



Розділ I. Ботаніка

УДК 581.1:58.02

DOI: <https://doi.org/10.29038/2617-4723-2022-2-1>

Органо-залежний розподіл вільного проліну в рослинах генотипів пшениці озимої на початкових етапах осмотичного стресу

Лариса Броннікова

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, м. Київ

Адреса для листування: Zlenko_lora@ukr.net

Отримано: 03.08.22; прийнято до друку: 15.10.22; опубліковано: 30.12.22

Резюме Діяльність науковців цілеспрямована на постійний пошук та впровадження/привнесення в культуру генетичних часток або інших видів рослин. Використання **інтродукції** збагачує різноманіття вихідного матеріалу пшениці озимої. Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* отримано рослини пшениці озимої. Метою досліджень було вивчення розподілу вільного *L-pro* у вегетативних частинах нащадків T2-генотипів УК 95/17 і УК 322/17 з інтродукованою конструкцією рослин пшениці озимої. 10-ти добові проростки впродовж 3 годин піддавали модельованим осмотичним стресам додаванням маніту (0,8М) та солей морської води (25,0г/л). Вимірювали вміст вільного *L-проліну* в надземній і кореневій частинах за нормальних умов і при стресі. Відмічено органо-залежні зміни в стабілізації/зростання вмісту вільного *L-проліну* лінії УК 95/17, тоді як у лінії УК 322/17 характерно – стабілізація/зниження. Прямої ролі трансгена не спостерігали.

Ключові слова: пшениця озима, осмотичний стрес, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, T2-нащадки, пролін

Free proline organ-depented distribution in winter wheat plants during early osmotic stresses

Larysa Bronnikova

Institute of Plant Physiology and Genetics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, Kyiv

Correspondence: Zlenko_lora@ukr.net

Abstract. Winter wheat is crop cultivar of special importance in Ukraine. Traditional breeding efforts are not enough for providing agriculture with better forms. Various cereal biotechnological approaches are actively elaborated and widely extended. The *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* method is among them. This approach was used for obtaining winter wheat forms with higher level of free proline. It is known that the level of *L-proline* is regulated by cooperation of own systems of synthesis/degradation. Δ -1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (*ProDH*) is the enzyme of proline degradation. Transgenic plants of two genotypes UK 95/17 and UK 322/17 of winter wheat and their T1, T2 progeny with introduction of double-stranded RNA-suppressor of *ProDH* gene were obtained. 10 day T2-plants were exposed to 3 hours simulating osmotic stresses. Stress conditions were created by the addition of mannitol (0,8M) or sea water salts (25,0g/l). The levels of *L-proline* were measured separately in shoots and roots. There were genotype and organ-dependent differences between UK 95/17-T2 and UK 322/17-T2 forms. Under stress pressure levels of *L-proline* in UK 95/17-T2 line demonstrated the features of stabilization/increase, at the same time the levels of *L-proline* in UK 322.17-T2 showed the trends of stabilization/decrease. The obvious influence of transgene was not observe.

Key words: winter wheat, osmotic stress, *Agrobacterium*-mediated transformation, T2-progeny, proline

ВСТУП

Постановка проблеми. Для нашої держави пшениця озима відіграє провідну роль у підтриманні продовольчої безпеки. Вона виступає стратегічним джерелом харчування людей і худоби, є сировиною для низки галузей промисловості.

В Україні постійно оновлюється сортимент культури, створюються нові сорти, що адаптовані до мінливих погодно-кліматичних чинників конкретного регіону. Тому діяльність науковців цілеспрямована на постійний пошук та впровадження/привнесення в культуру генетичних часток або інших видів рослин. Використання інтродукції з різностороннім вивченням креативних форм та їх нащадків збагачує різноманіття вихідного матеріалу пшениці озимої.

Одним із залучених методів генетичного поліпшення пшениці є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. Отриманні лінії пшениці із стабільною експресією цільових генів та збереженням цієї ознаки у насінневих поколіннях [5-9].

