

КОМІСАРЕНКО А. Г.✉, МИХАЛЬСЬКИЙ Л. О.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0003-2081-4055, 0000-0001-8835-0862

✉ allakomisarenko2017@gmail.com, (066) 237-43-16

ДОСЛІДЖЕННЯ СОЛЕСТІЙКОСТІ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ З ДОДАТКОВОЮ КОПІЄЮ ГЕНА ОРНІТИН- δ -АМІНОТРАНСФЕРАЗИ

Мета. Дослідити рівень стійкості до сольового стресу рослин насінневого покоління Т3 і Т4 генетично модифікованої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази (*oat*) та їх вихідних генотипів. **Методи.** Визначення вмісту вільного L-проліну (Pro) та фізіологічних і морфометричних параметрів. **Результати.** Досліджено рівень Pro та проаналізовані морфометричні й ростові параметри нащадків трансгенних рослин і їх вихідних форм за умов норми / стресу. **Висновки.** Т3 і Т4 рослини пшениці в умовах засолення мали вищий відсоток і більшу швидкість проростання насіння, порівнюючи з вихідними генотипами. При культивуванні *in vitro* проростків стресовий стан спостерігався за дози 250 і 300 мМ NaCl, за якого процент виживання трансгенних варіантів складав 83,3, нетрансгенних лише 33,3. В умовах сольового стресу *in vivo* Т3 і Т4 рослини мали вищі пагони та довші корені, порівнюючи з вихідними формами. Рівень виживання генетично модифікованих рослин становив ~ 90 %, нетрансгенних близько 60 %. Істотної різниці в акумуляції вільного L-проліну між досліджуваними варіантами рослин не спостерігалось. Він підвищувався у трансгенних проростках на 21 добу стресового стану в умовах штучно модельованого засолення.

Ключові слова: озима пшениця, трансгенні рослини, орнітин- δ -амінотрансфераза, засолення, пролін, солестійкість.

Збільшення чисельності населення планети є серйозним викликом для сталого соціального розвитку, який потребує постійного нарощування виробництва сільськогосподарських рослин. Серед зернових культур пшениця (*Triticum aestivum* L.) посідає друге місце за загальним світовим виробництвом, але на її продуктивність сильно впливають абіотичні стреси, включаючи посуху, засолення і спеку. Абіотичний стрес, спричинений перемінами клімату, приводить до змін на фізіологічному та молекулярно-

му рівнях, які впливають на розвиток і ріст рослин, що відображається на врожайності та втрахах виробництва [1, 2].

Останнім часом стрімкими темпами для сільського господарства зростає загроза підвищеної засоленості. Причинами сольового стресу є зниження водного потенціалу в клітинах уражених рослин і надлишок іонів натрію, що негативно впливають на ключові шляхи проходження біохімічних процесів. Багато досліджень були присвячені молекулярним підходам для отримання культур із підвищеною стійкістю до засолення. На підставі зібраних даних експериментальних спостережень і теоретичних міркувань було висловлено припущення, що механізм, який може лежати в основі толерантності рослин до сольового стресу, полягає у тому, що відбувається накопичення сумісних, низькомолекулярних осмолітів, таких як поліоли / цукри, певні амінокислоти та онієві сполуки [3–5].

Рослини можуть відчувати стрес і розвивати надзвичайні механізми підтримання клітинного гомеостазу, запускаючи належні реакції, пов'язані з ростом, розвитком і метаболізмом. Як основна стратегія захисту і виживання рослин в умовах абіотичного стресу часто розглядається метаболічна акліматизація через накопичення проліну. Сучасні та потужні інструменти метаболічного профілювання можуть бути корисними у розумінні регуляції Pro опосередкованої та пролін залежної сигналізації в рослинах. Численні дослідження пов'язані з накопиченням Pro у рослинах з метою підвищення солестійкості, а також толерантності до відсутності води, високої та низької температури, токсичних важких металів, інфекційних патогенів, анаеробних умов, нестачі поживних речовин, забруднення атмосфери [6, 7].

Для зниження шкідливого впливу засолення на врожайність рослин існує потреба у солевитривалих сортах. На сьогодні розроблені різні методи трансформації, які дозволяють передавати гени від широкого спектра організмів

© КОМІСАРЕНКО А. Г., МИХАЛЬСЬКИЙ Л. О.

злаковим культурам, що здатні збільшити синтез окремих речовин. Зміни в метаболізмі трансгенних рослин дозволяють їм краще пристосовуватись до стресових умов [6, 8, 9].

