

<https://doi.org/10.15407/frg2020.05.434>

УДК:579.254.2:633.11:633.15:998.16:112.338

ОСМОТОЛЕРАНТНІСТЬ Т4 ПОКОЛІННЯ ОДНОДОЛЬНИХ І ДВОДОЛЬНИХ РОСЛИН ІЗ ПРИГНІЧЕНОЮ ЕКСПРЕСІЄЮ ГЕНА КАТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ

А.Г. КОМІСАРЕНКО, С.І. МИХАЛЬСЬКА, В.М. КУРЧІЙ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com*

Проаналізовано збереження ознаки функціонування трансгена в насіннево-му поколінні (Т4) генетично модифікованих рослин кукурудзи, пшениці та соняшника. Показано, що близько 80–85 % насіння створених біотехнологічним шляхом рослин було здатним до проростання за умов водного дефіциту й засолення, тоді як у рослин вихідної форми цей показник становив 20–28 %. Відмічена варіабельність в експресії трансгенів серед індивідуальних варіантів насінневого покоління генетично змінених форм. Майже 65 % Т4 проростків кукурудзи й пшениці витримували умови надзорського стресу, створюваного добавлянням до середовища культивування 0,8 М маніту, які були летальними для вихідної форми. Потомство трансгенних рослин також характеризувалося підвищеним рівнем стійкості до посухи, створюваної припиненням поливу, що позначалося на показниках ростових процесів. На етапі відновлення після дії тривалого зневоднення біотехнологічні рослини соняшника випереджували в рості вихідну форму на 17 см і мали в 1,5 раза вищі показники біомаси. Збереження життєздатності генетично змінених варіантів за стресових умов пов'язано з підвищенням рівня вільного *L*-проліну (Pro). Генетично модифіковані рослини на відміну від вихідної форми характеризувались вищим в 1,5–2 рази вмістом Pro як за нормального забезпечення вологою, так і за її дефіциту, що може бути результатом часткової супресії гена проліндегідрогенази (*PDH*, *pdh*) біотехнологічних рослин. Встановлено, що за нормальних умов культивування активність ферменту PDH у трансгенних Т4 проростках кукурудзи і соняшника була нижчою майже в 3 рази порівняно з вихідною формою, для рослин пшениці ця різниця становила 1,6 рази. При цьому тенденцію до зниження активності ферменту PDH в Т4 досліджуваних представників однодольних і дводольних рослин відносно контролю спостерігали на всіх етапах культивування.

Ключові слова: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L., генетична модифікація, насінневе покоління, проліндегідрогеназа, пролін, осмотичність.

Отримання високопродуктивних сортів і гібридів культурних рослин, стійких до біотичних стресорів, а також створення генотипів, толе-

Цитування: Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М. Осмотолерантність Т4 покоління однодольних і дводольних рослин із пригніченою експресією гена катаболізму проліну. *Фізіологія рослин і генетика*. 2020. 52, № 5. С. 434–448. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.434>

рантних і до абіотичних стресових чинників, є пріоритетним завданням сучасного сільськогосподарського виробництва [1].

Рослини часто піддаються впливу різних негативних чинників зовнішнього середовища: високі й низькі температури, дефіцит вологи, засолення ґрунту і т. д. За останні 25 років на території України найголовнішим несприятливим кліматичним чинником, дія якого з часом тільки посилюється, стає нестача вологи, що є наслідком зниження річної кількості опадів. Зростання кількості й сили небезпечних гідрометеорологічних явищ призводить до зменшення існуючого потенціалу врожайності, тому отримання рослин, адаптованих до стресової дії абіотичних чинників, та дослідження особливостей генетичного рівня регуляції процесів, пов'язаних із підвищенням стійкості до стресів, є актуальним і потребує комплексних фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень [2, 3].

Крім сільськогосподарського аспекту проблема стійкості має велике природно-екологічне значення, адже здатність рослин адаптуватися до умов існування є важливим чинником, що визначає ареали поширення видів на планеті і можливість їх інтродукції [4].

На сьогодні в провідних біотехнологічних центрах світу широко розгорнулись роботи зі створення методами генної інженерії сільськогосподарських рослин із підвищеною стійкістю до стресів, а також активізувались роботи з дослідження генів, що змінюють реакцію рослин на стресові умови. При отриманні генетично модифікованих рослин, стійких до стресових чинників, аналізують можливості трансгенезу з використанням різноманітних структурних і регуляторних генів, які можуть ефективно контролювати процеси адаптації (стійкості) культурних рослин на різних етапах їх росту і розвитку [2–10].

Проводять роботу з виявлення, клонування і перенесення в рослини чужорідних генів, які кодуєть утворення різних осмопротекторів: вуглеводів, амінокислот, багатоатомних спиртів, поліамінів. Ці низькомолекулярні нетоксичні речовини сприяють поглинанню й утриманню води, регулюють вміст ненасичених жирних кислот у мембранах клітин, запобігають руйнуванню макромолекул білків та ін. [2, 11, 12].