У отриманих форм рослин увагу привертають гени системи метаболізму проліну, що дозволить підвищити рівень стійкості до осмотичних стресів.

Вільний *L*-пролін (*pro*) є визнаним сумісним осмолітом, який може акумулюватись у рослинах у значних кількостях, не здійснюючи шкодочинної дії на компартменти клітин. Властивості даної сполуки всебічно досліджуються [10-12]. Встановлена поліфункціональність *L-pro* підкреслює його внесок у комплексну стрес-стійкість рослини. У загальному випадку рівень вільного *L-pro* саморегулюється експресією/репресією генів ферментів його синтезу/деградації/транспорту [10, 13].

Рівень вільного *L-pro* є істотно динамічним параметром, особливо за нормальних умов. За дії стресових чинників флуктуації амінокислоти також відбуваються, однак вони не здійснюють вирішального впливу на загальний тренд акумуляції. В той же час за стресових умов суттєву роль у підтриманні життєдіяльності є перерозподіл осмоліту між органами. У випадку трансгенезу, пов'язаного із метаболізмом проліну, визначення вмісту цієї амінокислоти може показати на причини її походження. Присутність трансгену, сама по собі, не доводить його активності в геномі реципієнта. З іншого боку функціональність інтродукованої конструкції можливо аналізувати, відслідковуючи накопичення продукту – похідного цільового гена [14, 15].

За останній час все більше уваги приділяють проліндегідрогеназі (ПДГ), не тільки як ферменту який регулює рівень вільного проліну але як сполуці, котра бере участь у підтримці клітинного поділу та розвитку генеративних органів [13, 14, 15].

Метою даної роботи було вивчення розподілу вільного *L-pro* у вегетативних частинах Т2- рослин генотипів пшениці озимої.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом слугували рослини пшениці озимої, що отримані в результаті *Agrobacterium*-

опосередкованої трансформації *in planta*, трансгенний статус яких підтверджено в результаті молекулярно-генетичного аналізу [6, 29, 30]. У трансформації було використано штам *A. tumefaciens* LVA4404, що містив у складі плазмиду pVi2E із цільовим геном – дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису. Конструкція створена в Інституті цитології та генетики СВ РАН, Новосибірськ [16].

Рослини піддавали дії осмотичних стресів, а також досліджували вміст вільного проліну у вегетативних органах. У подальшому було отримано насіннєві покоління Т1, Т2 [27, 28].

Об'єктом дослідження були 10-ти добові проростки Т2-покоління (УК 95/17-Т2, УК 322/17-Т2) генотипів пшениці озимої. Вихідні лінії УК 95/17 і УК 322/17 одержані в Інституті фізіології рослини і генетики НАН України. Зернівки Т2-покоління та контролю, обрані для експерименту, являли собою групи насіння, довільно виділені із сукупного загального урожаю одного року.

Зрілі зернівки пророщували впродовж 10-ти діб на напіврозведеному розчині макроелементів за Мурашиге-Скугом. Заміна живильного розчину здійснювалась кожні дві доби. На 10-ту добу проростки переміщували у модельовані стресові умови на три години.

Осмотичний стрес створювали додаванням до вказаного живильного розчину маніту або солей морської води. Маніт, концентрація 0,8М, моделював водний стрес; солі морської води (морська сіль), концентрація 25,0 г/л модель природного комплексного засолення.

Вміст вільного *L-pro* визначали окремо в надземній (проросток) та кореневій частинах на 10-ту добу вирощування за стандартною методикою [18]. За контрольні показники вважали параметри, виміряні за звичайних умов; «стресові» показники вимірювали через три години від початку впливу водного або сольового стресів. Експеримент здійснювали у триразовій біологічній повторності. Дані статистично оброблені.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

В результаті пророщування зрілих зернівок на 10-ту добу утворились молоді проростки зі сформованими вегетативними органами. Зовнішній вигляд проростків був аналогічним у всіх варіантів, що може свідчити на користь відсутності переваг у схожості у Т2-рослин перед вихідними формами за звичайних умов. Про такі фізіологічні характеристики генетично-модифікованих рослин повідомлялося [19, 20]. Тому, на нашу думку, параметри метричного оцінювання зовнішніх морфологічних структур за н.у. не можуть бути достовірними показниками впливу інтродукованого трансгену.

