</p> <p>Часть (1/3) проростков трансгенных растений (поколение T2) проявляла значительный уровень устойчивости к водному дефициту и засолению, ускоренный рост побегов и корней, большее накопление биомассы трансгенных растений относительно нетрансгенного контроля в условиях стресса</p> <p>Использование промотора стресс-индуцибельного гена имело преимущества по сравнению с конститутивным промотором</p> | [51] |
| <p>Повышенный уровень толерантности к засолению трансгенных растений риса, сверхэкспрессирующих <i>P5CSF129A</i> (мутация по гену <i>P5CS</i>). В трансгенных растениях нарушена отрицательная обратная связь активности энзима <i>P5CS</i> и пролина</p> <p>Аккумуляция свободного пролина в растениях T1 при засолении (150 мМ NaCl). Снижение уровня окисления липидов. Усиленный рост и накопление биомассы в условиях стресса</p> | [29] |
| <p>Повышенный уровень толерантности к засолению трансгенных растений риса, содержащих ген вигны <i>P5CS</i>, под контролем конститутивного промотора CaMV 35S</p> <p>Трансгенные растения росли в условиях засоления (200 мМ NaCl) на протяжении 4 недель и в дальнейшем образовывали семена, тогда как контрольные растения погибали в течение 10 сут</p> | [26] |
| <p>Повышенный уровень толерантности к водному дефициту и засолению трансгенных растений риса, сверхэкспрессирующих ген δ-<i>OAT</i> арабидопсиса, под контролем промотора CaMV 35S</p> <p>5–15-кратное увеличение содержания пролина в листьях и корнях трансгенных растений в условиях стресса. Замедление роста трансгенных растений по мере возрастания концентрации NaCl, однако меньшее по сравнению с нетрансгенным контролем. Повышение средней продуктивности трансгенных линий (на растение) на 12–41%</p> | [61] |
| <i>Нут</i> | |
| <p>Повышение уровня толерантности трансгенных растений нута поколения T1, содержащих кДНК <i>P5CS</i> вигны под контролем промотора CaMV 35S (согласно результатам выхода электролитов и стабильности хлоропластов)</p> | [18] |

| Трансгенное растение (источник гена, фенотип, молекулярно-генетическая и физиолого-биохимическая характеристики) | Литературный источник |
|---|-----------------------|
| <p>Повышение уровня P_{ro} в условиях хлоридного засоления CaMV 35S::P5CS-растений, сверхэкспрессирующих P5CS. Показана функциональная активность энзима P5CS. Аккумуляция ионов Na⁺ в старых листьях и незначительное их содержание в семенах. Растения, выращенные в условиях постоянного засоления, образовывали жизнеспособные семена без потери урожайности (по массе)</p> | [18] |
| <i>Соя</i> | |
| <p>Частичная супрессия гена P5CR трансгенных растений сои, несущих антисмысловой (as) супрессор гена P5CR под контролем промотора стресс-индуцибельного гена теплового шока IHSP, приводила к снижению уровня биосинтеза пролина</p> | [13] |
| <p>Водный дефицит, моделируемый маннитолом при 32 и 42 °С, приводил к повышению содержания пролина в нетрансгенных растениях. В IHSP::P5CR-растениях уровень P_{ro}, наоборот, значительно снижался. Они быстро погибали, тогда как контрольные нетрансгенные растения в условиях умеренного стресса оставались жизнеспособными</p> | |
| <i>Люцерна</i> | |
| <p>Трансгенные растения люцерны, сверхэкспрессирующие ген P5CS вигны под контролем конститутивного 35S-промотора, накапливали значительное количество пролина и показывали повышенный уровень осмотолерантности</p> | [58] |
| <p>В 35S::P5CS-растениях наблюдался более слабый негативный эффект засоления на азотфиксирующую активность.</p> | |
| <p>Показана как тканеспецифичная, так и индуцируемая осмотическим стрессом экспрессия эндогенных генов метаболизма пролина <i>M. truncatula</i> — <i>MtP5CS1</i>, <i>MtP5CS2</i>, <i>MtOAT</i>.</p> | |
| <i>Петуния</i> | |
| <p>Повышенная толерантность к водному дефициту трансгенных растений петунии, содержащих гены <i>OsP5CS</i> риса или <i>AtP5CS</i> арабидопсиса</p> | [63] |
| <p>В нормальных условиях в трансгенных растениях петунии накапливалось в 1,5–2,6 раза больше свободного пролина, чем в нетрансгенном контроле. Обработка экзогенным L-пролином вызывала аккумуляцию P_{ro} и ограничивала скорость роста петунии дикого типа в большей степени, чем арабидопсиса. На скорость роста трансгенных растений петунии оказывали влияние концентрация P_{ro} и соотношение содержания пролина и общего количества аминокислот</p> | |
| <i>Арабидопсис</i> | |
| <p>Созданы трансгенные линии арабидопсиса, несущие ген пролиндегидрогеназы PDH под 35S-промотором в смысловой (PDH-S) и антисмысловой (PDH-AS) ориентации.</p> | [34] |
| <p>Уровень свободного пролина снижался до 50 % в условиях стресса в растениях PDH-S и максимально повышался на 25 % в растениях PDH-AS, несмотря на значительное варьирование уровней их мРНК и ферментного белка. Аналогичная тенденция изменения уровня P_{ro} наблюдалась в семенах без видимого влияния на прорастание и рост. В условиях стресса трансгенные PDH-растения не показывали изменений уровня осмотолерантности. Экзогенная обработка пролином повышала жизнеспособность (до 30 %) в условиях солевого стресса. Продемонстрировано, что изменения активности энзима PDH арабидопсиса приводили к слабым варьированиям накопления свободного пролина с ограниченным влиянием на рост и развитие, что, по мнению авторов, предполагает жесткий контроль гомеостаза P_{ro}</p> | |