У клітинах багатьох видів рослин функцію осмоліту виконує *L*-пролін, зміни вмісту якого важливі для швидкої адаптації рослин до змін у режимі вологозабезпечення. Коли стрес виникає раптово і рослина не встигає до нього пристосуватися, то процес її виживання залежить від ініціації генного механізму стресової відповіді, що контролює синтез специфічних білків, і напрацювання необхідних метаболітів, які в подальшому виконують основні захисні функції (в тому числі й проліну). Початкова стадія роботи генного механізму може бути вирішальною ланкою. Якщо стрес пошкоджує базові системи функціонування живої клітини, то синтез білків стресової відповіді буде низькоефективним, а прогноз на виживання — несприятливим. Надлишок *L*-проліну в трансгенних рослинах у нормі здатний пом'якшити наслідки перших етапів впливу стресу саме у фазу індукції експресії відповідних генів, що дасть змогу швидше й ефек-

тивніше запусити напрацювання захисних білків [2, 13]. Цей напрям досліджень сприяє розв'язанню різноманітних практичних і теоретичних питань, у тому числі пов'язаних із функціональною геномікою, механізмами експресії генів еукаріот, із можливістю вибіркової зміни експресії окремих генів [3, 5, 11, 14].

Підвищити вміст вільного *L*-проліну можна як додатковим введенням копій кДНК, які відповідають за його синтез, а саме генів Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтетази (*P5CS*) й орнітин- δ -амінотрансферази (*OAT*) у смисловій орієнтації трансгена, або частковим інгібуванням експресії ендогенних генів проліндегідрогенази (*pdh*, *PDH*) культурних рослин. Перспективність використання такого напрямку для підвищення рівня стійкості встановлено для низки однодольних і дводольних рослин [3, 15–19].

Механізм створення модифікованих рослин, у яких генетична конструкція не містить трансгенів, що кодують білок, а використовується феномен РНК-інтерференції, що дає змогу відключити або знизити активність одного з власних генів рослин, здатний підвищити привабливість створюваних продуктів і збільшити прихильність споживачів до генетично змінених рослин [2, 3].

Однак доцільність використання певних генів і регулювання їх експресії мають бути встановлені всебічним дослідженням трансгенних варіантів та їх насінневих поколінь згідно з генетичними, фізіолого-біохімічними і морфометричними показниками, оскільки інтегровані в геном трансгени можуть ставати епігенетично-мовчазними відразу або ж через короткий (тривалий) період експресії в наступних поколіннях. Більш того, таке явище стосується не тільки трансгенів, а й гомологічних їм ендогенних генів [3, 20–22].

Незважаючи на інтенсивні дослідження та важливі результати, отримані за допомогою генетичної трансформації, багато питань щодо експресії чужорідної генетичної інформації та функціональних взаємодій екзогенної ДНК з геномом реципієнта до кінця не з'ясовано. До того ж немає однозначної відповіді стосовно наслідування чужорідної генетичної інформації, особливо коли зміни в експресії ендогенних генів відбуваються в результаті посттранскрипційного сайленсингу РНК.

У зв'язку з цим метою нашої роботи був аналіз збереження ознаки стійкості в насінневому поколінні (Т4) генетично змінених рослин однодольних, зокрема інбредних ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) і сортів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) селекції Інституту фізіології рослин та генетики Національної академії наук України, які були створені під керівництвом академіка В.В. Моргуна, та інбредної лінії соняшника (*Helianthus annuus* L.) селекції Інституту олійних культур Національної академії аграрних наук України, до осмотичних стресів та дослідження залежності рівня їх стійкості від часткової супресії гена катаболізму проліну.

Методика

Трансгенні рослини кукурудзи, пшениці та соняшника були отримані за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in

planta з використанням штаму *A. tumefaciens* LBA4404, що несе бінарний вектор pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази *Arabidopsis thaliana*, який складається з інвертованого повтору фрагментів двох копій першого екзона та інтрона гена *pdh*. Розміщення фрагментів гена проліндегідрогенази в антисенсовій орієнтації призводить до пригнічення його експресії внаслідок посттранскрипційного сайленсингу РНК. Окрім цільового гена *PDH* pBi2E містить селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) *E. coli*, який визначає стійкість до антибіотика канаміцинсульфату. Векторну конструкцію люб'язно надав доктор біологічних наук А.В. Кочетов, вона детально описана в наших спільних працях [23, 24].

Об'єктом дослідження було Т4 насінневе покоління генетично змінених рослин інбредних ліній кукурудзи Л370 і Л390, сортів озимої пшениці Достаток і Поліська 90 та інбредної лінії соняшника VK-121.

Рівень стійкості потомства трансгенних рослин аналізували в умовах осмотичних стресів: водного дефіциту та сульфатно-хлоридного засолення, які створювали культивуванням проростків *in vitro* з добавлянням до живильного середовища Мурасиге—Скуга (МС) 0,5—0,8 М маніту (водний дефіцит) або 2,0—2,5 % солей морської води (сульфатно-хлоридне засолення) та в умовах посухи, яку моделювали припиненням поливу рослин *in vivo* на 14 діб.