За звичайних умов у 10-ти добових проростків пшениці озимої вимірювали вміст вільного *L-pro* окремо в надземній частині та корінні (таблиця 1).

Таблиця 1

Вміст вільного проліну (мг% / сир. речовину) у вегетативних органах 10-ти добових проростків пшениці озимої за нормальних умов

Генотип	Корінь	Надземна частина
УК 95/17	12,31 ± 5,90	8,90 ± 0,58
УК 95/17-T2	14,87 ± 2,11	12,51 ± 1,40
УК 322/17	13,82 ± 4,80	5,83 ± 0,12
УК 322/17-T2	16,51 ± 2,44	17,05 ± 1,02

У вихідних форм 95/17 та 322/17 переважна більшість амінокислоти знаходилась у корінні. З великою імовірністю можна передбачити, що причиною цього була диференційна експресія генів у вегетативних органах. Не варто, на нашу думку, причиною цього явища вважати факт перерозподілу вільного *L-pro*, оскільки підтримувались н.у. культивування. За абсолютною величиною вміст вільного *L-pro* у кореневих частинах усіх генотипів був тотожним, що також може вказувати на нормальний (аналогічний) перебіг метаболізму.

В той же час за звичайних у T2-форм органозалежної акумуляції проліну не спостерігали.

Оскільки дане явище було властиве обом генотипам, можна вважати його особливістю, набутою в результаті генетичної трансформації. На користь цього припущення можуть також вказувати умови культивування.

В той же час даний факт не може беззаперечно свідчити про пряму взаємодію застосованого трансгена з ендогенними генами. Швидше ми маємо справу із ланкою задіяних у експресії генів транскрипційних факторів. Про неспецифічність такої відповіді вказано Б. Моргуном і О. Тищенко, 2014 [21].

Таким чином можна зробити висновок про те, що за звичайних умов у 10-ти добових рослин пшениці озимої (T2 і вихідні форми) уже проявляється різниця за характером розподілу вільного *L-pro* у вегетативних органах. В той же час відмінності між масивами УК 95/17–УК 322/17 і УК 95/17-T2–УК 322/17-T2 не відмічені.

Молоді проростки генотипів пшениці озимої піддавали дії жорсткого осмотичного стресу (маніт, солі морської води) впродовж трьох годин, після чого аналізували рівень вільного *L-pro* у надземній та кореневій частинах (таблиця 2).

За стресових умов відмічали більший спектр генотипових особливостей. За абсолютною величиною рівень амінокислоти у форми УК 95/17 практично не відрізнявся від контрольних показників, а у форми УК 322/17 зміни проходили асинхронно у частинах рослин. В той же час у лінії УК 95/17 акумуляція вільного *L-pro* переважала в обох досліджуваних частинах рослин за умов стресового тиску маніту; в той же час у вихідної форми УК 322/17 більший рівень *L-pro* спостерігали при сольовому стресі (факторозалежність).

Таблиця 2

Вміст вільного проліну (мг% / сир. речовину) у вегетативних органах 10-ти добових проростків пшениці озимої за дії модельованих осмотичних стресів

Генотип	Корінь		Надземна частина	
	Маніт	Солі мор. води	Маніт	Солі мор. води
УК 95/17	13,81 ± 3,44	8,90 ± 1,11	12,71 ± 0,78	8,02 ± 0,20
УК 95/17-T2	18,37 ± 2,76	35,60 ± 3,48	17,25 ± 4,13	16,33 ± 3,15
УК 322/17	5,17 ± 1,09	21,95 ± 3,71	12,83 ± 3,36	18,82 ± 2,11
УК 322/17-T2	11,54 ± 2,36	16,54 ± 0,99	13,87 ± 2,85	16,31 ± 2,11

Такі події, на нашу думку, могли бути наслідком різної генотипової чутливості до стресора. В той же час в рослинах обох варіантів рівень вільного *L-pro* підтримувався за рахунок його синтезу.