| Трансгенное растение (источник гена, фенотип, молекулярно-генетическая и физиолого-биохимическая характеристики) | Литературный источник |
|--|-----------------------|
| <p>Сверхэкспрессия гена <i>AtP5CS1</i> под контролем промотора гена белка 17.6П, индуцируемого тепловым шоком, в условиях теплового стресса приводила к активизации синтеза свободного пролина</p> <p>Пониженная жизнеспособность относительно контроля по данным выхода электролитов, увеличению количества АФК и малонового диальдегида, активации цикла Pго/P5C, стимуляции энзимов супероксиддисмутазы, каталазы, но не глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы. Повышенный уровень АФК в митохондриях. Этилен и АБК оказывали негативное действие на рост проростков при тепловом стрессе</p> <p>Предположено, что накопление пролина в условиях стресса снижает термотолерантность, возможно за счет повышения количества АФК посредством цикла Pго/P5C, ингибирования биосинтеза АБК и этилена</p> | [30] |
| <i>Табак</i> | |
| <p>Частичная супрессия гена <i>ПДГ</i> трансгенных растений табака, несущих антисмысловой (as)-супрессор – фрагмент гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса под контролем 35S-промотора</p> | [2] |
| <p>Ювенильные растения трансгенной линии табака (поколения T5) характеризовались повышенной устойчивостью к водному дефициту и пониженным температурам (–2, +2 °С)</p> | |
| <p>Повышенная устойчивость к засолению (300 мМ NaCl) трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген <i>P5CS</i> вигны под конститутивным промотором CaMV 35S</p> | [42] |
| <p>Значительное накопление мРНК <i>P5CS</i> в листьях и корнях трансгенных растений, культивируемых <i>in vitro</i> в условиях засоления. Увеличение активности каталазы и аскорбатпероксидазы. Предположено участие гена <i>P5CS</i> в регуляции аккумуляции Pго в условиях солевого стресса</p> | |
| <p>Аккумуляция свободного пролина в трансгенных растениях табака (M51-1), конститутивно сверхэкспрессирующих модифицированный ген <i>P5CSF129A</i> (мутантная форма <i>P5CS</i>)</p> | [40] |
| <p>Повышение эффективности использования воды, содержания хлорофилла и пигментов ксантофилльного цикла в M51-1-растениях. Интенсивность их дыхания и проводимость устьиц была в несколько раз выше, чем у растений дикого типа</p> | |
| <p>Дефицит влаги приводил к уменьшению всех параметров газообмена и содержания хлорофилла, однако при этом увеличивалось количество пигментов ксантофилльного цикла. После теплового стресса (40 °С, 60 мин) значительно снижались параметры газообмена</p> | |
| <p>Повышение уровня устойчивости к засолению (300 мМ NaCl) трансгенных растений табака, несущих ген δ-OAT люцерны (<i>MtrOAT</i>) под конститутивным 35S-промотором, по сравнению с контрольными растениями, у которых наблюдалось ингибирование роста</p> | [1] |
| <p>Подавление формирования корней и у контрольных, и у 35S:: δ-OAT-растений, отсутствие между ними различий в содержании свободного пролина. Предположено, что участие δ-OAT в молекулярных механизмах стрессоустойчивости не связано с дополнительным синтезом пролина</p> | |
| <p>Получены трансгенные растения табака <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>, несущие кДНК δ-OAT арабидопсиса под контролем промотора CaMV35S</p> <p>Сверхэкспрессия гена δ-OAT была сопряжена с повышением активности энзима δ-OAT. Трансгенные линии синтезировали большее количество пролина по сравнению с контролем. Наблюдалось увеличение биомассы и повышенная скорость прорастания в условиях осмотического стресса</p> | [43] |

