

ГОНЧАРУК О.М.✉, ДУБРОВНА О.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net
✉ gan.eskander@gmail.com

АНАЛІЗ ОСМОСТІЙКОСТІ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН ОРНІТИНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ

Останнім часом у провідних біотехнологічних центрах світу інтенсивно ведуться роботи з модифікації ядерного геному сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці, із застосуванням методів генетичної інженерії [1, 2]. Одним із головних напрямків генетичної інженерії цієї культури є створення сортів із підвищеною стійкістю до абіотичних стресових чинників, зокрема посухи. Відомо, що стійкість до посухи – комплексна ознака, і повний набір генів, що визначають такий фенотип, невідомий. Є ряд досліджень, що пов'язують ці ознаки з вмістом проліну в тканинах рослини, який активно синтезується у відповідь на різні стресові впливи, виступаючи в якості осмопротектора [3]. Для генетичного поліпшення культурних рослин розглядаються можливості використання генів, які контролюють рівень сумісних осмолітів, зокрема метаболізм проліну [4, 5]. У ряді випадків доведена кореляція між вмістом вільного проліну і підвищенням рівня стійкості рослин.

Адаптація рослин до несприятливих умов навколишнього середовища вимагає реалізації складних генетичних програм, у яких задіяна скоординована експресія великих генних ансамблів, дослідження яких необхідне для розуміння молекулярних механізмів стрес-стійкості. Зокрема, у відповідь на стрес змінюється рівень експресії генів, що контролюють метаболізм деяких амінокислот [6]. До їх числа відноситься ген дельта-орнітинамінотрансферази (ОАТ, ЄС 2.6.1.13), що кодує фермент, який каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (П5К) і глутамату [7]. Ця реакція є частиною системи взаємоперетворення таких амінокислот, як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний з фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресів, регуляцією процесів розвитку [8–10]. Згідно з літературними да-

ними, ген *oat* бере участь у відповіді на стрес, проте його конкретна біологічна роль залишається незрозумілою і є предметом обговорення [7]. Довгий час вважалося, що ОАТ бере участь у синтезі проліну при стресі [11, 12], проте ряд дослідників спростовують це твердження і постулюють, що ген *oat* регулює деградацію орнітину і пов'язаний із системою рециркуляції азоту [8]. Окремі дані вказують на участь гена *oat* в ряді інших життєво-важливих клітинних процесів [13–15]. Потенційно ОАТ може бути важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну і шлях біосинтезу поліамінів. Транскрипційна регуляція цього гена не вивчена, а його роль у процесах розвитку та відповіді на стрес до кінця не визначена.

Введення екзогенного гена орнітинамінотрансферази (*oat*) в геном пшениці є одним з перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Виявлено, що експресія гена *oat* підвищує рівень стійкості трансгенних рослин рису та тютюну до посухи і засолення [11, 16, 17]. Показано, що інтеграція в геном реципієнта гена *oat* арабідопсису забезпечує підвищену концентрацію проліну в клітинах, що корелює з підвищенням стійкості рослин до осмотичного стресу, викликаного такими чинниками, як посуха, підвищений вміст солей у ґрунті, зниження температури нижче 0°C. Є дані, які вказують на можливість успішного вирощування пшениці з геном *oat* арабідопсису в ґрунті, який містить понад 100 мМ NaCl. Ряд авторів у своїх роботах не виявили прямого зв'язку між експресією *oat*, концентрацією проліну та дією стресових факторів [18]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було проаналізувати показники осмостійкості трансгенних рослин пшениці, які було отримано з використанням векторної конструкції pVi-OAT, що містить цільовий ген орнітин амінотрансферази.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували сучасний високоврожайний сорт м'якої пшениці Зимоярка. Для трансформації використовували калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили за допомогою штаму AGLO, що містить вектор рВі-ОАТ з цільовим геном – орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula*, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli* (люб'язно надана д. б. н. Кочетовим А. В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ). Умови трансформації наведено у роботі [19]. Наявність трансгенів у геномі досліджуваних рослин визначали методом ПЛР, аналізуючи ДНК з листків отриманих рослин.