Так, концентрацію проліну в рослинній клітині можна підвищити збільшенням продукції Pro та / або зниженням його руйнування. Існують два шляхи, згідно з якими утворюється пролін у рослинній клітині – глутаматний та орнітиновий. Було висловлено припущення, що в молодих рослинах *Arabidopsis thaliana* Pro утворюється з глутамату або орнітину у той час, як у зрілих рослинах, або за впливу стресу, глутаматний шлях, як правило, домінує. На сьогодні відомо, що біосинтез проліну за стресових умов відбувається з орнітину через фермент орнітин- δ -амінотрансферази (δ -OAT), який функціонує в мітохондріях [10, 11]. Орнітин вважають попередником таких осмолітів як поліаміни, які необхідні для регуляції росту й розвитку рослин [12]. Він також є важливим для реалізації оптимального засвоєння вуглецю й азоту, що сприяє збільшенню продукування біомаси та стійкості рослин до абіотичних стресів [13]. Зокрема, взаємодія генів *oat*, виявлених у ліній гексаплоїдної пшениці, з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу Pro та катаболізмом аргініну, підтверджує, що вони залучені до синтезу проліну та ремобілізації азоту [14].

Спочатку вважалося, що орнітинамінотрансфераза бере участь в акумуляції Pro при стресі [10]. Так, у *Brassica juncea* із наростанням концентрації солі в середовищі підвищувалися як активність OAT, так і вміст вільного L-проліну [15]. Однак введення екзогенного гена *oat* у геном пшениці розпочалося нещодавно і дослідження з цього питання поодинокі [6, 14].

Тому, метою роботи був порівняльний аналіз рівня стійкості до сольового стресу рослин насінневого покоління T3 і T4 генетично зміненої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази та їх вихідних генотипів.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували нетрансформовані рослини озимої пшениці генотипів УК 106/19 і УК 95/17 та насінневі покоління T3 і T4 генетично модифікованих рослин з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази *Medicago truncatula*, отримані в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформції *in planta*.

Для оцінки рівня стійкості нащадків трансгенних рослин пшениці як різновидність абіотичного стресу нами було обрано засолення (висока концентрація солі в середовищі для пророщування насіння, культивування проростків та вирощування рослин у ґрунті за умов зрошення розчином NaCl).

З метою визначення стійкості до засолення хлоридом натрію T3 і T4 генетично змінених рослин пшениці нами було попередньо проаналізовано ефективність доз для виживання контрольних рослин (вихідних генотипів) отриманих шляхом пророщування зрілих зерен на поживних середовищах, що містять NaCl. Для цього використовували різні концентрації хлориду натрію: 200 мМ, 250 мМ та 300 мМ. Як контроль слугувало середовище, яке не містило NaCl.

У подальшому аналізували ріст і розвиток проростків трансгенної й нетрансгенної пшениці та відсоток їх виживання шляхом культивування зрілих зерен в умовах штучно модельованого засолення впродовж трьох тижнів. Для уникнення нерівномірного проростання, зернівки попередньо вирощували в стерильних умовах до розміру проростка 1 см (тривалість 4 доби) і надалі висаджували на поживні середовища, які містили різні концентрації хлориду натрію. За таких умов рослини культивували 21 добу. Після цього проводили виміри довжини пагона та вираховували процент виживання проростків. Крім того, на початковому етапі вирощування (до стресу) і після закінчення стресу в генетично змінених і контрольних проростках визначали вміст вільного L-проліну за методикою Чинард, яка ґрунтується на утворенні забарвленого продукту взаємодії Pro з нінгідриним реактивом, з модифікаціями [5]. Рівень L-проліну визначали в середньому із шести проростків кожного досліджуваного варіанту.

Для вимірювання фізіологічних параметрів пов'язаних із сольовим стресом, рослини пшениці (трансгенні й вихідні форми) вирощували в пластиковий горщикках (розміром 10 см \times 10 см \times 10 см), які містять природний польовий ґрунт і культивували в закритому приміщенні за регульованих умов: впродовж 16 годин світло і 8 годин темрява за 18°C. На етапі формування 3 листків $\frac{1}{2}$ досліджуваних рослин зрошували 300 мМ розчином NaCl і подібним чином поливали один раз на шість діб до появи явних симптомів стресу. Іншу половину рослин продовжували культивувати за нормальних

умов гідратації. До і після зрошення NaCl впродовж 30 днів (загалом п'ять зрошень) визначали вміст вільного L-проліну за методикою вказаною вище. Потім відновлювали нормальні умови зрошення водою впродовж додаткових 30 днів (загалом п'ять зрошень) і визначали відсоток виживання тестованих варіантів. Одночасно проводили виміри морфометричних параметрів (висоти пагонів і довжини коренів).