Морфометричні показники вимірювали за нормального водопостачання та в період відновлення після зневоднення. Рівень вільного *L*-проліну в досліджуваних варіантах визначали за нормальних умов культивування та за осмотичного стресу. Вміст Про аналізували за модифікованою методикою Чинарда [25].

Активність проліндегідрогенази в Т4 трансгенних і контрольних (вихідна форма) рослинах оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ на окиснення *L*-проліну вимірюванням підвищення концентрації НАДН за одиницю часу (1 хв) запропонованим Маттіоні та співавт. способом [26]. Активність виражали в наномолях НАД⁺, який відновлювався протягом 1 хв в розрахунку на 1 мг розчинного білка. Експериментально отримані дані оброблено методами математичної статистики [27].

Результати та обговорення

Успіх у поліпшенні стресостійкості рослин головним чином визначається високим і стабільним рівнем експресії перенесених генів і залежить від ефективності генетичного покращення культурних рослин. При цьому завданням є таке поліпшення окремих показників, яке б не призводило до погіршення інших господарсько-цінних ознак [28]. Відомо, що багато агрономічних ознак може залежати від складної взаємодії кількох генів, і для біотехнологічного поліпшення конкретного виду можуть знадобитися доставка та експресія цілого генного комплексу [1].

Ми отримали генетично модифіковані рослини кукурудзи, пшениці і соняшника та їх насінневі покоління (Т1—Т3) з підвищеною

стійкістю до різних осмотичних стресів, що визначається частковою супресією генів катаболізму проліну [15, 16, 29].

Щоб перевірити факт успадкування трансгенів у Т4 біотехнологічних рослинах і збереження залежності стресостійкості від рівня експресії генів катаболізму проліну *PDH*, проводили селекцію рослин кукурудзи, пшениці та соняшника в умовах дії осмотичних чинників. Такий підхід ми вже успішно апробували при проведенні скринінгу Т0 згадуваних вище трансформованих рослин [30]. Він дає змогу швидко та ефективно добирати генетично модифіковані рослини з підвищеною стійкістю до осмотичних стресів. Необхідність проведення повторної селекції потомства трансгенних рослин пов'язана з імовірною нестабільністю рекомбінантних молекул, оскільки під час трансгенезу тДНК може піддаватися спонтанним перебудовам, наслідком яких можуть бути мутації, що виявляються в подальших поколіннях [5, 20, 31].

Показано, що при культивуванні насіння Т4 генетично змінених рослин на середовищі з непроникним осмолітом манітом, який створює водний дефіцит і моделює посуху, проростає близько 80 % насіння трансгенних рослин. При цьому відсоток схожості контрольних (вихідна форма) рослин майже в 4 рази менший (рис. 1).

Наприклад, для трансгенних рослин кукурудзи та їх вихідної форми цей показник за нормальних умов культивування становив відповідно 98 і 94 %. Отримання меншої кількості насіння біотехнологічних рослин, що проросло в жорстких стресових умовах, може бути пов'язано зі зниженням рівня експресії чужорідного гена або з його інактивацією. Згідно з літературними даними, у значної кількості генетично змінених рослин у подальших поколіннях інтродукований ген втрачає свою активність, хоча й виявляється фізично, тобто рослина здатна активно протистояти експресії чужорідної ДНК [2, 5, 31]. Крім того, мозаїчна експресія трансгена та повна його втрата можуть бути результатом РНК-інтерференції чужорідної ДНК [5].

У разі факту генетичної модифікації необхідною умовою є дослідження всіх отриманих варіантів, оскільки кожна форма може мати власну унікальну характеристику. Так, під час аналізу покоління Т2 біотехнологічних рослин *Zea mays* Л-370 3М ми виявили різну реакцію на селективну концентрацію канаміцинсульфату ліній № 3 і

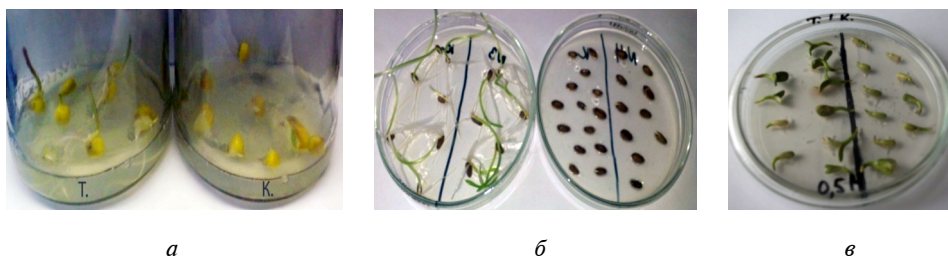


Рис. 1. Пророщування насіння генетично змінених (ліворуч) і контрольних (праворуч) рослин кукурудзи (а), пшениці (б), соняшника (в) на поживному середовищі з манітом (0,5 М)



Рис. 2. Втрата ознаки стійкості до селективного агента в Т4 біотехнологічних рослин кукурудзи

№ 2. Незважаючи на те що вони є потомками однієї трансгенної рослини, якій була властива стійкість до селективного стресового чинника, в лінії № 2 ця ознака не виявлялась вже у другому поколінні, тоді як проростки лінії № 3 демонстрували стійкість до селективної концентрації канаміцину, що свідчить про варіабельність в експресії трансгенів серед індивідуальних варіантів насінневого покоління генетично змінених форм кукурудзи [2].