[23]. Гены, контролирующие синтез пролина, могут дифференциально транскрибироваться в различных органах и в ответ на разные типы стрессоров [52]. Более того, изменения уровня экспрессии генов под влиянием одного стрессора параллельно могут приводить к повышению толерантности трансгенных растений и к другим типам абиотических факторов (см. таблицу).

Относительно генов *ProDH* растений известно, что их экспрессия преимущественно регулируется на транскрипционном уровне де- и регидратацией, а также экзогенным *L*-пролином. В ответ на стресс количество мРНК уменьшается, а при регидратации — накапливается [28, 49]. Наиболее детально проанализирована экспрессия генов *ProDH* арабидопсиса и табака. В промоторе генов *ProDH* идентифицирован *cis*-действующий элемент АСТСАТССТ, необходимый для активации транскрипции в ответ на гипоосмолярность и пролин [46, 47]. Кор этого элемента (АСТСАТ), названный пролинреагирующим элементом (PRE), также обнаружен в промоторной области ряда индуцибельных регидратацией и пролином генов. Предполагается, что АСТСАТ-мотив имеет отношение к регуляции экспрессии генов в период восстановления после осмотического стресса [38]. Более того, индукция транскрипции *ProDH* и PRE-содержащих генов растений арабидопсиса может осуществляться при участии транскрипционного фактора *bZIP* (*AtbZIP11*), который, в свою очередь, индуцируется сахарозой [20]. Сахароза, как и пролин, рассматривается в настоящее время как регуляторная/сигнальная молекула. Помимо *cis*-действующего элемента транскрипционного фактора *bZIP* в промоторе гена *ProDH* арабидопсиса содержатся таковые и других транскрипционных факторов, в частности MYB и MYC [36], некоторые члены которых также могут быть компонентами общей системы генетической регуляции процессов адаптации/устойчивости растений. Обсуждаемые данные свидетельствуют о сложных перекрестных путях передачи стресс-сигналов при участии пролина и сахарозы.

Другой момент касается различий в функционировании генов растений, участвующих в контроле стресс-индуцированного накопления пролина глутаматным и орнитинным путями. В частности, во время длительного сильного осмотического стресса у рапса детектировалась экспрессия гена *VnOAT* [62]. В растениях арабидопсиса на ранних этапах их развития в условиях солевого стресса происходила транскрипция не только *AtP5CS1*, но и δ -*OAT* [44]. Эти данные свидетельствуют об участии и глутаматного, и орнитинового путей в аккумуляции пролина у арабидопсиса. Отметим, что роль генов δ -*OAT* исследована для небольшого числа растений, их значение в стресс-устойчивости не всегда однозначно [1, 61].

