

ВОРОНОВА С.С.✉, **ДУБРОВНА О.В.**

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: s.voronova.s@gmail.com
✉s.voronova.s@gmail.com

ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТОЛЕРАНТНОСТІ РОСЛИН М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.), ЩО МІСТЯТЬ ДВОЛАНЦЮГОВИЙ РНК-СУПРЕСОР ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Однією з універсальних захисних реакцій рослин у відповідь на дію посухи, засолення та інших абіотичних факторів, що порушують водний статус, є акумуляція сумісних осмолітів, які мають осморегуляторний та стрес-протекторний ефект [1–3]. Очікується, що їх накопичення підвищує стійкість рослин до осмотичного та окисного стресу [4], стабілізує білкові комплекси [5]. Найпоширенішим і найбільш вивченим серед сумісних осмолітов є пролін. Активно розглядають гіпотезу про те, що підвищення рівня вільного L-проліну – фізіологічна реакція багатьох видів рослин у відповідь на різні типи абіотичних стресів [1, 3, 6–8].

Для модифікації рівня вільного проліну сучасні методи генетичної інженерії дозволяють використовувати не тільки власні гени рослин, але й гени інших організмів [9]. Для акумуляції вільного L-проліну основна увага приділяється генам, що контролюють швидкість-лімітуючі ензими його синтезу та деградації. Використовують додаткове введення копій кДНК, відповідальних за його синтез (P5CS або δ -OAT у сенсовій орієнтації), та часткову супресію ендегенних генів (проліндегідрогеназа (ProDH)), які відповідають за деградацію Pro. В останньому випадку використовуються фрагменти генів ProDH у антисенсовій орієнтації або у вигляді інвертованого повтору, що призводить до зміни в експресії ендегенних генів шляхом посттранскрипційного сайленсінгу РНК [10].

Спроби збільшення вмісту вільного проліну в рослинній клітині генно-інженерними методами до теперішнього часу не дали однозначної відповіді про повний спектр його функцій у складному багатоступінчатому процесі адаптації рослин до стресу. В одних випадках показано прямий зв'язок між рівнем накопичення проліну і стресостійкістю в отриманих генетично модифікованих рослин [11–17], в інших випадках такий зв'язок простежувався дуже мало [18–21]. Так, під час дослідження пшениці

(*Triticum aestivum* L.), за дії осмотичного стресу, Poustini та ін. виявили позитивну кореляцію між рівнем вільного проліну та осмотичним потенціалом [22]. Крім того, було показано, що трансгенні рослини тютюну з підвищеним рівнем біосинтезу проліну демонструють підвищену толерантність до гіперосмотичного стресу [11], що свідчить про зв'язок між рівнем проліну і толерантністю до осмотичного стресу.

Доведено, що рівень вільного проліну, який накопичується в рослинах у відповідь на дію стресових чинників, значно варіює (збільшення до 100 разів у порівнянні з контрольною групою) і в значній мірі залежить від виду рослин [8]. У зв'язку з цим метою дослідження було проаналізувати осмотостійкість трансгенних рослин м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*).

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були трансгенні лінії пшениці сорту Зимоярка – Зимоярка 1, 11, 43, отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in vitro*. У якості контролю використовували нетрансформовані рослини сорту Зимоярка. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили згідно з описаними методиками [23], з використанням штаму AGLO, що містить векторну конструкцію pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh Arabidopsis*, а також селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Векторна конструкція була надана д. б. н. А. В. Кочетовим (Інститут цитології і генетики СВ РАН, м. Новосибірськ). Трансгенний статус регенерантів підтверджували методом ПЛР.

Оцінку стійкості трансгенних рослин до осмотичного стресу проводили в умовах *in*

in vitro. Для індукції осмотичного стресу рослини-регенеранти вирощували в умовах освітлення на безгормональному середовищі МС [24] з додаванням сублетальної дози маніту – 0,8 М. Для контролю нетрансгенні регенеранти R₀ сорту Зимоярка вирощували на середовищі без додавання маніту – негативний контроль та з додаванням 0,8 М маніту – позитивний контроль. Дослідження стійкості трансгенних рослин до осмотичних стресових чинників проводили протягом 2-х пасажів.

Вміст вільного L-проліну у свіжому рослинному матеріалі визначали за методом Bates et al. [25] у трансгенних та контрольних рослин (К-) у трьох біологічних повторностях. Оцінку достовірності різниці між вмістом проліну в трансгенних та контрольних рослинах визначали за допомогою коефіцієнта Стьюдента.

Результати та обговорення

Осмотично активні речовини *in vitro* в першу чергу впливають на водний баланс клітин, показниками якого є тургор та ріст рослин. Обрана концентрація викликала повну загибель рослин позитивного контролю після першого пасажу внаслідок обезводнення.

