

МИХАЛЬСЬКА С. І.[✉], КОМІСАРЕНКО А. Г., КУРЧІЙ В. М., БРОННІКОВА Л. І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-6644-5921, 0000-0003-2081-4055, 0000-0002-8111-2017, 0000-0002-8103-0548

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.com, (050) 380-65-15

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ

Мета. Аналіз фізіолого-біохімічних характеристик генетично модифікованих рослин пшениці з частково супресованою активністю гена проліндегідрогенази. **Методи.** Визначення активності проліндегідрогенази (ПДГ), вмісту вільного L-проліну (Pro); вмісту вуглеводів (сахарози і фруктози). **Результати.** Встановлено, що за умов водного дефіциту у генетично модифікованих рослин пшениці з інтегрованими елементами, що утворюють дволанцюговий РНК супресор гена *pdh*, відбувається часткове пригнічення активності ферменту та збільшення вмісту вільного проліну. Відмічені зміни вуглеводного метаболізму за стресової дії водного дефіциту та в перші години після регідратації, при цьому співвідношення сахароза / фруктоза у контрольних рослин істотно знижується при зневодненні та нормалізується при відновленні водопостачання; у генетично модифікованих рослин цей показник за короткотривалої стресової дії водного дефіциту майже не змінюється. **Висновки.** Часткова супресія гена проліндегідрогенази обумовлює підвищення вмісту вільного проліну, який за стресових умов сприяє підтриманню балансу вуглеводів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., пролін, проліндегідрогеназа, вуглеводи, сахароза, фруктоза.

Маючи здатність організувати програму свого індивідуального розвитку в залежності від переважних умов культивування, пристосувальна реакція рослин до стресу включає зміни в регуляторних і метаболічних структурах, рівень взаємозв'язків яких поєднує різні типи адаптивних реакцій. Останнім часом розвиток методів молекулярного аналізу дав можливість встановити, експресія яких генів змінюється у відповідь на дію того чи іншого стресу та показав, що генетичний контроль механізмів адаптації до різних видів несприятливих впливів представляє складну систему взаємодіючих генів, шляхів передачі сигналів та регуляторних фак-

торів [1]. Серед багатьох стрес-індукованих генів виділені ті, продуктами яких є функціональні білки та ферменти, що безпосередньо захищають від негативного впливу навколишнього середовища. У відповідь на осмотичний стрес у рослинах накопичуються низькомолекулярні органічні сполуки, які отримали назву «сумісних осмолітів». Вони мають здатність підтримувати осмотичний потенціал цитоплазми, не будучи токсичними для клітинних компонентів. Важлива роль у підтримці осмотолерантності рослин належить вільному проліну, який є одним із найбільш багатофункціональних стресових метаболітів у рослин [2]. Крім добре відомої функції як інертного сумісного осмоліту, пролін за дії стресорів виконує цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів, є джерелом енергії, підтримує вміст азоту та вуглецю [2, 3]. Фундаментальна роль проліну в осмотичній регуляції та підвищенні здатності рослин протистояти зневодненню клітин викликаному засоленням, посухою або екстремальними температурами, досить добре вивчена. Відносно невисоке підвищення вмісту проліну, зазвичай на початку дії стресора, виконує антиоксидантну роль, більш істотне, на більш пізніх стадіях стресової реакції, може виконувати осмопротекторні функції. Ендогенний Pro також може діяти як регуляторна / сигнальна молекула, здатна змінювати рівні транскриптів генів, пов'язаних зі стресом [4–6]. Адаптивний потенціал рослин пшениці залежить від збалансованості основних ланок метаболізму, в тому числі і від характеру обміну вуглецю, який є визначальним за перепрограмування загального метаболізму клітини до стресових факторів, а низькомолекулярні вуглеводи, такі як сахароза, гексоза, фруктоза та інші сприяють різним фізіологічним процесам і необхідні як субстрат та сигнал при захисних реакціях рослин пшениці [7].