Обращает на себя внимание тот факт, что интеграция в геном растений трансгенов, кодирующих стресс-индуцибельные транскрипционные факторы (TF), которые контролируют экспрессию генов регулонов, непосредственно принимающих участие в поддержании жизнеспособности растений в условиях стресса, во многих случаях сопряжена с аккумуляцией свободного пролина. В частности, это касается трансгенных *rd29A::DREB*-растений пшеницы [59], трансгенных растений риса, в которых сверхэкспрессировался ген *JERF3* томата [67] и его собственный ген *OsMYB3R-2* [32], арабидопсиса, в котором экспрессировался ген *ZmbZIP72* кукурузы [66]. Вместе с тем в трансгенных растениях табака с функциональным геном TF кукурузы *ZmABI5*, являющимся негативным

регулятором транскрипции генов, связанных со стресс-устойчивостью, наоборот, содержание свободного Pro снижалось [64].

В ряде исследований, связанных с манипуляциями генами транскрипционных факторов, показаны изменения в уровне транскрипции генов метаболизма и транспорта пролина. В частности, это касается гена δ -OAT трансгенных растений риса, в которых осуществлялась сверхэкспрессия гена своего собственного транскрипционного фактора SNAC2 [22], гена *P5CS* люцерны, содержащей TF сои *GmDREB1* [24], генов синтеза и транспорта пролина трансгенных *Ubi::OsMYB2*-растений риса [65]. Обсуждаемые экспериментальные данные являются аргументом в пользу представления о *L*-пролине как об одном из компонентов общей системы генетической регуляции устойчивости культурных растений к абиотическим факторам.

Одна из сторон метаболической инженерии связана с выяснением роли пролина в процессах реализации морфогенетического потенциала и варибельности его содержания под влиянием обезоруженных штаммов *Agrobacterium tumefaciens*. *L*-Пролин рассматривается как фактор, связанный с пролиферацией и дифференциацией клеток в ходе культивирования *in vitro* [41, 53]. В пользу этого свидетельствуют результаты наших исследований по содержанию свободного Pro в тканях подсолнечника с разной способностью к реализации морфогенетического потенциала, где индукция побегообразования осуществлялась только из тканей с повышенным содержанием пролина [5, 8]. Наряду с этим установлено, что обезоруженный штамм LBA4404, с помощью которого осуществлялась интеграция T-ДНК в геном этого вида, не оказывал влияния на содержание пролина в инокулированных эксплантатах и полученных из них регенерантах.

Молекулярные биотехнологии повышения осмотолерантности культурных растений с использованием генов синтеза и катаболизма пролина. Для повышения уровня накопления *L*-пролина применяются две основные стратегии: 1 — дополнительное введение копий кДНК, ответственных за его синтез (*P5CS* или δ -OAT в смысловой ориентации трансгена); 2 — частичная супрессия эндогенных генов катаболизма пролина *ProDH*, контролирующего первый этап его гидролиза, причем в последнем случае используются фрагменты генов пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации или в форме обращенного повтора. В результате изменения в экспрессии эндогенных генов осуществляются путем посттранскрипционного сайленсинга РНК. В таблице обобщены данные генетической инженерии с использованием генов синтеза и катаболизма *L*-пролина.

Первое исследование, которое показало возможность использования гена *P5CS* для повышения уровня устойчивости растений к водному дефициту, было проведено Кишором и соавт. [27] на модельном объекте — табаке. Авторы продемонстрировали, что именно *P5CS* является энзимом, лимитирующим скорость синтеза пролина в растениях. В дальнейшем перспективность повышения уровня толерантности к разным стрессорам с использованием первого энзима синтеза пролина была показана для некоторых однодольных и двудольных растений (см. таблицу).

Вызывает интерес разработка молекулярных биотехнологий, манипулирующих с генами пролиндегидрогеназы с применением антисмысловых (as) стратегий и siRNA-технологий. Согласно результатам иссле-

дований модельных объектов, аккумуляция Pro может быть сопряжена с отдельными типами стрессоров [2, 4, 36], однако взаимосвязь Pro с осмотолерантностью не всегда очевидна и однозначна [34].