У T2 рослин також було відмічено ряд розбіжностей із показниками норми. Так, у лінії УК 95/17-T2 рівень вільного *L-pro* коріннях зростав у значних кількостях під дією засолення; у надземній частині акумуляція амінокислоти була помірною, однаковою у присутності будь-якого стресора. В обох частинах рослин УК 322/17-T2 рівень амінокислоти був практично однаковий або трохи меншим від показників, виміряних за н.у. Загалом тренд процесу акумуляції вільного *L-pro* у лінії УК 95/17-T2 можна охарактеризувати як стабілізацію/зростання, тоді як у випадку лінії УК 322/17-T2 має місце

стабілізація/зниження. Таким чином стає зрозумілим факт генотипових відмінностей і в цьому випадку.

Оскільки T2 рослини обох генотипів були насінневим потомством трансформантів, отриманих в результаті інтродукції однієї конструкції, постає питання внеску трансгена у загальну роботу систем регуляції рівня вільного *L-pro*. Характер розподілу проліну в частинах T2-рослин може свідчити на користь відсутності активного втручання системи транспорту. На перший план виходить взаємодія систем синтезу/окиснення.

Встановленим фактом є подія підвищення синтезу амінокислоти за дії стресових чинників. При цьому даній події додатково сприяє зниження/припинення активності гену деградації [13, 14, 25]. Ця подія є генетично запрограмованою як для

звичайної рослини, так і для ГМ організмів. Тому, в нашому конкретному випадку неможливо незаперечно встановити внесок інтродукованої конструкції у пригнічення активності ПДГ. В той же час, з огляду на різний тренд акумуляції вільного *L-pro* у ліній УК 95/17-T2 і УК 322/17-T2 можливо припустити факт взаємодії трансгена з ендогенними генами, що впливатиме на життєздатність організму за стресових умов. Ймовірно, що при подовженні терміну стресової дії це явище може підвищувати стрес-стійкість ГМ рослин, оскільки відомо, ця характеристика є полігенною ознакою.

Таким чином, в результаті аналізу характеру акумуляції вільного *L-pro* в органах рослин