Під час перевірки Т4 біотехнологічних рослин *Zea mays* ми спостерігали втрату зеленого забарвлення деякими проростками після селекції на канаміцинсульфаті й перенесення в ґрунт, що може бути наслідком інактивування маркерного гена (рис. 2).

Про різний рівень експресії цільового гена може свідчити і той факт, що більшість Т4 проростків кукурудзи (близько 65 %) здатні рости в умовах наджорсткого стресу, створеного додаванням до середовища культивування 0,8 М маніту. При цьому рослини вихідної форми за таких умов вирощування гинули. Подібна відповідь була характерною і для біотехнологічних рослин пшениці та соняшника.

Стійкість до стресових чинників покоління Т4 корелювала з показником рівня вільного *L*-проліну. У стресостійких трансформантів упродовж культивування за нормальних умов рівень цієї амінокислоти варіював у широких межах, проте за абсолютною величиною не перевищував $20,56 \pm 2,04$ мг% сирої речовини. З подовженням дії водного дефіциту вміст вільного Про зростав, така тенденція була характерною для обох видів досліджуваних культур (рис. 3).

Вибір цього способу оцінювання пов'язаний з тим, що незважаючи на зміни в експресії гена *PDH* і вмісті вільного *L*-проліну, підвищення рівня цього осмоліту у відповідь на стрес, по-перше, може не корелювати з осмотолерантністю і, по-друге, може бути пов'язаним з окремим типом стресора [32, 33].

Такий підхід ми успішно використовували й під час тестування трансгенних рослин пшениці (див. рис. 1, б). Насіння генетично змінених рослин на середовищі з 0,5 М маніту проростало на 7 діб раніше, ніж вихідної форми. При цьому перших проростало 85 %, а других — лише 28 %. Проростки Т4 *Triticum aestivum* характеризувались підвищеним вмістом вільного *L*-проліну як за нормальних умов вирощування, так і за культивування в умовах осмотичного стресу (рис. 4).

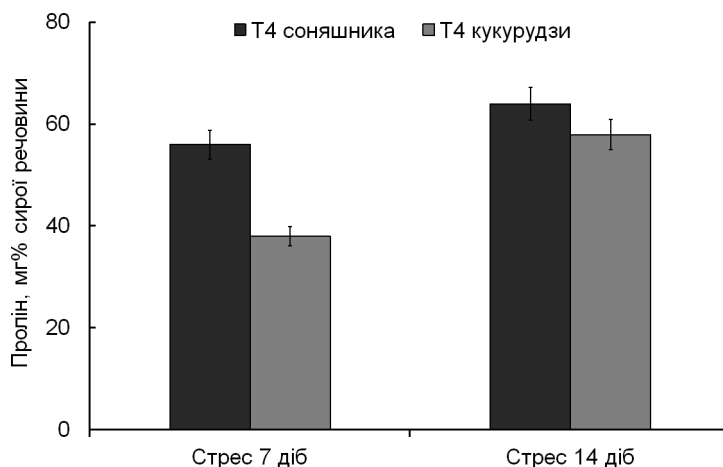


Рис. 3. Рівень вільного *L*-проліну в листках рослин кукурудзи і соняшника за тривалої дії модельованого водного стресу

За тривалого модельованого водного дефіциту (14 днів) рівень цього осмоліту в потомства біотехнологічних рослин зростав приблизно втричі, тоді як у вихідної форми — вдвічі. В підсумку різниця між досліджуваними варіантами була істотною (~2 рази). В умовах сульфатно-хлоридного засолення рівень вільного *L*-проліну в контрольних рослин був приблизно таким, як у трансгенних варіантів за недостатнього водозабезпечення, при цьому в останніх він зростав в 1,5 раза порівняно з контролем.

Слід зазначити, що при тестуванні рослин підвищення концентрації стресового чинника маніту до 0,8 М і солей морської води до 2,5 % спричинювало загибель контрольних рослин і зменшувало вихід стресостійких форм трансгенних рослин пшениці до 64 %.