Что касается двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы, то сравнительный анализ трансгенных растений табака с использованием векторных конструкций, содержащих антисмысловую и двухцепочечный РНК-супрессор (дцРНК-супрессор), созданные на основе гена *ProDH* арабидопсиса, показал возможность повышения уровня аккумуляции свободного пролина с применением siRNA-технологии [9]. В исследованиях ученых ИФРГ НАН Украины, проведенных в сотрудничестве с коллегами из Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, проанализирована целесообразность использования siRNA-технологий для повышения уровня устойчивости кукурузы (*Zea mays* L.) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) к водному дефициту и сульфатно-хлоридному засолению. Нами оптимизированы способы получения трансгенных растений этих культур *in vitro* и *in planta* [7, 9, 10]. В отличие от других исследований (см. таблицу) мы применяли летальные дозы стрессоров, моделирующих *in vitro* условия водного дефицита и сульфатно-хлоридного засоления. Такой подход позволил исключить неопределенности, связанные с несоответствием оценок уровня экспрессии гена пролиндегидрогеназы и осмотолерантности, тем самым предоставив возможность однозначного ответа на вопрос о целесообразности частичной супрессии эндогенных генов *ProDH* для повышения устойчивости к водному дефициту и засолению растений. Параллельно такие исследования дали возможность отобрать варианты для получения осмотолерантных линий.

CaMV 35S::*ProDH1*-растения кукурузы. Анализ поколения T1 трансгенных растений кукурузы, несущих дцРНК-супрессор *ProDH*, созданный на основе фрагмента гена *ProDH1* арабидопсиса под контролем конститутивного промотора CaMV 35S, показал, что в условиях жесткого стресса (летальные уровни моделированного водного дефицита и сульфатно-хлоридного засоления) прорастали только зерновки трансгенных растений. В их побегах на ранних этапах онтогенеза при тех же условиях стресса содержание свободного пролина многократно превышало контрольные нетрансгенные варианты в отсутствие и при наличии стрессоров. У CaMV 35S::*ProDH1*-растений, выдержавших при прорастании летальные дозы стрессоров, в нормальных условиях вегетации наблюдались замедление скорости роста и трехкратное превышение содержания пролина в верхних листьях трансгенных растений в фазе молочной спелости по сравнению с нетрансгенным контролем. Часть растений T1 (около 35 %) оказались фертильными, их зерновки были способны к прорастанию. В нормальных условиях вегетации скорость роста трансгенных растений поколения T2 не отличалась от контроля. Образовывались фертильные метелки и 2—4 початка на растение. Зерновки трансгенных вариантов не отличались от контроля. Отметим, что в работе Моисеевой и соавт. [7] показано повышение уровня свободного пролина в проростках трансгенных растений кукурузы, несущих аналогичную векторную конструкцию, при низких уровнях хлоридного засоления. Нами установлена перекрестная устойчивость к водному дефициту и сульфатно-хлоридному засолению (летальные дозы) CaMV 35S::*ProDH1*-растений кукурузы.

CaMV 35S::ProDH1-растения подсолнечника. С использованием дцРНК-супрессора *ProDH* нами показана устойчивость к осмотическим стрессам регенерантов (T0) и проростков поколения T2 трансгенных растений подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), полученных путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации соответственно *in vitro* и *in planta*. В листьях CaMV 35S::*ProDH1*-регенерантов, выдержавших летальные дозы стрессоров, повышалось содержание свободного пролина в 1,5–2 раза в норме, а также в 9 и 6 раз соответственно в условиях водного дефицита и сульфатно-хлоридного засоления.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности частичной супрессии генов *ProDH* кукурузы и подсолнечника для повышения уровня их толерантности к осмотическим стрессам.