Результати та обговорення

Було досліджено вплив сольового стресу на проростання зерна контрольних і трансгенних рослин двох генотипів у поколіннях T3 та T4. Суттєва різниця між аналізованими варіантами спостерігалась вже за дози 250 мМ NaCl. Хоча всі застосовані нами концентрації стресового чинника не були летальними.

Так, після культивування на середовищі з NaCl концентрацією 250 мМ впродовж 5 та 10 діб швидкість і відсоток проростання насіння трансгенних форм пшениці із додатковою копією гена орнітин-δ-амінотрансферази *Medicago truncatula* були значно вищими, ніж у рослин вихідного генотипу (рис. 1, 2).

Також нами було проаналізовано вплив різних доз NaCl (200 – 250 – 300 мМ) на розвиток і виживання проростків при культивуванні зрілих зерен вихідних і трансгенних форм пше-

ниці на поживних середовищах, що моделюють умови засолення впродовж трьох тижнів.

Слід відмітити, що менш токсичною концентрацією стресового чинника була доза хлориду натрію 200 мМ. Із підвищенням її до 250 мМ спостерігалось гальмування в розвитку проростків всіх досліджуваних варіантів. Однак вихідні генотипи більше відставали в рості, про що свідчать розміри проростків (рис. 3).

Більш виражений негативний ефект спостерігався за концентрації хлориду натрію 300 мМ. По закінченню терміну культивування на середовищі, що містило найвищу дозу стресового чинника процент виживання генетично модифікованих проростків складав 83,3 %, тоді як нетрансгенних лише 33,3 %. Проведені нами виміри довжини пагона показали суттєві переваги за їх розміром на користь трансгенних нащадків (рис. 4).

Щодо аналізу рівня вільного L-проліну, то за нормальних умов вирощування не було суттєвої різниці в його вмісті між трансгенними нащадками та їх вихідними генотипами. Рівень Pro поступово підвищувався з тривалістю сольового стресу в усіх досліджуваних типів рослин. Незначна відмінність в акумуляції проліну спостерігалась між T3 і T4 трансгенними формами, більш суттєва між ними та їх вихідними генотипами після кінця періоду сольового стресу (рис. 5).

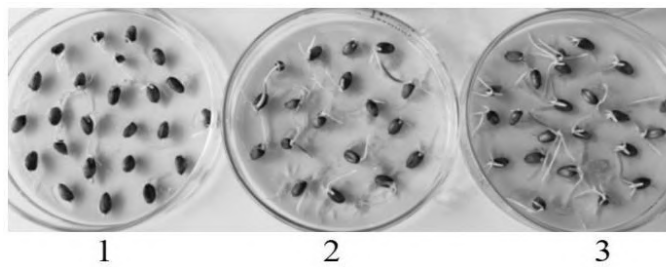


Рис. 1. Проростання зерна у вихідного генотипу – 1 та T3 – 2 і T4 – 3 генетично зміненої пшениці в умовах сольового стресу (5 діб).

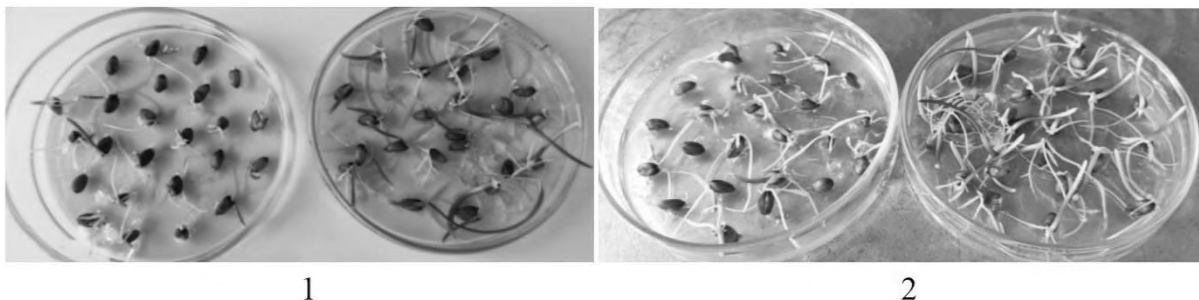


Рис. 2. Проростання зерна у вихідного генотипу (зліва) і T3 трансгенної пшениці (справа) – 1 та вихідної (зліва) і T4 генетично зміненої форми пшениці (справа) – 2 в умовах засолення (10 діб).