Оцінка осмостійкості трансформантів проводилася на підставі порівняння сирової маси контрольних і трансгенних рослин, що росли 5 тижнів на середовищі з високим вмістом маніту (0,8 М) і на стандартному середовищі МС [20]. Для фізіологічного аналізу було відібрано 8

трансформантів, що несуть конструкцію рВі-ОАТ. Чотири рослини висаджувалися на середовище, що містило 0,8 М, і чотири на стандартне середовище МС. У якості контролю використовували нетрансгенні рослини сорту Зимоярка. Оцінку осмостійкості трансформантів проводили на підставі порівняння сирової маси контрольних і трансгенних рослин. Для визначення концентрації вільного проліну в тканинах рослин, культивованих в умовах *in vitro* за дії осмотичного стресу, використовували методику Чинарда з модифікаціями [21].

Результати та обговорення

Нами проведено аналіз осмостійкості рослин пшениці з підвищеною експресією гена *oat*. На рисунку 1 представлені узагальнені результати вимірювань сирової маси окремих трансформантів. Показано, що зростання трансгенних рослин на стандартному середовищі МС істотно не відрізняється від контролю (рис. 1 А), маса рослин становить, в середньому, 560 мг. При цьому всі досліджені трансформанти демонструють підвищену, в порівнянні з контролем, масу на середовищі з високим вмістом маніту (рис. 1 Б).

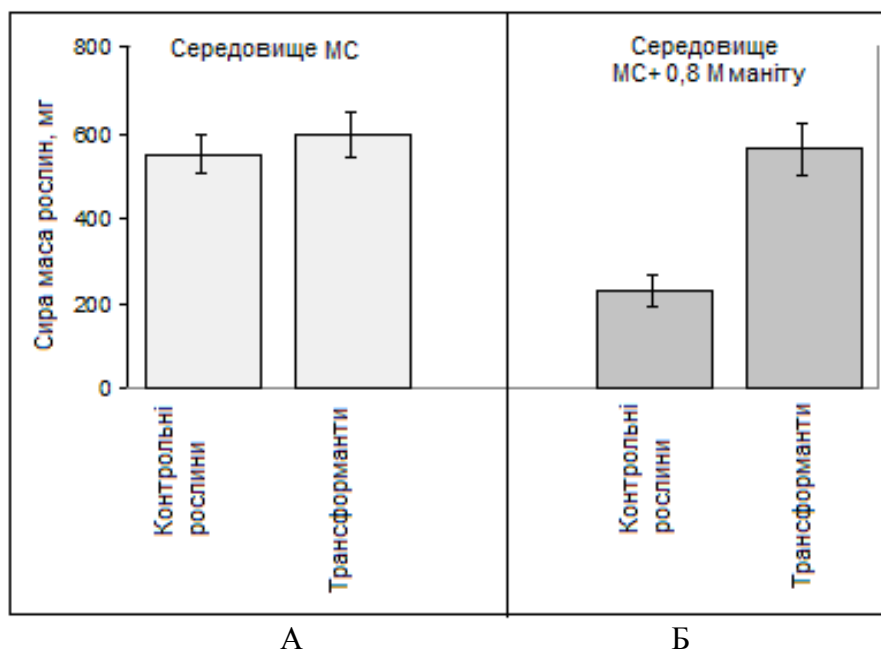


Рис. 1. Оцінка осмостійкості рослин із підвищеною експресією гена *oat*. Представлені сумарні дані по пулу трансформантів. А – результати вимірювання сирової маси рослин на контрольному середовищі МС, Б – результати вимірювання сирової маси рослин на середовищі з 0,8 М маніту.

Нами з'ясовано, що введення векторної конструкції рВі-ОАТ не призводить до достовірних відмінностей за сирою масою рослин на стандартному середовищі МС, проте достовірно підвищує сиру масу рослин на середовищі з додаванням 0,8 М маніту в порівнянні з нетрансгенними рослинами. Під час вирощування контрольних рослин пшениці на середовищі з манітом їх ріст поступово призупинявся, тому сира маса рослин була значно нижчою, становила близько 230 мг. Таким чином, осмотичний стрес достовірно знижує масу контрольних рослин і не призводить до достовірних змін сирової маси трансгенних рослин у порівнянні зі стандартними умовами.