генотипів пшениці озимої можна зробити наступні висновки. По-перше, за нетривалої дії жорсткого осмотичного стресу уже проявляються характерні особливості конкретного генотипу. По-друге, зростання рівня вільного *L-pro* в тканинах відбувається за рахунок посилення його синтезу. По-третє, немає незаперечного доказу впливу інтродукованої конструкції на характер акумуляції вільного *L-pro*. По-четверте, для встановлення факту підвищення рівня стійкості до осмотичних стресів у генно-модифікованих рослин доцільно подовжити термін дії стресового навантаження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Терлецька Н.В., Хайленко Н.А., Исакова А.Б. Особенности реакции проростков аллоплазматических линий мягкой пшеницы на действие осмотического и солевого стресса. // Вестник СамГУ – Естественно-научная серия. – 2011. - №2 (83). – С.244-249.
2. Терлецька Н.В., Зобова В.Ю., Ступко А.Б. и др. Влияние абиотических стресс-факторов (засуха, засоление) на фотосинтез различных видов пшеницы *in vivo* и *in vitro*. Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты) // Материалы VII Международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада. – 2016. – С.292-293.
3. Широкова Н.П. Физиологические особенности устойчивости яровой пшеницы и роль фитогормонов в ее регуляции у сортов Росинка и Омская 23. // Автореф. дисс. ... к.б.н. Красноярск. – 2012. -18 с.
4. Смирнова І.В. Продуктивність сортів пшениці озимої залежно від фону живлення в умовах південного степу України // Автореф. дис. ... к.б.н. – 2021 – Николаїв. – 25 с.
5. Кулеш С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням дволанцюгового РНК-супресора гена проліндегідрогенази. // Автореф. дис. ... к.б.н. Київ, 2018. – 23 с.
6. Моргун Б.В. Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер допоміжної селекції. // Автореф. дис. ... д.б.н. Київ. -2021. – 54 с.
7. Habib I., Rauf M., Qureshi J. et al. Optimization of somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of elite wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars of Pakistan // Int. J. Agric. Biol. 2014. Vol.16, №6, P.1098-1104.
8. Binca A., Orczyc W., Nadolska-Orczyc A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*× Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes // J. Appl. Genetics. 2012, 53, P.1-8. DOI 10.1007/s13353-011-0064-y
9. Mitic N., Nicolic R., Ninkovic S. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Triticum aestivum* L. // Biol. Plantarum 2004. 48(2), P.179-184. doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033442.15611.7d
10. Szabados L., Savoure A. Trends in Plant Sci. // 2010. №15. P.89-97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
11. Сун С.К., Лей К.Р. Метаболизм пролина и перспективная устойчивость к засолению и тепловому стрессу у прорастающих семян пшеницы // Физ. растений. 2005. Т.52. №6. С.897-904.
12. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. // Вісн. Харк. Нац. Аграрного Університету. Серія: Біологія. – Вип.2(32), 2014, С.6-22.
13. 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. P.424-428.
14. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation // Planta. 2005. 222. P.70-79. DOI: 10.1007/s00425-005-1518-4
15. Kaur D., Grewal S.K., Kaur J., Singh S. Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. // Biol. Plant. (2017) 61(2). P.359–366. https://doi.org/10.1007/s10535-016-0695-2
16. Тумов С.Е. Получение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антимисловую супрессор гена пролиндегидрогеназы. // Автореф. дисс. ... к.б.н. Новосибирск, 2008. 18 с.
17. Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Комисаренко А.Г. Современные биотехнологии повышения устойчивости растений к осмотическим стрессам. Киев. Кондор. 2019. 160 с.
18. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourn* // Изв.АН Молдавской ССР 1981, №4 С.55-60.
19. Zheng X., Chen B., Lu G., Han B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance // Bioch. Bioph. Res. Comm. 2009. 2 N4. P.832-837. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.163
20. Nakashima K., Tran L.-S., Van Nguen et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice // Plant J. 2007. 51. P.617-630. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03168.x
21. Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. // Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. Киев. Логос. 2014. 221 с.
22. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. A novel subgroup of bZIP11 proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in Arabidopsis. Plant Cell Phys. 2004. 45, № 4, P. 309 – 317.
23. Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks V.V.W.B., Smeekens S. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of Asparagine synthetase1 and Proline dehydrogenase2. Plant J. 2008. 53, № 6, P. 935 – 949. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03385.x
24. 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. DOI: 10.1093/pcp/pch036
25. 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. P.1233-1241. DOI: 10.1104/pp.118.4.1233
26. Гершензон С.М. Основы современной генетики. Киев. Наук. думка. 1983. 560 с.
27. Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.Д. Дослідження функціональності трансгена в Т2 біотехнологічних рослинах озимої пшениці за ознакою осмотостійкості // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2021, Т.28. – С. 88-93 DOI: https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1381
28. Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М., Христан О.О. Генетичний та фізіологічний аналіз Т1 біотехнологічних рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2020. - Т.26. С.222-227 DOI: https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1270

29. Дубровна О.В., Кулеш С.С., Сливка Л.В. Оптимізація умов *Agrobacterium* - опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta* // Фізіологія рослин ш генетика. – 2019, Т.51, № 4. С.283 – 294, doi: <https://doi.org/10.15407/frg2019.04.283>
30. Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Курчій В.М., Тищенко О.М. Генетична трансформація *in planta* пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т.22. – С.293-298 DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.964>