© МИХАЛЬСЬКА С. І., КОМІСАРЕНКО А. Г., КУРЧІЙ В. М., БРОННІКОВА Л. І.

У випадку коли інтеграція трансгена передбачає зміни метаболізму вільного проліну не виключається імовірність пролін-опосередкованої дії на вміст вуглеводів, тому метою цієї роботи було дослідження залежності вуглеводного складу від зміни вмісту вільного проліну у генетично модифікованих рослин пшениці з частково супресованою активністю гена його катаболізму за дії нетривалого водного дефіциту.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було насінневе покоління T2 генетично-змінених рослин пшениці озимої генотипів УК 322/17 та УК 209h, які були отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму *A. tumefaciens* AGLO, що несе векторну конструкцію рВі2Е [8].

Біотехнологічні рослини УК 322/17T2 та УК 209hT2 (з дволанцюговим РНК супресором гена *pdh*) та їх вихідні форми вирощували в умовах вегетаційного досліду, у посудинах об'ємом 10 л, наповнених ґрунтосумішшю. У фазу виходу в трубку рослини піддавали дії осмотичного стресу шляхом припинення поливу протягом 4 діб, після чого полив відновлювали. Контрольні рослини вихідних та трансгенних форм вирощували за умов нормального поливу. Відбір зразків для аналізу проводили в 3-разовій повторності.

Активність ферменту ПДГ, вміст вільного L-проліну, вуглеводів (сахарози та фруктози) у досліджуваних варіантах визначали за нормальних умов культивування, на 4 добу осмотичного стресу та 1 добу після регідратації. Про визначали по утворенню забарвленого продукту взаємодії L-проліну з нінгідринним реактивом

[9]. Активність проліндегідрогенази оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ на окислення L-проліну, шляхом вимірювання збільшення концентрації НАДН за одиницю часу (1 хв) [10]. Вміст розчинних вуглеводів визначали резорциновим методом після фіксації рослинного матеріалу киплячим етанолом та триразового екстрагування цукрів 80 %-м етанолом [11].

Результати та обговорення

Для того щоб безпосередньо оцінити дієвість введеної векторної конструкції, факт часткової супресії гена проліндегідрогенази пшениці встановлювали на рівні активності ферменту. Порівняльний аналіз активності проліндегідрогенази в прапорцевих листках трансформантів і рослин вихідних генотипів за фізіологічних умов та за умов водного дефіциту показав, що часткова супресія гена *pdh* приводить до зниження активності фермента (рис. 1).

Так у рослин пшениці з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази активність ПДГ за нормальних умов поливу була нижчою в середньому в 1,5 рази, ніж у їх вихідних форм. Тоді як в умовах осмотичного стресу активність ферменту у генетично модифікованих рослин була меншою майже на 20–28 %. Це може бути свідченням того, що окрім фізіологічно обумовленого зниження експресії гена катаболізму проліну за дії стресу, інтродуковані в геном пшениці елементи гена проліндегідрогенази арабідопсису, утворюють дволанцюгові ділянки, які запускають генетичний сайленсинг та спричинюють часткове пригнічення активності ендогенного гена *pdh* пшениці.