Результати дослідження природи адаптивних реакцій рослин до дії різних стресів свідчить про існування як специфічних, так і за-

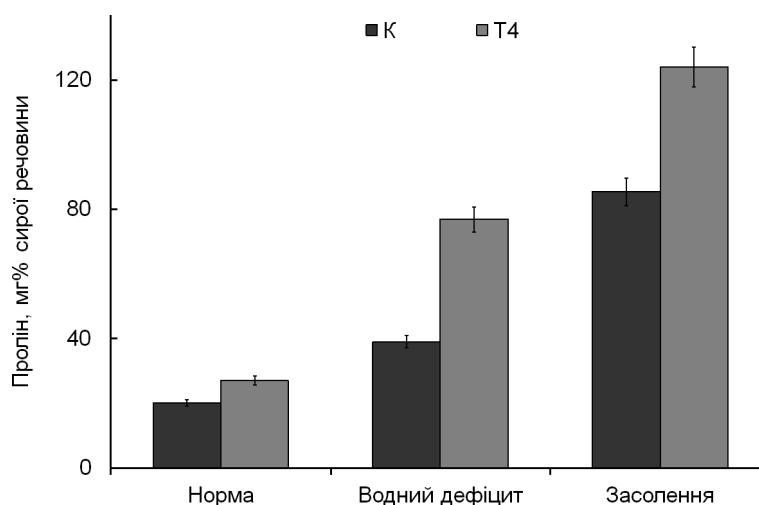


Рис. 4. Рівень вільного *L*-проліну в листках рослин озимої пшениці: К — контроль (вихідна форма); Т4 — трансгенні рослини

гальних механізмів розвитку стійкості. Під впливом останніх стійкість рослин, яка сформувалась до одного несприятливого чинника, може підвищувати стійкість і до інших. Відібрані рослини здатні виявляти стійкість до двох і більшої кількості типів стресу, іноді навіть не подібних за фізико-хімічною природою та мішенями дії. З використанням добору *in vitro* експериментально підтверджено можливість отримання рослин, стійких до кількох стресових чинників [34].

Об'єктивність оцінки стійкості передбачає поєднання методів *in vitro* та *in vivo*. При цьому, коли в першому випадку можна виключити (додати) стресові навантаження й дозувати концентрації стресомодельюючих компонентів, то в другому можна дослідити вплив стресового чинника на різних стадіях вегетації.

Так, під час тестування рівня стійкості Т4 трансгенних рослин кукурудзи і соняшника в умовах посухи спостерігали відмінності за висотою та масою рослин із переважанням генетично змінених форм. На етапі відновлення після дії тривалого зневоднення, створеного припиненням поливу в фазу формування третьої пари листків, біотехнологічні рослини соняшника випереджали в рості вихідну форму на 17 см. Разом з цим встановлено відмінності в накопиченні біомаси трансгенних і контрольних рослин. Так, маса Т4 рослин після перенесеного стресу становила $18,5 \pm 3,0$ г, що істотно перевищує контрольні показники, які були меншими майже в 1,5 раза. Попереднє покоління біотехнологічних рослин в умовах водного дефіциту також характеризувалось ліпшими морфометричними показниками порівняно з вихідною формою [2, 16].

При цьому на ранніх етапах росту і розвитку рослин відбувались динамічні зміни вмісту в них вільного L-проліну в умовах норма → → стрес → норма (рис. 5). Рівень цієї амінокислоти в трансгенних варіантах за нормальних умов культивування рослин достовірно перевищував контрольні значення. Ймовірно, такої кількості Pго до-

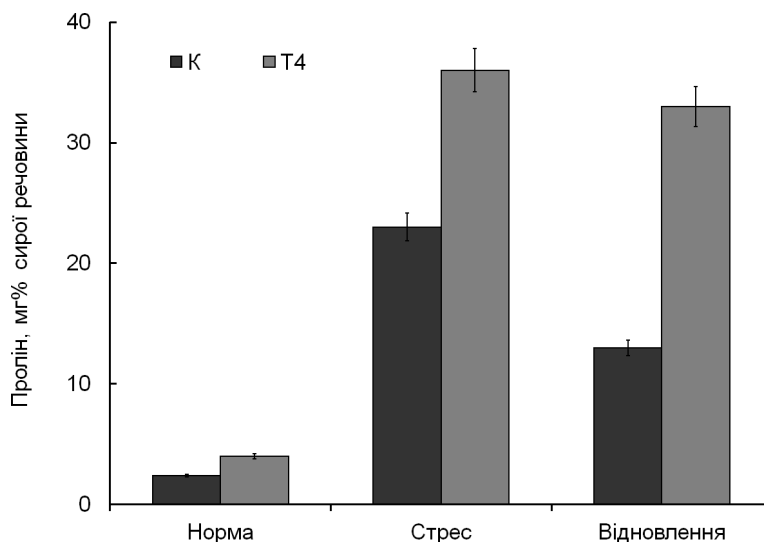


Рис. 5. Рівень вільного L-проліну в біотехнологічних рослинах кукурудзи (Т4) та їх вихідної форми (К)

статньо для захисту основних макромолекулярних комплексів клітин на найраніших етапах негативного впливу.

В умовах водного дефіциту рівень вільного *L*-проліну відносно нормальних умов вирощування як у генетично змінених, так і в контрольних рослин підвищувався приблизно у 6 разів. При цьому в трансгенних варіантах його рівень в 1,4 раза перевищував контрольні показники. Після регідратації вміст Pro в T4 рослинах кукурудзи майже не змінювався, хоча у вихідній формі цей показник зменшився вдвічі.