Таким образом, молекулярные биотехнологии, манипулирующие генами, контролирующими синтез и катаболизм *L*-пролина, представляют интерес для создания линий трансгенных растений с повышенным уровнем осмотолерантности. Эффективность таких технологий, направленных на повышение уровня аккумуляции свободного *L*-пролина, зависит от многих факторов, в том числе от типа стрессора, вида растений, используемых трансгенов и промоторов. Это предопределяет необходимость дальнейшего углубления представлений о фундаментальных и прикладных аспектах метаболической инженерии по созданию биотехнологических растений.

1. Герасимова С.В., Горелова В.В., Дорогина О.В. и др. Анализ транскрипционной активности промотора гена дельта-орнитинаминотрансферазы *Arabidopsis thaliana* // Генетика. — 2011. — 47, № 5. — Р. 707–710.
2. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов // Физиология растений. — 2012. — 59, № 1. — С. 99–107.
3. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. — 2004. — 40, № 2. — С. 282–285.
4. Моисеева Е.М., Агапов Д.А., Вешков В.А. и др. Повышение содержания пролина в растениях кукурузы, экспрессирующих фрагмент гена пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации // Физиология растений. — 2012. — 59, № 3. — С. 457–460.
5. Сергеева Л.Е., Комисаренко А.Г., Бронникова Л.И. и др. Содержание свободного пролина в тканях подсолнечника при реализации морфогенетического потенциала *in vitro* // Biotechnol. Acta. — 2013. — 6, № 1. — Р. 113–118.
6. Титов С.Е. Изучение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы: Автореф. дис. ... канд биол. наук. — Новосибирск, 2008. — 18 с.
7. Патент на корисну модель № 40142 від 25.03.2009. Спосіб підвищення морфогенетичного потенціалу *in vitro* генотипів соняшника з низькою регенераційною здатністю / С.І. Михальська, Л.Є. Сергеева, А.Г. Комісаренко, О.Е. Маліна, О.М. Тищенко
8. Патент на корисну модель № 64611 від 10.11.2011. Спосіб оцінки морфогенетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендогенного проліну / Л.Є. Сергеева, С.І. Михальська, А.Г. Комісаренко, Л.І. Броннікова, О.М. Тищенко
9. Патент на корисну модель № 77331 від 11.02.2013 року. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* / О.Ю. Матвеева, О.М. Тищенко, Б.В. Моргун
10. Патент на корисну модель № 77323 від 11.02.2013. Спосіб отримання рослин регенерантів із сегментів вузлової зони пагонів методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи / С.І. Михальська, О.М. Тищенко, Н.І. Адаменко, Б.В. Моргун
11. Borsani O., Zhu J., Verslues E. P. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis* // Cell. — 2005. — 123. — Р. 1279–1291.