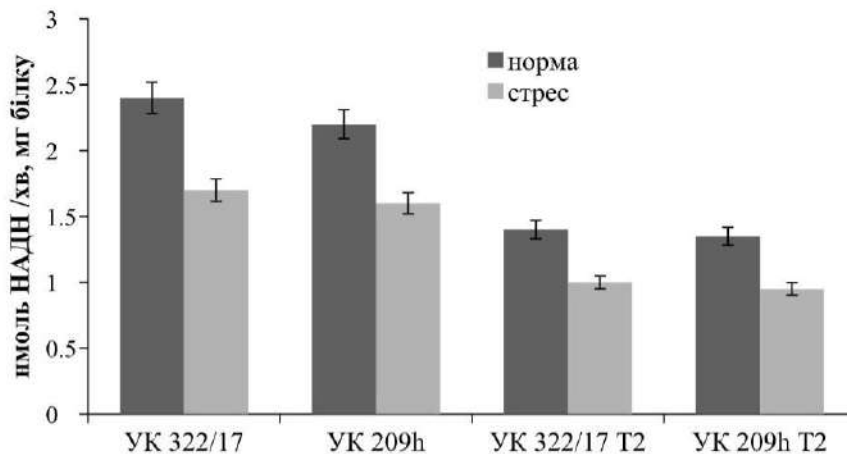


Рис. 1. Активність фермента проліндегідрогенази в трансгенних рослин пшениці.

Імовірно, що при наявності супресії окремої ланки метаболізму проліну баланс його синтезу та деградації також має змінитись. У зв'язку з цим дослідження вмісту вільного проліну у генетично змінених рослин за нормальних умов та під час стресового впливу водного дефіциту можуть сприяти виявленню адаптивних реакцій з боку рослини. Аналізуючи реакції рослин пшениці на дію нетривалого водного дефіциту вже на 4-у добу у всіх рослин відмічали аналогічні зовнішні зміни, а саме скручування листкових пластинок. Після поновлення поливу рослини набували звичайного вигляду і в подальшому розвивались без порушень. Різниця між варіантами не спостерігали. Тобто, зневоднення не було критичним і не викликало незворотних патологій.

Рівень вільного проліну на 1-у добу після припинення зволоження був відносно не високий у всіх генотипів з достовірною перевагою у трансгенних варіантів (табл. 1). Із тривалістю дії водного дефіциту вміст вільного Pro зростав як у контрольних, так і біотехнологічних рослин. Причому, тенденція більшої акумуляції проліну в генетично-модифікованих рослин зберігалась, незважаючи на те, що за стресових умов у вихідних форм вміст амінокислоти збільшувався майже в три рази, тоді як у генетично модифікованих тільки в два.

Після відновлення поливу рівень вільного проліну у контрольних рослин знижувався і складав ~ 50 % від максимальних показників. У трансгенних варіантів при регідратації зміни в акумуляції Pro були менш суттєвими. В середньому його вміст зменшувався на 15–20 %.

Характер змін рівня амінокислоти за умов норма → стрес → відновлення свідчить, що у генетично модифікованих рослин при посиленні водного дефіциту рівень вільного проліну зростав і підтримувався у перші години після регідратації, що можливо в результаті саме супресії гена проліндегідрогенази.

Відомо, що окрім коливань вмісту Pro рівень стійкості рослинного організму до стресових факторів забезпечується перебудовою вуглеводного метаболізму, спрямованого на адаптацію рослинного організму до несприятливих чинників. Протекторна функція цукрів полягає в захисті білково-ліпідних комплексів клітин у разі зневоднення, а як осмопротектори вони здатні підвищувати осмотичний потенціал клітин рослин. Посуха може викликати як зниження, так і підвищення вмісту в клітині розчинних цукрів [12]. Швидше за все це можна пояснити різним рівнем стійкості та ступенем зневоднення рослин. Інтенсивність синтезу сахарози, її включення в метаболізм стійких і чутливих до водного стресу рослин можуть значно різнитись.

Раніше нами встановлено, що супресія генів катаболізму проліну приводить до змін у метаболізмі сахарози. При аналізі насінневого T4 покоління кукурудзи показано, що вміст сахарози в досліджуваних генотипів на 1-у добу припинення поливу варіював за абсолютною величиною. Очевидно, що такі показники могли бути наслідком функціонування трансгену, оскільки, водного стресу рослини не відчували, а рівень проліну за таких умов вирощування перевищував у трансгенних рослин показники контролю, більше ніж у два рази [13].