Нами була проаналізована здатність рослин м'якої пшениці, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена *pdh*, до збільшення біомаси в умовах осмотичного стресу. Рисунок 1 відображає узагальнені результати визначення сирі

біомаси біотехнологічних та контрольних рослин. Показано, що за оптимальних умов (середовище МС, без додавання маніту) ріст трансгенних рослин істотно не відрізняється від контрольних (рис. 1 а). Сира маса рослин у середньому становила 577 мг. Однак як трансгенні, так і контрольні (вихідні) рослини зменшували накопичення біомаси за дії стресового фактора (середовище МС з додаванням 0,8 М маніту), але зміни в метаболізмі трансгенних рослин дозволили їм краще пристосуватись до несприятливих умов і сформувати більшу біомасу. Таким чином біотехнологічні рослини мали кращу адаптаційну пластичність (рис. 1 б).

Отже, вбудовування векторної конструкції рВі2Е не призводить до достовірних відмінностей за сирою біомасою рослин, що ростуть на середовищі МС, проте достовірно збільшує сирю біомасу рослин на середовищі з додаванням 0,8 М маніту в порівнянні з контрольними рослинами. За вирощування контрольних рослин пшениці на середовищі з манітом їх ріст поступово припинявся, тому сира маса рослин була значно нижчою, становила близько 298 мг. Трансгенні рослини мали більшу сирю масу рослин, яка була вищою в порівнянні з контролем у 1,78 раза. Таким чином, дія осмотичного стресу достовірно знижує масу контрольних рослин і не призводить до достовірних змін сирі маси трансгенних рослин в порівнянні зі сприятливими умовами.

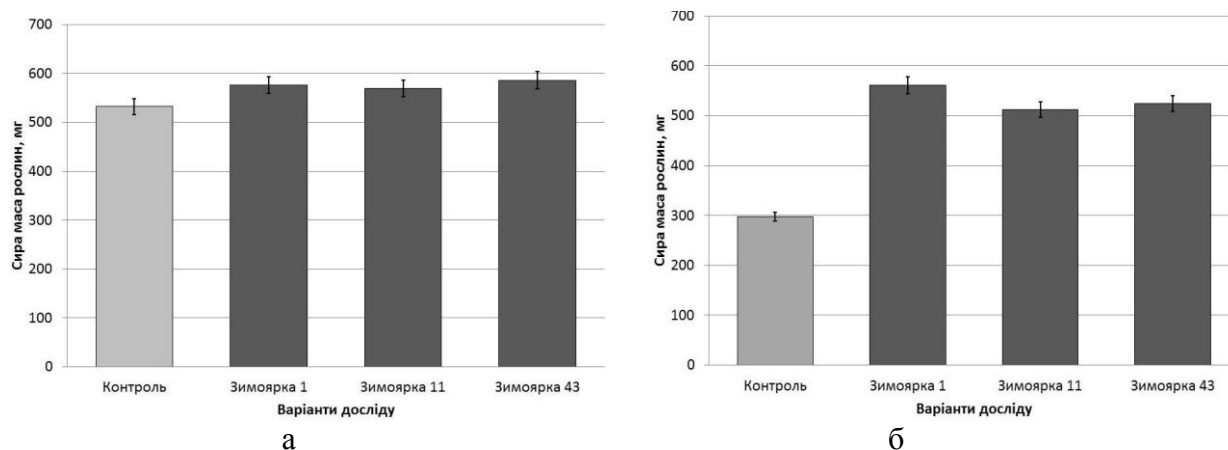


Рис. 1. Оцінка осмотостійкості рослин із дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh*: а – результати вимірювання сирі біомаси рослин на середовищі МС; б – результати вимірювання сирі біомаси рослин на середовищі МС з додаванням 0,8 М маніту.

Трансгенні рослини зі зниженою активністю гена *pdh* за фізіологічних умов вирощування не мали фенотипових відмінностей від вихідних рослин (рис. 2 а). Однак на поживному середовищі МС з додаванням маніту трансформанти розвивалися інтенсивніше, формували пагони більшого розміру та більшу кількість листків і коренів, ніж контрольні рослини (рис. 2 б). Фенотип рослин зі зниженою експресією гена *pdh* проявлявся у посиленому формуванні коренів і підвищеній здатності до росту в умовах осмотичного стресу.