На рисунку 2 можна бачити, що окремі трансформанти на контрольному середовищі розвиваються більш інтенсивно – мають пагони більшого розміру та формують більше коренів, ніж контрольні рослини. Фенотип рослин із підвищеною експресією гена *oat* проявлявся в посиленому формуванні коренів і підвищеній здатності до зростання в умовах сублетальної концентрації маніту. За результатами аналізу можна зробити висновок, що трансгенні рослини, які мають підвищену експресію гена *oat*, формують більше коренів як на стандартному середовищі, так і в умовах сольового стресу, що свідчить про підвищену здатність до зростання і осмотичності.

Для оцінки експресії гена *oat* вимірювали концентрацію вільного проліну у трансформованих рослин. Вимірювання проводили в зеленому листі рослин, що росли п'ять тижнів на стандартному середовищі і на середовищі, що містило 0,8 М маніту. Результати вимірювань представлені на рисунку 3. З діаграм, представлених на рисунку, видно, що рівень вільного проліну в листках трансгенних рослин, що росли на стандартному середовищі МС, достовірно не відрізняється від контролю. При зростанні на середовищі з високим вмістом маніту рівень проліну в листках рослин усіх генотипів підвищується приблизно в 5–6 разів. Наявність трансгенів суттєво не впливає на накопичення проліну при осмотичному стресі. І у контрольних, і у трансгенних рослин спостерігається майже однакове підвищення рівня проліну. Таким чином, введення генетичної конструкції, що змінює експресію гена, не призводить до суттєвої зміни рівня вільного проліну в листках рослин ні в нормі, ні за осмотичного стресу.

Літературні дані свідчать про те, що ген *oat* бере участь у відповіді на стрес у рослин [22, 23]. У цій роботі досліджували зв'язок експресії гена *oat* з реакцією рослини на осмотичний стрес і накопичення вільного проліну. Осмотичний стрес є класичним експериментальним стресовим фоном, крім того, він часто трапляється в природних умовах.

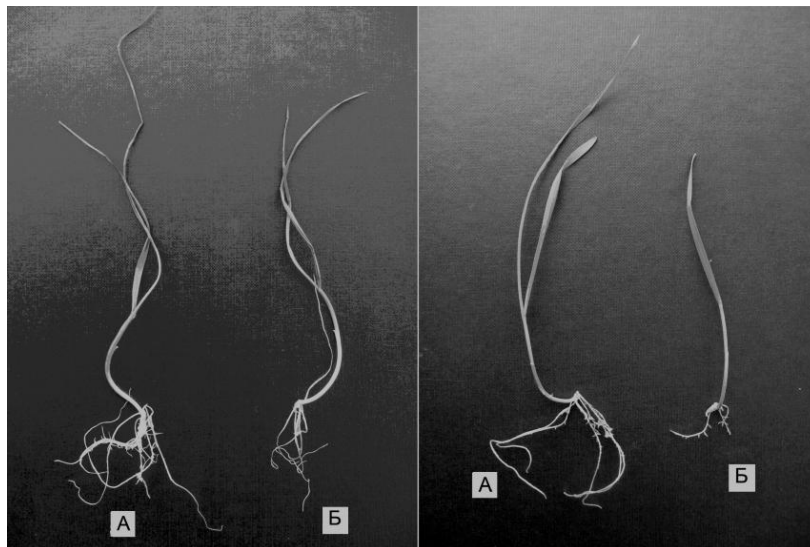


Рис. 2. Фенотип контрольних та трансгенних рослин на контрольному та середовищі з 0,8 М маніту. А – трансгенні рослини; Б – контрольні рослини.