Тенденція до підвищення вмісту вільного *L*-проліну в умовах норма → стрес була характерною і для досліджуваних рослин соняшника. Так, за нормального водозабезпечення рівень цієї амінокислоти в T4 рослин перевищував контрольні значення у 2,5 раза. В умовах осмотичного стресу він зростав як у рослин вихідної форми, так і в трансгенних відповідно в 9 і 5 разів. У підсумку ця різниця становила 1,3 раза. Очевидно, що такий рівень амінокислоти оптимальний для підтримання осмотичного статусу всього організму. Отже, реакція рослин на зміни умов культивування обох досліджуваних об'єктів була аналогічною.

Хоча в умовах стрес → норма в потомства біотехнологічних рослин *Helianthus annuus* на відміну від трансгенних рослин *Zea mays* рівень Pro різко знижувався і був на рівні контрольних значень за нормальних умов вирощування, що може свідчити про швидку реакцію у відповідь на зміни умов довкілля, у контрольних рослин процес відновлення після стресу відбувався значно повільніше. Така неоднозначна реакція з боку рослин різних таксономічних груп може вказувати на те, що ефективність виживаності залежить не тільки від стабілізації процесів життєдіяльності, а й забезпечується швидкістю активізації захисних механізмів.

Загалом баланс синтезу та деградації Pro є одним із головних елементів механізму стійкості рослин до осмотичних стресів. Це ми показали і в попередніх дослідженнях вмісту вільного *L*-проліну на початкових етапах стресового впливу, що створило передумови виявлення «швидких» реакцій з боку рослини [35].

Очевидно, що збереження життєздатності генетично змінених варіантів рослин за стресових умов пов'язано з підвищенням рівня Pro внаслідок часткової супресії гена проліндегідрогенази, про що свідчить зниження активності ферменту.

Встановлено, що за нормальних умов культивування активність ферменту PDH в 7-добових трансгенних T4 проростках кукурудзи і соняшника була нижчою майже в 3 рази порівняно з вихідною формою. Для рослин пшениці ця різниця становила 1,6 раза. У стресових умовах (припинення поливу на 7 діб) експресія гена проліндегідрогенази дещо пригнічувалась як у контролі, так і в генетично модифікованих форм, що відбивається на рівні активності ферменту. При цьому тенденція до зниження активності ферменту PDH у досліджуваних рослин T4 відносно контролю спостерігалась на всіх етапах культивування, що свідчить про часткову супресію гена *PDH* у біотехнологічних рослинах.

Отже, встановлено збереження ознаки стійкості в Т4 генетично змінених рослин *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. та *Helianthus annuus* L. При цьому серед індивідуальних варіантів насінневого покоління генетично модифікованих злакових культур відмічена варіабельність в експресії трансгенів, що виявляється в різній здатності до проростання за умов водного дефіциту і стійкості до селективного чинника.

У досліджуваних рослин із функціональним трансгеном підвищений рівень стійкості до водного дефіциту та засолення, що корелює зі збільшенням вмісту вільного *L*-проліну. В біотехнологічних рослинах на відміну від вихідної форми вищий рівень Pro як за нормального забезпечення вологою, так і за її дефіциту.

В процесі дослідження виявлено різні динамічні зміни вмісту вільного *L*-проліну в умовах норма → стрес → норма для Т4 рослин кукурудзи і соняшника. Це може свідчити про різну швидкість активізації захисних механізмів, які дають змогу витримувати стресові навантаження й успішно відновлюватися після них. При цьому тенденція до зниження активності ферменту *PDH* в Т4 відносно рослин вихідної форми спостерігається для обох груп рослин на всіх етапах культивування, що свідчить про часткову супресію гена *PDH* в біотехнологічних рослинах.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. **48**, № 3. С. 196—213. <https://doi.org/10.15407/frg2016.03.196>
2. Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Комисаренко А.Г. Современные биотехнологии повышения устойчивости растений к осмотическим стрессам. Киев: Кондор, 2019. 161 с.
3. Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. Киев: Логос, 2014. 219 с.
4. Ortiz R., Sayre K.D., Govaerts B., Gupta R., Subbarao G.V., Ban T., Hodson D., Dixon J.M., Ortiz-Monasterio J.I., Reynolds M. Climate change: Can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2008. **126**, N 1-2. P. 46—58.
5. Дейнеко Е.В. Генетическая инженерия растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. **18**, № 1. С. 125—137.
6. Abiri R., Valdiani A., Maziah M., Shaharuddin N.A., Sahebi M., Yusof Z.N.B., Atabaki N., Talei D. A critical review of the concept of transgenic plants: Insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Curr Issues Mol. Biol*. 2016. **18**. P. 21—42. <https://doi.org/10.21775/cimb.018.021>
7. Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cardenas M.L., Tricoli D.M. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 2016. **28**. P. 1510—1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
8. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2018. **50**, № 3. С. 187—217. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>
9. Kochetov A.B., Shumny V.K. Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2017. **7**, N 4. P. 421—427. <https://doi.org/10.1134/S207905971704005>