12. Cecchini N.M., Monteoliva M., Alvarez M.E. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms // *Plant Signal Behav.* — 2011. — **6**, N 8. — P.1195–1197.
13. De Ronde J.A., Spreeth M.H., Cress W.A. Effect of antisense *L*-D1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress // *Plant Growth Regul.* — 2000. — **32**, N 1. — P. 13–26.
14. Deuschle K., Funck D., Forlani G. et al. The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation // *Plant Cell.* — 2004. — **16**, N 12. — P. 3413–3425.
15. Dobra J., Vankova, R., Havlova M. et al. Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery // *Plant Physiol.* — 2011. — **168**, N 13. — P.1588–1597.
16. Fujita T., Maggio A., Garcia-Rios M. et al. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for D¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato // *Ibid.* — 1998. — **118**. — P.661–674.
17. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis // *BMC Plant Biol.* — 2008. — **8**: 10:40 doi:10.1186/1471-2229-8-40.
18. Ghanti S. K. K., Sujata K.G., Kumar B.M. V. et al. Heterologous expression of *P5CS* gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield // *Biol. Plant.* — 2011. — **55**, N 4. — P. 634–640.
19. Ginzberg I., Stein, H., Kapulnik Y. et al. A. Isolation and characterization of two different cDNAs of D¹-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress // *Plant Mol. Biol.* — 1998. — **38**. — P. 755–764.
20. Hanson J., Hanssen M., Wiese A. et al. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects aminoacid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase1 and proline dehydrogenase2 // *Plant J.* — 2008. — **5**, N 3. — P. 935–949.
21. Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D. P. S. Removal of feedback inhibition of D¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress // *Plant Physiol.* — 2000. — **122**, N 4. — P. 1129–1136.
22. Hu H., You J., Fang Y. et al. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice // *Plant Mol Biol.* — 2008. — **67**, N 1–2. — P. 169–81.
23. Hur J., Jung K.H., Lee C.H., An G. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice // *Plant Sci.* — 2004. — **167**. — P. 417–426.
24. Jin T., Chang Q., Li W. et al. Stress-inducible expression of GmDREB1 conferred salt tolerance in transgenic alfalfa // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2010—. **100**. — P. 219–227.
25. Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y. et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content // *Plant J.* — 2007. — **50**. — P. 967–981.
26. Karthikeyan A., Pandian S. K., Ramesh M. 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* — 2011. — **107**, N 3. — P. 383–395.
27. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // *Curr. Sci.* — 2005. — **88**, N 3. — P. 424–438.
28. Kiyosue T., Yoshiba Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis // *Plant Cell.* — 1996. — **8**. — P.1323–1335.
29. Kumar V., Shriram V., Kavi Kishor P. B. et al. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing *P5CSF129A* gene // *Plant Biotechnol. Rep.* — 2010. — **4**, N 1. — P. 37–48.
30. Lv W.-T., Bin Lin, Min Zhang, Xue-Jun Hua. Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress // *Plant Physiol.* — 2011. — **156**. — P. 1921–1933.
31. Ma A., Mitchell H.J., Deuschle K., Pryor A.J. Comparative analysis in cereals of a key proline catabolism gene // *Mol. Gen. Genomics.* — 2005. — **274**, N 5. — P. 494–505.
32. Ma Q., Dai X., Xu Y. et al. 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.* — 2009. — **150**, N 1. — P. 244–256.
33. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? // *Plant J.* — 2002. — **3**, N 16. — P. 699–712.
34. Mani S., Van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis // *Plant Physiol.* — 2002. — **128**. — P. 73–83.
35. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate proline accumulation // *Planta.* — 2005. — **222**, N 1. — P. 70–79.

36. Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T. et al. 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.* — 1998. — **18**, N 4. — P. 1233–1241.
37. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y. et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* — 1999. — **461**. — P. 205–210.
38. Oono Y., Seki M., Nanjo T. et al. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7,000 full-length cDNA microarray // *Plant J.* — 2003. — **34**, N 6. — P. 868–887.
39. Peng Z., Lu Q., Verna D.P. Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants // *Mol. Gen. Genet.* — 1996. — N 3. — P. 334–341.
40. Pospisilova J., Haisel D., Vankova R. Responses of transgenic tobacco plants with increased proline content to drought and/or heat stress // *AJPS.* — 2011. — **2**, N 3. — P. 318–324.
41. Rastagi S., Rizvi S.M.H., Singh R.P., Dwivedi A.N. In vitro regeneration of *Zeaucaena eucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis // *Biol. Plant.* — 2008. — **52**, N 4. — P. 743–748.
42. Razavizadeh R., Ehsanpour A. 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.* — 2010. — **46**, N 2. — P. 63–75.
43. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K. et al. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // *Mol. Breed.* — 2002. — **9**, N 2. — P. 73–80.
44. Roosens N.H., Thu T.T., Iskandar H.M., Jacobs M. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* — 1998. — **117**, N 1. — P. 263–271.
45. Saeid M.A.-R., Ammari T.G., Irshaid L.A. et al. Cloning and expression patterns of the *HvP5CS* gene from barley (*Hordeum vulgare*) // *J. Food, Agric. Environ.* — 2011. — **9**, N 3–4. — P. 279–284.
46. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K. et al. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis* // *Plant, Cell Physiol.* — 2004. — **45**. — P. 309–317.
47. Satoh R., Nakashima K., Seki M. et al. ACTCAT/ a novel cis-acting element for proline — and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase gene in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**, N 3. — P. 709–719.
48. Savoure A., Jaoua S., Hua X.J. et al. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* — 1995. — **372**, N 1. — P. 13–19.
49. Seryet C., Ghelis T., Richard L. et al. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis // *Front Biosci.* — 2012. — **1**, N 17. — P. 607–620.
50. Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential // *Plant Physiol.* — 2011. — **157**. — P. 292–304.
51. Su J., Wu R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis // *Plant Sci.* — 2004. — **166**, N 4. — P. 941–948.
52. Su M., Li X.-F., Ma X.-Y. et al. Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment // *Ibid.* — 2011. — **181**. — P. 652–659.
53. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* — 2009. — **15**, N 2. — P. 89–97.
54. Szekely G., Abraham E., Cseplo A. et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis // *Plant J.* — 2008. — **53**, N 1. — P. 11–28.
55. Turchetto-Zolet A. C., Margis-Pinheiro M., Margis R. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis // *Mol. Gen. Genomics.* — 2009. — **281**. — P. 87–97.
56. Vendruscolo E.C., Schuster I., Pileggi M. et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat // *Plant Physiol.* — 2007. — **164**, N 10. — P. 1367–1376.
57. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: A review // *Amino Acids.* — 2008. — **35**. — P. 753–759.
58. Verdoy D., Coba De La Pena T., Redondo F.J. et al. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress // *Plant Cell Environ.* — 2006. — **29**, N 10. — P. 1913–23.