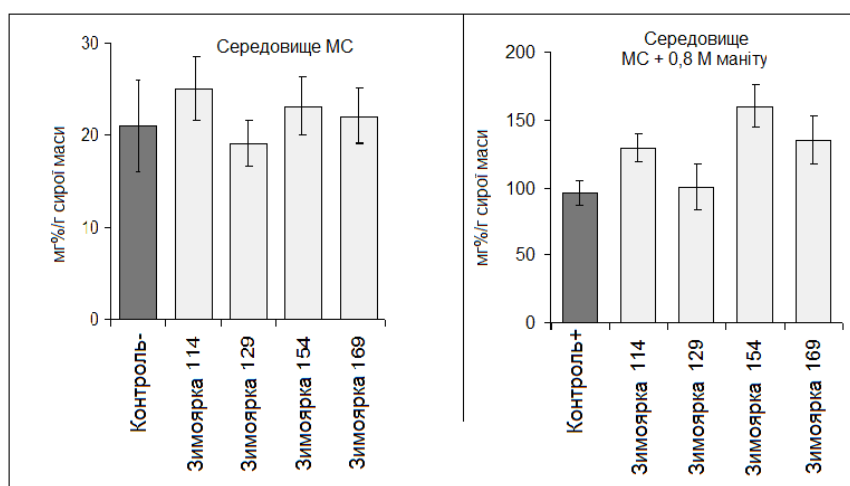


Рис. 3. Вміст вільного проліну у контрольних та трансформованих рослин. Контроль- – нетрансформовані рослини сорту Зимоярка, вирощені без осмотичного стресу. Контроль+ – нетрансформовані рослини сорту Зимоярка вирощені в умовах осмотичного стресу.

В умовах осмотичного стресу відбувається швидке накопичення проліну – процес, у який, імовірно, залучений ген *oat* [24]. Тому було оцінено параметри росту отриманих трансгенних рослин у нормальних умовах і за осмотичного стресу, а також виміряно рівень вільного проліну в цих рослинах у нормі і при стресі. Рослини з підвищеною експресією гена *oat* в нормі за ростом пагонів майже не відрізняються від контролю, але формують достовірно більше коренів, ніж контрольні рослини (рис. 2). Оскільки в нормі зміна експресії гена *oat* не впливає на життєздатність рослин, можна припустити, що ген *oat* не належить до тієї категорії генів, які є абсолютно необхідними для здійснення основної життєдіяльності рослин в нормальних умовах. Однак, оскільки посилення експресії *oat* прискорює ріст коренів, можна припустити, що функції цього гена пов'язані з процесами підтримки росту і формування коренів.

Рослини, що мають підвищену експресію гена *oat*, демонструють підвищену здатність до росту в умовах осмотичного стресу (рис. 2 Б). Ріст контрольних рослин при стресі пригнічений, про що свідчать достовірні відмінності в біомасі контрольних рослин на стандартному середовищі і середовищі з високим вмістом маніту (рис. 1). Водночас, трансгенні рослини, що несуть конструкцію рВи-ОАТ, зберігають здатність до росту. Біомаса генетично-модифікованих рослин, що зростали в умовах осмотичного стресу, в середньому трохи нижча,

ніж в нормальних умовах, проте між біомасою на стресовому фоні і в стандартних умовах не виявляється достовірних відмінностей. Виходячи з цих результатів, можна зробити висновок, що посилення експресії гена *oat* у трансгенних рослинах в умовах експерименту знімає інгібування ростових процесів, яке в нормі накладає осмотичний стрес. За осмотичного стресу рослини з підвищеною експресією гена *oat* демонструють контрастний фенотип за розміром і, відповідно, біомасою коренів у порівнянні з контрольними рослинами (рис. 2 Б). Розмір, і відповідно, маса коренів трансгенних рослин із підвищеною експресією гена *oat* при стресі вищі, ніж у контрольних рослин. Із цих результатів можна зробити висновок, що підвищена експресія гена *oat* прискорює процеси укорінення і стимулює ріст коренів не тільки в нормі, але й при стресі.

Досліджувана біохімічна характеристика – рівень вільного проліну – залишається стабільною і суттєво не змінюється в залежності від рівня експресії гена *oat*. І у контрольних, і у трансгенних рослин рівень вільного проліну підвищувався за стресу приблизно в 5–6 разів. При цьому, за своїм абсолютним значенням, вміст проліну як в нормі, так і при стресі суттєво не відрізнявся від контролю. З цих результатів можна зробити висновок, що зміна експресії гена *oat* суттєво не позначається на накопиченні проліну ні в нормі, ні при стресі.

Висновки

Виявлено, що підвищення експресії гена *oat* в трансгенних рослинах м'якої пшениці призводить до підвищеного формування коренів у нормі і за осмотичного стресу. Показано, що введення генетичної конструкції, що підвищує

експресію гена *oat*, у геном м'якої пшениці призводить до підвищеної осмотичності рослин. Підсилення експресії гена *oat* суттєво не позначається на накопиченні проліну ні в нормі, ні при стресі.