Перебіг адаптивних реакцій пшениці відслідковували за динамікою змін вмісту сахарози та фруктози. За нормальних умов вміст сахарози в тканинах контрольних рослин пшениці був суттєво нижчим, ніж у генетично змінених (табл. 2). На 4-у добу зневоднення фіксували різноспрямовані зміни її вмісту в листках рослин. Так, у контрольних варіантів рівень сахарози був стабільним. У рослин з супресованою активністю проліндегідрогенази він різко знижувався. Після регідратації рівень сахарози в листках всіх варіантів зростав у різній мірі, де найбільше збільшення було властиве контролю.

Таблиця 1. Вміст вільного проліну (мг/% сирової речовини) в рослинах пшениці за умов нетривалого зневоднення / регідратації.

Генотип	1 доба зневоднення	4 доба зневоднення	Регідратація
УК 209 h	20,90±0,83	60,56±0,97	33,75±0,65
УК 209 h T2	41,51±0,76	86,93±1,03	70,57±0,93
УК 322/17	23,02±0,47	63,07±1,53	35,36±0,75
УК 322/17T2	43,51±0,96	90,03±1,84	77,06±1,36

Таблиця 2. Вміст вуглеводів (сахарози та фруктози) у трансгенних і контрольних рослин пшениці за умов норма→стрес→відновлення

Варіанти	Сахароза, Ммоль сахарози / г сирової речовини			Фруктоза, Ммоль фруктози / г сирової речовини		
	Норма	Стрес	Відновлення	Норма	Стрес	Відновлення
Контроль УК 322/17 №1	124,1±0,7	128,9±2,6	174±0,0	58,9±0,1	115,7±0,8	83,6±0,9
Контроль УК 322/17 №2	119,0±2,2	126,4±0,6	209,9±1,8	63,8±1,1	110,9±2,3	94,6±0,8
УК 322/17 Т2 №1	194,4±1,3	108,6±0,2	161,3±2,5	83,6±0,0	64,0±0,3	70,3±0,3
УК 322/17 Т2 №2	209,6±3,0	119,8±2,5	166,9±3,3	92,5±3,7	61,9±1,5	73,2±0,2

Рівень фруктози в листках контрольних рослин при дії водного дефіциту підвищувався майже в 2 рази та знижувався після регідратації. У генетично модифікованих рослин рівень фруктози змінювався у незначних межах, синхронно змінам рівня сахарози. Отримані дані можуть свідчити про комплексні адаптивні процеси в клітинах тканин контрольних варіантів шляхом накопичення цукрів та проліну. Відомо, що цукри, які нагромаджуються за стресових умов, передусім сахароза і фруктоза, захищають білки від денатурації та підтримують цілісність мембранних структур. Зокрема, сахароза може замінювати воду в структурі фосфоліпідів за стресів, які спричиняють зневоднення клітин [14].

Оскільки, у трансформованих рослин головну захисну роль на початку стресової дії водного дефіциту міг виконувати пролін, то можна припустити, що зменшення кількості цукрів пов'язане з їх запуском у проходженні звичайних метаболічних процесів. Вміст сахарози в листках визначається динамічною рівновагою її синтезу й гідролізу. Індукована стресами зміна кількості сахарози може бути пов'язана з регуляцією активності ферментів, які синтезують і залучають цей дисахарид у метаболізм. У підтримці процесів, що генеруються сахарозою задіяні моносахариди, тому при формуванні реакції на стрес розглядається взаємозв'язок цих вуглеводів та пов'язаних змін у балансі співвідношення сахароза / моносахариди.