Також визначали вміст вільного L-проліну в листках трансгенних та контрольних рослин за нормальних умов і умов осмотичного стресу. Вміст вільного проліну в контрольних рослинах на середовищі МС був на рівні 23 мк%/г сирової маси, а у трансгенних майже в 2 рази більшим – від 42 до 49 мг%/г сирової маси (рис. 3 а). Слід зазначити, що за дії стресового чинника вміст проліну збільшився і в контрольних, і в трансгенних форм. В умовах осмотичного стресу значення середньоарифметичного вмісту проліну в трансгенних рослинах пшени-

ці, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена *pdh* ($460 \pm 11,9$ мг%/г сирової маси), перевищувало майже у 5 разів це значення у контрольних рослин ($98 \pm 5,1$ мг%/г сирової маси). У контролю кількість проліну збільшилася приблизно в 4 рази, в той час як у генетично-модифікованих форм концентрація амінокислоти підвищилася майже у 10 разів.

Отже, у досліджених трансгенних ліній м'якої пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh* у відповідь на дію осмотичного стресу, викликаного сублетальною дозою маніту, активно відбувалося накопичення вільного проліну. Підвищений рівень проліну у трансформантів може відображати активність і ефективність використаної генетичної конструкції для супресії гена *pdh*. Показано, що часткова супресія гена *pdh* супроводжується не тільки підвищенням рівня вільного проліну, а й підвищенням рівня стійкості рослин пшениці до водного дефіциту, що дозволяє висунути гіпотезу про можливість контролю осмотостійкості за рахунок зміни активності цього ферменту.



Рис. 2. Фенотип контрольних та трансгенних рослин за сприятливих умов та в умовах осмотичного стресу: а – контрольна рослина; б – трансгенна рослина.

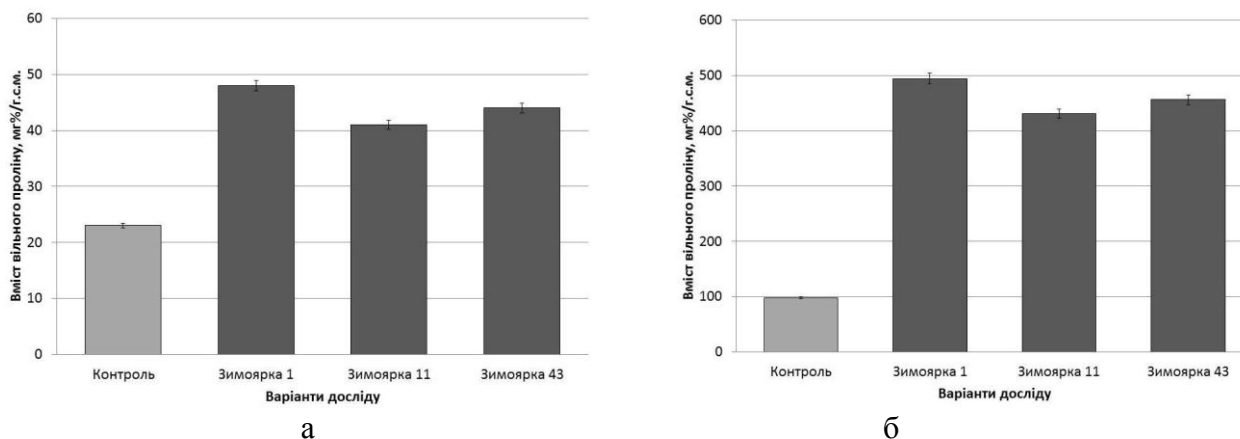


Рис. 3. Вміст вільного проліну у листі рослин м'якої пшениці: а – за нормальних умов; б – за умов дії осмотичного стресу.

Висновки

Таким чином, використання векторної конструкції рВі2Е, що містить дволанцюговий РНК-супресор гена *pdh* є ефективним для створення трансгенних рослин м'якої пшениці з підвищеним рівнем стійкості до абіотичних стресових чинників, зокрема водного дефіциту. Показано, що у досліджених трансгенних рослин м'якої пшениці, у відповідь на дію осмотичного стресу, викликаного сублетальною дозою маніту, активно відбувається накопичення віль-

ного проліну. Встановлено, що трансгенні рослини не відрізняються від контрольних за морфологічними параметрами і строками розвитку. Виявлено взаємозв'язок між катаболізмом проліну і стійкістю до осмотичного стресу, що може бути пов'язано або з впливом проліну на експресію інших генів стресової відповіді рослин, або з позитивним впливом збільшеного вмісту проліну на стійкість на ранніх етапах розвитку стресу.