59. Wang J.W., Yang F.P., Chen X.Q. et al. Induced expression of DREB transcriptional factor and study on its physiological of drought tolerance in transgenic wheat // Acta Gen. Sinica — 2006. — **33**. — P. 468—476.
60. Williamson L.C., Slocum D.R. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the D¹-pyrroline-5-carboxylate synthase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Physiol. — 1992. — **100**. — P. 1464—1470.
61. Wu L., Fan Z., Guo L. et al. Over-expression of an *Arabidopsis* δ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice // Chinese Sci. Bull. — 2003. — **48**, N 23. — P. 2594—2600.
62. Xue X., Liu A., Hua X. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus* // BMB reports. — 2009. — **42**, N 1. — P. 28—34.
63. Yamada M., Morishita H., Urano K. et al. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress // J. Exp. Bot. — 2005. — **56**, N 417. — P. 1975—1981.
64. Yan F., Deng W., Wang X. et al. Maize (*Zea mays* L.) homologue of ABA-insensitive (ABI) 5 gene plays a negative regulatory role in abiotic stresses response // Plant Grow. Regul. — 2012. doi 10.1007/s10725-012-9727-x.
65. Yang A., Dai X., Zhang W.H. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice // J. Exp Bot. — 2012. — **63**, N 7. — P. 2541—2556.
66. Ying S., Zhang D.F., Fu J. et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* // Planta. — 2012. — **235**, N 2. — P. 253—266.
67. Zhang H., Liu W., Wan L. et al. Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice // Transgen. Res. — 2010. — **19**, N 5. — P. 809—818.

Получено 14.10.2013

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ГЕНІВ МЕТАБОЛІЗМУ
L-ПРОЛІНУ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ОСМОТОЛЕРАНТНОСТІ РОСЛИН

О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

В огляді розглянуто генетичні та фізіологічні аспекти генетичної інженерії, пов'язані з використанням генів, що контролюють синтез та катаболізм L-проліну. Обговорено перспективність цього напрямку генетичної інженерії для підвищення осмотолерантності культурних рослин.

GENETIC ENGINEERING WITH USE OF L-PROLINE METABOLISM GENES FOR
INCREASE OF PLANT OSMOTOLERANCE

E.N. Tishchenko

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

Genetical and physiological aspects of genetic engineering regarding the genes of synthesis and catabolism of L-proline were reviewed. The perspectives of this direction of genetic engineering for osmotolerance increasing are discussed.

Key words: P5CS, ProDH, δ -OAT, *Agrobacterium*-mediated transformation.