Порівнюючи показники вмісту вільного проліну та вуглеводів у варіантів пшениці встановлено, що із тривалістю дії водного дефіциту рівень Pго зростає як у контрольних, так і біотехнологічних рослин. Причому, тенденція більшої акумуляції проліну в генетично-модифікованих рослин зберігалась протягом всього періоду культивування. Це дає підстави говорити, що збільшення Pго у генетично-модифікованих рослин відбувається не тільки за рахунок його синтезу, а й за рахунок часткової супресії гена проліндегідрогенази (табл. 1). При цьому підвищений вміст проліну у трансгенних рослин на початку стресу та при дії водного дефіциту сприяв підтриманню співвідношення вуглеводів. Баланс сахароза / фруктоза у контрольних рослин істотно знижувався при зневодненні та нормалізувався при регідратації (рис. 2). У трансгенних рослин цей показник майже не змінювався протягом всього періоду культивування, що дає підстави розглядати у них співвідношення вуглеводів як ознаку пов'язану із посухостійкістю.

Таким чином, проведене порівняльне дослідження реакцій рослин пшениці на дію короткотривалого водного дефіциту показало, що реакції всіх генотипів можна вважати проявом активної адаптації до несприятливих умов. При цьому часткове інгібування експресії гена проліндегідрогенази здатне приводити до зниження активності ферменту, результатом чого є підвищення вмісту проліну, яке за стресових умов сприяє підтриманню балансу вуглеводів.

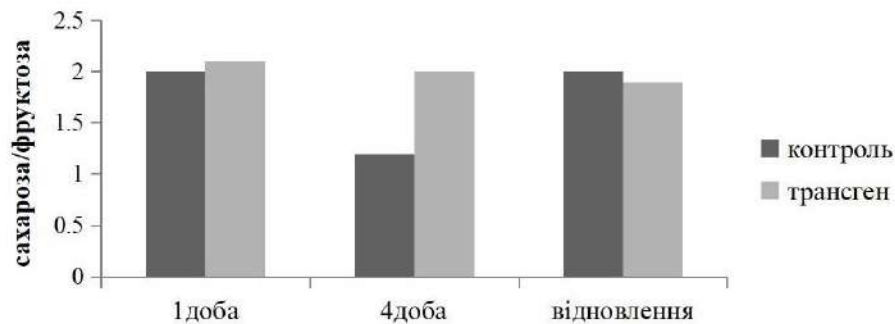


Рис. 2. Співвідношення сахароза / фруктоза в рослинах пшениці за умов нетривалого зневоднення / регідратації.

Висновки

Встановлено, що за умов осмотичного стресу у генетично модифікованих рослин пшениці з інтегрованими елементами, що утворюють дволанцюговий РНК супресор гена *pdh*, відбувається часткове пригнічення активності ферменту та збільшення вмісту вільного проліну. Відмічені зміни вуглеводного метаболізму за стресової дії водного дефіциту та в перші години після регідратації, при цьому співвідно-

шення сахароза / фруктоза у контрольних рослин істотно знижується при зневодненні та нормалізується при відновленні водопостачання. У генетично модифікованих рослин цей показник за короткотривалої стресової дії посухи майже не змінюється. Часткова супресія гена проліндегідрогенази обумовлює підвищення вмісту вільного проліну, який за умов водного дефіциту сприяє підтриманню балансу вуглеводів.