Література

- Hare P.D., Cress W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants // *Plant Growth Regulation*. – 1997. – V. 21. – P. 79–102.
- Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress // *Plant Cell Environm.* – 1998. – V. 21. – P. 535–553.
- Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролін при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиология растений*. – 1999. – Т. 46. – С. 321–336.
- Smirnov N., Cumbes Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // *Phytochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 1057–1060.
- Russo A.T., Rosgen J., Bolen D.W. Osmolyte effects on kinetics of FKBP12 C22A folding coupled with prolyl isomerization // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V. 330. – P. 851–866.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Current Science*. – 2005. – V. 88, N. 3. – P. 424–436.
- Fabro G., Kovács I., Pavet V. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2004. – V. 17, № 4. – P. 343–350.
- Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // *Amino Acids*. – 2008. – V. 35. – p. 753–759.
- Sreenivasulu N., Sopory S.K., Kavi Kishor P.B. Deciphering the Regulatory Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Plants by Genomic Approaches // *Gene*. – 2007. – V. 388. – P. 1–13.
- Delauney A.J., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants // *Plant Journal*. – 1993. – V. 4. – P. 215–223.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.-H. Overexpression of a delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108. – P. 1387–1394.
- Xin Z., Browse J. Eskimo1 Mutants of *Arabidopsis* Are Constitutively Freezing-Tolerant // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 95. – P. 7799–7804.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y. Antisense Suppression of Proline Degradation Improves Tolerance to Freezing and Salinity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 461. – P. 205–210.
- Konsnatinova T., Parvanova D., Atanassov A. Freezing Tolerant Tobacco, Transformed to Accumulate Osmoprotectants // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 157–164.
- Verdoy D., Coba de la Peña T., Redondo F.J. Transgenic *Medicago truncatula* Plants That Accumulate Proline Display Nitrogen-Fixing Activity with Enhanced Tolerance to Osmotic Stress // *Plant Cell Environ.* – 2006. – V. 29. – P. 1913–1923.

16. Мохаммед А.М., Ралдугина Г.Н., Холодова В.П. Аккумуляция осмолитов растениями различных генотипов рапса при хлоридном засолении // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – С. 732–738.
17. Мохаммед А.М., Титов С.Е., Кочетов А.В. Физиолого-молекулярные характеристики трансгенных растений рапса, несущих антисмысловой супрессор гена пролинедегидрогеназы // Матер. IX Межд. конф. молодых ботаников в Санкт-Петербурге. – Санкт-Петербург, 2006. – С. 201–202.
18. Maggio A., Bressan R.A., Hasegawa P.M. Moderately Increased Proline Level Does Not Alter Osmotic Stress Tolerance // *Physiol. Plant.* – 1997. – V. 101. – P. 240–246.
19. Mani S., van de Cotte B., van Montagu M. Altered Level of Proline Dehydrogenase Cause Hypersensitivity to Proline and Its Analogs in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 128. – P. 73–83.
20. Ribarits A., Abdullaev A., Tashpulatov A. Two Tobacco Proline Dehydrogenases Are Differentially Regulated and Play a Role in Early Plant Development // *Planta.* – 2007. – V. 225. – P. 1313–1324.
21. Ueda A., Shi W., Shimada T. Altered Expression of Barley Proline Transporter Causes Different Growth Responses in *Arabidopsis* // *Planta.* – 2008. – V. 227. – P. 277–286.
22. Poustini, K., Siosemardeh, A., Ranjbar M. Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance // *Genetic Resources and Crop Evolution.* – 2007. – V. 54, № 5. – P. 925–934.
23. Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.-H. Overexpression of a delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108. – P. 1387–1394.
24. Бавол А.В., Воронова С.С., Дубровна О.В. Оптимізація *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур пшениці // Физиология растений и генетика. – 2015. – 47, № 1. – С. 58–65.
25. Bates L.S., Waldren R.P., Teare L.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies // *Plants and Soil.* – 1973. – V. 39, № 1. – p. 205–207.
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

VORONOVA S.S., DUBROVNA O.V.

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

DETERMINATION OF OSMOTOLERANCE OF BREAD WHEAT PLANTS (*TRITICUM AESTIVUM* L.), CARRYING dsRNA-SUPPRESSOR OF PROLINE DEHYDROGENASE GENE

Aim. Analysis of tolerance to osmotic stress of transgenic wheat plants, carrying a dsRNA-suppressor of prolinedegidrogenase gene. **Methods.** Physiological and biochemical methods were used to characterize the transgenic plants. **Results.** It is shown that partial suppression of gene prolinedegidrogenase was accompanied not only increase the level of free proline, but higher levels of resistance of transgenic wheat plants to water deficit. It is found that transgenic plants do not differ from control by morphological parameters and timing of development. **Conclusions.** The interrelation between catabolism of proline and resistance to osmotic stress was identified, which may be due to the influence of proline or the expression of other genes of plant stress response, or positive impact of increased resistance to proline content in the early stages of stress.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*, dsRNA-suppressor proline dehydrogenase gene, osmotolerance.