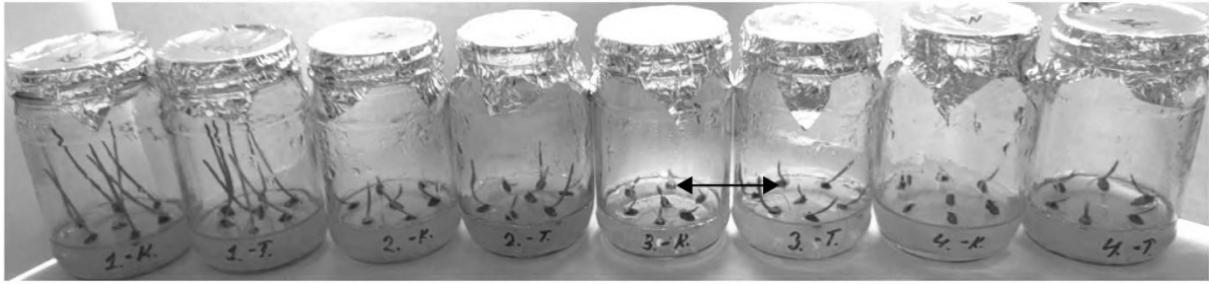


Рис. 3. Культивування проростків вихідного генотипу (К) і трансгенної пшениці (Т) за різних доз засолення хлоридом натрію (10 діб): 1 – поживне середовище без NaCl; 2–4 – поживні середовища з додаванням 200 – 250 – 300 мМ NaCl відповідно.

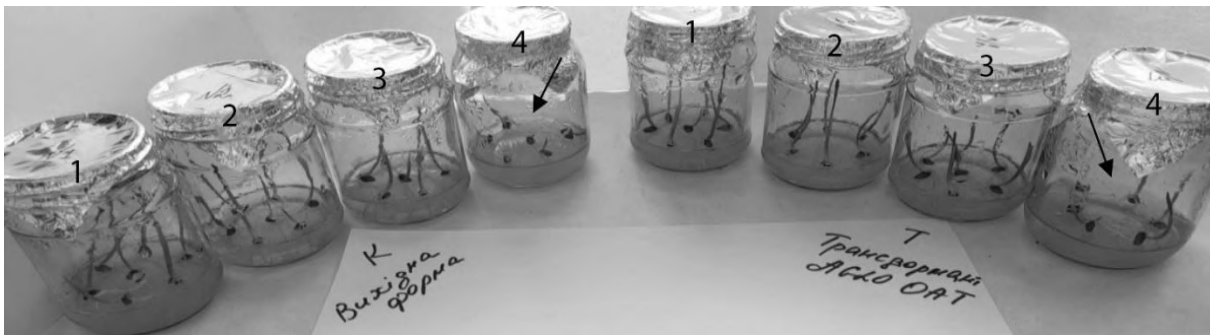


Рис. 4. Культивування проростків вихідного генотипу і трансгенної пшениці за різних доз засолення хлоридом натрію: 1 – поживне середовище без NaCl; 2–4 – поживні середовища з додаванням 200 – 250 – 300 мМ NaCl відповідно.

Це може свідчити на користь того, що в трансгенних проростках пшениці культивованих у контрольованих умовах *in vitro*, за стресового стану, спричиненого сольовим навантаженням токсичної дії, відбувається додаткове накопичення Prо в результаті експресії чужорідного гена *oat*.

У подальшому визначали чи впливає введення копії гена *oat* на розвиток Т3 і Т4 рослин пшениці в умовах засолення ґрунту при вирощуванні *in vivo*. Таке поєднання методів передбачає об'єктивність оцінки стійкості, оскільки можна дослідити вплив стресового навантаження на різних етапах вегетації рослин. Для цього досліджувані рослини (вихідні та трансгенні форми) на стадії трьох листків зрошували 300 мМ розчином NaCl. Тривалість зрошення становила 30 днів (загалом п'ять зрошень через кожні 6 діб).

Переважає більшість генетично модифікованих рослин росли нормально, тоді як вихідні генотипи частково демонстрували в'янення, що негативно впливало на проходження фізіологічних процесів, які своєю чергою гальмували ростові параметри. Крім того, ж сольовий стрес приводив до зниження швидкості росту коренів,

оскільки останні виконують бар'єрну роль і лімітують надходження іонів Na^+ і Cl^- [3]. Довжина коренів була меншою за культивування рослин у присутності NaCl. Однак Т3 і Т4 нащадки трансгенної пшениці обох генотипів мали більші й довші корені та пагони, порівнюючи з вихідними формами (рис. 6).