References

- Shrawat A. K., Armstrong C. L. Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2018. Vol. 37 (5). P. 335–421. doi: 10.1080/07352689/2018/1514718.
- Servet C., Ghelisi T., Richard L., Zilberstein A., Savoure A. Proline dehydrogenase: A key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Frontiers in Bioscience – Landmark*. 2012. Vol. 17 (2). P. 607–620. doi: 10.2741/3947.
- Hossain A., Skalicky M., Brestic M., Maitra S., Ashraful Alam M., Syed M.A., Hossain J., Sarkar S., Saha S., Bhadra P., Shankar T., Bhatt R., Kumar C. A., EL Sabagh A., Islam T. Consequences and mitigation strategies of abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) under the changing climate. *Agronomy*. 2021. Vol. 11 (2). P. 241. doi: 10.3390/agronomy11020241.
- Sarker U., Oba S. The response of salinity stress-induced A. tricolor to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Front Plant Sci*. 2020. Vol. 11. P. 1354. doi: 10.3389/fpls.2020.559876.
- Kolupaev Yu. E., Vainer A. A., Yastreb T. O. Proline: physiological functions and regulation of the content in plants under stress conditions Newsletter. *Kharkiv. nat. agrarian. un-tu. Ser. Biol*. 2014. Vol. 2. P. 6–22. [in Russian]
- Carvalho K., Campos M. K., Domingues D. S. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo*. *Molecular Biology Reports*. 2013. Vol. 40. P. 3269–3279. doi: 10.1007/s11033-012-2402-5.
- Major P. S., Zakharova V. P., Velikozhon L. G. Investigatio de cumulatione proline et saccharo in siligineis genotypes differentibus in gradu resistantiae pruinae. *Res gestae et quaestiones geneticae, generandi et biotechnologiae*. 2007. Vol. 1. P. 121–128. [in Ukrainian]
- Komisarenko A. G., Mykhalskaya S. I., Kurchiy V. M. Investigation of transgene functionality in T2 biotechnological plants of winter wheat on the basis of osmostability. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2021. Vol. 28. P. 88–93. doi: 10.7124/FEEO.v28.1381. [in Ukrainian]
- Andriushchenko V. K., Sayanova V. V., Zhuchenko A. A., Diyachenko N. I., Chilikina L. A., Drozdov V. V., Korochkina S. K., Cherep G. I., Medvedev V. V., Niutin Yu. I. The modification of proline estimation method for detection drought tolerant forms of genus *Lycopersicon Tourn*. *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR*. 1981. Vol. 4. P. 55–60. [in Russian]
- Mattioni C., Lacerenza N. G., Troccoli A., de Leonardis A. M., di Fonzo N. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant*. 1997. Vol. 101. P. 787–792. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01064.x.
- Sakalo V. D., Larchenko K. A., Kurchii V. M. Synthesis and metabolism of sucrose in leaves of corn seedlings under conditions of water deficit. *Physiology and biochemistry cult. plants*. 2009. Vol. 41 (4). P. 305–313. [in Ukrainian]
- Kolupaev Yu. E., Karpets Yu. V. Formation of adaptive reactions of plants to the action of abiotic stressors. Kiev : Basis, 2010. 352 s.
- Sergeeva L. E., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G. Modern biotechnologies for increasing plant resistance to osmotic stresses. Kyiv : Kondor, 2019. 160 s. [in Russian]
- Proels R. K., Hückelhoven R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Mol. Plant Pathol*. 2014. Vol. 15 (8). P. 858–864. doi: 10.1111/mp.12139.

MYKHALSKA S. I., KOMISARENKO A. G., KURCHII V. M., BRONNIKOVA L. I.

*Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17*

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF GENETICALLY MODIFIED WINTER WHEAT

Aim. Analysis of physiological and biochemical characteristics of genetically modified wheat with partially suppressed activity of the proline dehydrogenase gene. **Methods.** Determination of proline dehydrogenase (PDH) activity, free L-proline (Pro); carbohydrate content (sucrose and fructose). **Results.** It was established that under conditions of water deficit in genetically modified wheat plants with integrated elements forming the double-stranded RNA suppressor of the pdh gene, there is a partial inhibition of the enzyme activity and an increase in the content of free proline. Changes in carbohydrate metabolism under water deficit stress and in the first hours after rehydration were noted, while the sucrose / fructose ratio in control plants significantly decreases during dehydration and normalizes when water supply is restored, in genetically modified plants this indicator almost does not change under short-term water deficit stress. **Conclusions.** Partial suppression of the proline dehydrogenase gene leads to an increase in the free proline content, the fluctuations of which contribute to the maintenance of carbohydrate balance.

Keywords: *Triticum aestivum* L., proline, proline dehydrogenase, carbohydrates, sucrose, fructose.