Література

1. El-Mangoury K., Abdrabou R., Yasien M., Fahmy A. Optimization of a transformation system for three Egyptian wheat cultivars using immature embryo-derived callus via microprojectile bombardment // Arab. J. Biotech. – 2006. – V. 9, № 1. – P. 175–188.
2. Xia G., Li Z., He C., Chen H., Richard B. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Physiol. Sin. – 1999. – V. 25. – P. 22–28.
3. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. – 2009. – V. 15, № 2. – P. 89–97.
4. Kishor P., Sangam S., Amrutha R. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Curr. Sci. – 2005. – V. 88, № 3. – P. 424–438.
5. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // Mol. Breed. – 2002. – V. 9, № 2. – P. 73–80.
6. Martinelli T., Whittaker A., Bochicchio A., Vazzana C., Suzuki A., Masclaux-Daubresse C. Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the 'resurrection' plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, N 11. – P. 3037–3046.
7. Stránská J., Kopečný D., Tylichová M., Snégaroff J., Sebelá M. Ornithine delta-aminotransferase: An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants // Plant Signal Behav. – 2008. – V. 3, N 11. – P. 929–935.
8. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis // BMC Plant Biol. – 2008. – V. 8. – P. 40.
9. Canas R.A., Villalobos D.P., Diaz-Moreno S.M., Canovas F.M., Canton F.R. Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine- δ -Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination // Plant Physiol. – 2008. – V. 148. – P. 77–88.
10. Mattioli R., Costantino P., Trovato M. Proline accumulation in plants: not only stress // Plant Signal Behav. – 2009. – V. 4, N 1. – P. 1016–1018.
11. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // Mol. Breed. – 2002. – V. 9. – P. 73–80.
12. Roosens N., Thu T.T., Iskandar H.M., Jacobs M. Isolation of ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. – 1998. – V. 117. – P. 263–271.
13. Boon L., Geerts W., Jonker A., Lamers W.H., Van Noorden C.J.F. High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules // Histochem. Cell. Biol. – 1999. – V. 111. – P. 445–452.
14. Slocum R.D. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants // Plant Physiol. and Biochem. – 2005. – V. 43. – P. 729–745.
15. Page A.F., Minocha R., Minocha S.C. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells // Amino Acids. – 2012. – V. 42. – P. 295–308.
16. Wu L., Fan Z., Guo L. Over-expression of an *Arabidopsis OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice // Chinese Sci. Bull. – 2003. – V. 48, № 23. – P. 2594–2600.
17. Vendruscolo E., Schuster I., Pileggi M. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat // Plant Physiol. – 2007. – V. 164, № 10. – P. 1367–1376.
18. Delauney A.J., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants // Plant J. – 1993. – V. 4, Issue 2. – P. 215–223.
19. Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. – К.: Логос, 2014. – Т. 15. – С. 16–19.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
21. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. [и др.] Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tournef* // Изв. Акад. наук Молд. ССР. – 1981. – Т. 4. – С. 55–60.
22. Sharma S., Verslues P.E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recover // Plant, Cell and Environment. – 2010. – V. 33. – P. 1838–1851.
23. Xue X., Liu A., Hua X. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus* // BMB Reports. – 2009. – V. 42. – P. 28–34.
24. Szabados L., Savouré A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in plant science. – 2010. – V. 15, N 2. – P. 89–97.

HONCHARUK O.M., DUBROVNA O.V.

*Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net*

ANALYSIS OF RESISTENCE TO OSMOTIC STRESS TRANSGENIC WHEAT PLANTS, CARRING THE GENE ORNITHINE AMINOTRANSFERASE

Aim. Analysis of resistance to osmotic stress of transgenic wheat plant with a target gene ornithine aminotransferase.

Methods. Physiological and biochemical methods were used to characterize the transgenic plants. **Results.** It is shown that increased expression of the gene *oat* accelerates rooting and encourages root growth is not only normal, but under stress. It is found that changes in gene expression *oat* not significantly affect the accumulation of proline neither normal nor under stress. **Conclusions.** It is shown that the introduction of genetic construct that increases expression of gene *oat* in wheat genome leads to increased osmotolerance of plants. Enhancement of gene expression *oat* not significantly affect the accumulation of proline neither normal nor under stress.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*, ornithine aminotransferase, osmotolerance.