Після відновлення поливу водою впродовж додаткових 20 днів рівень виживання двох трансгенних генотипів становив 84–87,3 %, тоді як нетрансгенних близько 60 %. Ці результати свідчать про те, що експресія інтродукованого гена *oat* підвищує стійкість пшениці до засолення. Хоча різниця в акумуляції вільного L-проліну між досліджуваними варіантами рослин як під час нормального вирощування, так і після завершення стресового періоду та навіть після регідратації не була вірогідною. Ймовірно для дорослих рослин вирощених в умовах *in vivo* використана концентрація NaCl для зрошення була менш токсичною, порівнюючи з культивуванням *in vitro*. Хоча негативні наслідки стресового чинника демонструють проаналізовані нами морфометричні показники, за якими трансгенні рослини випереджали нетрансгенні форми.

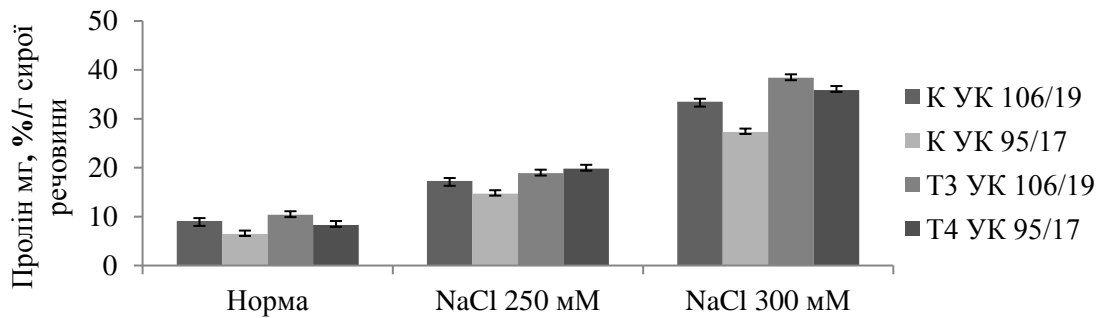


Рис. 5. Вміст вільного L-проліну в контрольних – К (вихідна форма) та в трансгенних – Т3 і Т4 проростках пшениці в умовах нормального вирощування та за дії сольового стресу (21 день).

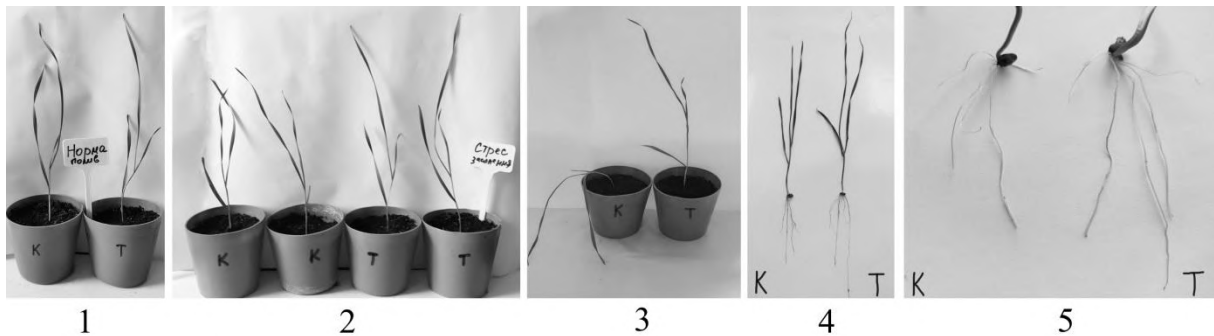


Рис. 6. Морфометричні параметри рослин пшениці вихідної форми (К-зліва) і трансформантів (Т-справа): 1 – висота рослин в умовах поливу водою; 2 – висота рослин за умов зрошення NaCl; 3 – часткове в'янення рослин за дії стресу; 4–5 –довжина коренів в умовах засолення.

Отже, введення додаткової копії гена *oat* підвищує толерантність пшениці до засолення через біосинтез проліну в умовах токсичної дії стресового фактору. При цьому застосування комбінації методів тестування є необхідним підходом, який дає можливість визначити рівень стійкості досліджуваних рослин на різних етапах вирощування, за відмінних доз стресового чинника і тривалості його дії і виявити переваги нової форми над вихідною.