10. Тищенко Е.Н., Михальская С.И., Курчий В.М., Комисаренко А.Г. Генетическая трансформация кукурузы и пшеницы с использованием генов транскрипционных факторов: достижения и перспективы для практического применения. *Физиология растений и генетика*. 2017. **49**, № 4. С. 384–397. <https://doi.org/10.15407/frg2017.05.384>
11. Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. **20**, № 4. С. 475–481. <https://doi.org/10.18699/VJ16.179>
12. Djilianov D., Georgieva T., Moyankova D., Atanassov A., Shinozaki K., Smeecken S.C.M. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants – gene transfer approach. *Biotechnol. & Biotechnological Equipment*. 2005. **19**. P. 63–71. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817287>
13. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. *Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Серія Біологія*. 2014. Вип. 2. С. 6–22.
14. Sinha S.K. RNAi induced gene silencing in crop improvement. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2010. **16**, N 4. P. 321–332. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0036-4>
15. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю., Коберник Н.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н., Моргун В.В. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Физиология растений и генетика*. 2014. **46**, № 6. С. 482–489.
16. Комісаренко А.Г., Михальська С.І. Рівень вільного проліну в ТЗ трансгенних рослинах соняшника (*Helianthus annuus* L.) з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегидрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. **20**. С. 211–214. https://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2017_20_41
17. Ибрагимова Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль гена пролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости растений. *Физиология растений*. 2012. **59**, № 1. С. 99–107.
18. Воронова С.С., Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровная О.В. Генетическая трансформация мягкой пшеницы с использованием векторных конструкций, содержащих гены метаболизма пролина. *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. 2015. **13**, № 1. С. 28–33.
19. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений. *Физиология растений и генетика*. 2013. **45**, № 6. С. 488–500. <https://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
20. Дорохов Ю.Л. Умолкание генов у растений. *Молекулярная биология*. 2007. **41**, № 4. С. 579–592.
21. Wang Y. H. How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *J. Biochem. Tech.* 2008. **1**, N 1. P. 11–20.
22. Wolffe A.P., Matzke M.A. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999. **286**. P. 481–486. <https://doi.org/10.1126/s12298-010-0036-4>
23. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.И., Моргун Б.В., Кочетов А.В. Agrobacterium-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) in vitro и in planta с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Цитология и генетика*. 2014. **48**, № 4. С. 19–30.
24. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных in planta с использованием LBA440, несущего pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Известия Самарского науч. центра РАН*. 2013. **15**, № 3 (5). С. 1662–1665.
25. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. Дьяченко Н.И., Чиликина Л.А., Дроздов В.В., Корочкина С.К., Череп Г.И., Медведев В.В., Нютин Ю.И. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon* Tournef. *Известия АН МССР*. 1981. № 4. С. 55–60.
26. 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. **101**. P. 787–792. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.tb01064.x>

27. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
28. Моргун В.В. Проблемы генетики и селекции растений в Украине на рубеже тысячелетий. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2001. **33**, № 5. С. 452—455.
29. Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М. Дослідження рівня стійкості до водного дефіциту Т3 покоління біотехнологічних рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). *Збірник наукових праць. Біологічні дослідження*. Житомир, 2020. С. 340—343.
30. Спосіб відбору трансгенних рослин із підвищеним рівнем стійкості до водного стресу. Сергеева Л.Є., Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Тищенко О.М.: пат. на корисну модель 97229 Україна. МПК А01Н 1/04, А01Н 4/00; заявл. 02.07.2014. Опубл. 10.03.2015.
31. Marenkova T., Deineco E., Shumny V. Mosaic expression pattern of the nptII gene in transgenic tobacco plants Nu 21. *Russ. J. Genet.* 2007. **43**, N 7. P. 780—790. <https://doi.org/10.1134/S1022795407070101>
32. Mani S., Van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002. **128**, N 1. P. 73—83. <https://doi.org/10.1104/pp.010572>
33. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Yoshitaka Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 1999. **461**, N 3. P. 205—210. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01451-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01451-9)
34. Vij S., Tyagi A. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.* 2007. **3**. P. 361—380. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x>
35. Сергеева Л.Є., Михальська С.І., Курчій В.М., Тищенко О.М. Вміст вільного проліну в проростках кукурудзи як показник швидких реакцій на дію летальних осмотичних стресів in vitro. *Физиология растений и генетика*. 2015. **47**, № 6. С. 491—496.