Висновки

Отже, культивування вихідних форм і нащадків трансгенних рослин пшениці озимої за умов засолення дозволило проаналізувати рівень їх чутливості до перенесеного стресу, пов'язати його зі змінами вмісту вільного L-проліну, фізіологічного стану, морфометричних параметрів.

Враховуючи важливу роль гена орнітин-δ-амінотрансферази в стійкості до багатьох абіотичних стресів у рослин, отримані результати можуть бути корисними в подальшому при створенні нових форм пшениці з підвищеною толерантністю до інших екологічних стресів.

References

1. Raza A., Razaq A., Mehmood S. S., Zou X., Zhang X., Lv Y., Xu J. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*. 2019. Vol. 8. P. 34. doi: 10.3390/plants8020034.
2. Morgun V. V., Dubrovna O. V., Morgun B. V. Modern biotechnologies for stress-resistant wheat plants. *Plant physiology and genetics*. 2016. Vol. 48 (3). P. 196–213. doi: 10.15407/frg2016.03.196. [in Ukrainian]
3. Joshi R., Anwar K., Das P., Sneh L. S.-P., Pareek A. Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. In *Wheat Biotechnology; Springer: New York, NY, USA*. 2017. 1679. P. 83–95. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_5.
4. Hossain A., Skalicky M., Brestic M., Maitra S., Ashrafal 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.
5. 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]

6. Dubrovna O. V., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G. Using proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology and Genetics*. 2022. Vol. 56 (4). P. 361–378. doi: 10.3103/S009545272204003X.
7. 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. 2 (32). P. 6–22. Retrieved from: <https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/9047>. [in Russian]
8. Anwar A., Wang K., Wang J. Expression of Arabidopsis ornithine aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Rep.* 2021. Vol. 40 (7). P. 1155–1170. doi: 10.1007/s00299-021-02699-0.
9. Morgun B. V., Tishchenko E. N. Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv : Logos, 2014. 219 s. [in Russian]
10. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine–aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002. Vol. 9 (2). P. 73–80. doi: 10.1023/A:1026791932238.
11. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *Int J Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 3681. doi: 10.3390/ijms19113681.
12. Martin-Tanguy J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* 2001. Vol. 34 (1). P. 135–148. doi: 10.1023/A:1013343106574.
13. Liu C., Xue Z., Tang D., Shen Y., Shi W., Ren L., Du G., Li Y., Cheng Z. Ornithine δ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant J.* 2018. Vol. 96. P. 842–854. doi: 10.1111/tpj.14072.
14. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine amino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biol.* 2020. Vol. 20. P. 187–187. doi: 10.1186/s12870-020-02396-2.
15. Madan S., Nainawatee H. S., Jain R. K., Chowdhury J. B. Proline and proline metabolizing enzymes in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annals of Botany.* 1995. Vol. 76 (1). P. 51–57. doi: 10.1006/anbo.1995.1077.

KOMISARENKO A. G., MYKHALSKYI L. O.

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

RESEARCH OF SALT TOLERANCE OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT PLANTS WITH AN ADDITIONAL COPY OF THE ORNITHINE- δ -AMINOTRANSFERASE GENE

Aim. To investigate the level of resistance to salt stress of T3 and T4 seed generation plants of genetically modified wheat (*Triticum aestivum* L.) with an additional copy of the ornithine- δ -aminotransferase (*oat*) gene and their original genotypes. **Methods.** Determination of the content of free L-proline (Pro) and physiological and morphometric parameters. **Results.** The level of Pro was studied and the morphometric and growth parameters of the offspring of transgenic plants and their original forms under normal / stress conditions were analyzed. **Conclusions.** T3 and T4 wheat plants under salinity conditions had a higher percentage and higher rate of seed germination compared to the original genotypes. During *in vitro* cultivation of seedlings, a stress state was observed at doses of 250 and 300 mM NaCl, at which the percentage of survival of transgenic variants was 83.3, non-transgenic only 33.3. Under conditions of *in vivo* salt stress, T3 and T4 plants had taller shoots and longer roots compared to the original forms. The survival rate of genetically modified plants was ~ 90 %, non-transgenic plants about 60 %. There was no significant difference in the accumulation of free L-proline between the investigated plant variants. It increased in transgenic seedlings on the 21st day of stress under conditions of artificially simulated salinity.

Keywords: winter wheat, transgenic plants, ornithine- δ -aminotransferase, salinity, proline, salt tolerance.