Отримано 17.09.2020

REFERENCES

1. Morgun, V.V., Dubrovna, O.V. & Morgun, B.V. (2016). Modern biotechnologies for stress-resistant wheat plants. *Fiziol. rast. genet.*, 48, No. 3, pp. 196-213 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2016.03.196>
2. Sergeeva, L.E., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2019). Modern biotechnologies for increasing plant resistance to osmotic stresses. Kyiv: Kondor [in Russian].
3. Morgun, B.V. & Tishchenko, E.N. (2014). Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv: Logos [in Russian].
4. Ortiz, R., Sayre, K.D., Govaerts, B., Gupta, R., Subbarao, G.V., Ban, T., Hodson, D., Dixon, J.M., Ortiz-Monasterio, J.I. & Reynolds, M. (2008). Climate change: Can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 126, No. 1-2, pp. 46-58.
5. Deyneko, Ye.V. (2014). Geneticheskaya inzheneriya rasteniy. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*, 18, No. 1, pp. 125-137 [in Russian].
6. Abiri, R., Valdiani, A., Maziah, M., Shaharuddin, N.A., Sahebi, M., Yusof, Z.N.B., Atabaki, N. & Talei, D. (2016). A critical review of the concept of transgenic plants: Insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Curr Issues Mol. Biol.*, 18, pp. 21-42. <https://doi.org/10.21775/cimb.018.021>
7. Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V., Conrad, L.J., Gelvin, S.B., Jackson, D.P., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J.I., Orozco-Cardenas, M.L. & Tricoli, D.M. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell.*, 28, pp. 1510-1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>

8. Dubrovna, O.V. & Morgun, B.V. (2018). Modern Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Fiziol. rast. genet.*, 50, No. 3, pp. 187-217 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>
9. Kochetov, A.V. & Shumny, V.K. (2017). Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7, No. 4, pp. 421-427. <https://doi.org/10.1134/S2079059717040050>
10. Tishchenko, E.N., Mykhalska, S.I., Kurchii, V.M. & Komisarenko, A.G. (2017). Genetic transformation of corn and wheat using genes of transcription factors: achievements and prospects for practical application. *Fiziol. rast. genet.*, 49, No. 5, pp. 384-397 [in Russian]. <https://doi.org/10.15407/frg2017.05.384>
11. Kochetov, A.V. & Shumny, V.K. (2016). Transgenic plants as genetic models for studying the functions of plant genes. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*, 20, No. 4, pp. 475-481. <https://doi.org/10.18699/VJ16.179>
12. Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K. & Smeecken, S.C.M. (2005). Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants — gene transfer approach. *Biotechnol. & Biotechnological Equipment*, 19, pp. 63-71. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817287>
13. Kolupaev, Yu.E., Vainer, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of the content in plants under stress conditions Newsletter. *Kharkiv. nat. agrarian. un-tu. Ser. Biol.*, No. 2, pp. 6-22 [in Russian].
14. Sinha, S.K. (2010). RNAi induced gene silencing in crop improvement. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16, No. 4, pp. 321-332. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0036-4>
15. Mykhalska, S.I., Sergeeva, L.E., Matveeva, A.Yu., Kobernik, N.I., Kochetov, A.V., Tishchenko, E.N. & Morgun, V.V. (2014). Increasing the content of free proline in osmotolerant transgenic maize plants with double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Fiziol. rast. genet.*, 46, No. 6, pp. 482-489 [in Russian].
16. Komisarenko, A.G. & Mykhalska, S.I. (2017). The free proline levels in transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) T3 plants with double-stranded proline dehydrogenase gene RNA-suppressor. *Faktyory eksperyment. evolyutsiyi orhanizmiv*, 20, pp. 211-214 [in Ukrainian]. https://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2017_20_41
17. Ibragimova, Ya.S., Gerasimova, S.V. & Kochetov, A.V. (2012). The role of the proline dehydrogenase gene in maintaining stress resistance in plants. *Fiziologiya rasteniy*, 59, No. 1, pp. 99-107 [in Russian].
18. Voronova, S.S., Goncharuk, O.M., Baval, A.V. & Dubrovnaya, O.V. (2015). Genetic transformation of common wheat using vector constructs containing genes for proline metabolism. *Visn. Ukr. t-va genetikiv i selektsioneriv*, 13, No. 1, pp. 28-33 [in Russian].
19. Tishchenko, E.N. (2013). Genetic engineering using L-proline metabolism genes to increase plant osmotolerance. *Fiziol. rast. genet.*, 45, No. 6, pp. 488-500 [in Russian]. <https://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
20. Dorokhov, Yu.L. (2007). Silence of genes in plants. *Molekulyar. Biologiya*, 41, No. 4, pp. 579-592 [in Russian].
21. Wang, Y.H. (2008). How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *J. Biochem. Tech.*, 1, No. 1, pp. 11-20.
22. Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286, pp. 481-486. <https://doi.org/10.1126/s12298-010-0036-4>
23. Tishchenko, O.M., Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I., Sergeeva, L.E., Adamenko, N.I., Morgun, B.V. & Kochetov, A.V. (2014). Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using the LBA4404 strain carrying the pBi2E plasmid with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Tsitologiya i genetika*, 48, No. 4, pp. 19-30 [in Russian].
24. Mykhalska, S.I., Matveeva, A.Yu., Sergeeva, L.E., Kochetov, A.V. & Tishchenko, E.N. (2013). Study of free proline content in maize plants transformed in planta using LBA4404 carrying pBi2E with double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Izv. Samar. nauch. tsentra RA*, 15, No. 3(5), pp. 1662-1665 [in Russian].
25. 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. & Niu-tin, Yu.I. (1981). The modification of proline estimation method for detection drought

- tolerant forms of genus *Lycopersicon* Tourn. *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR*, No. 4, pp. 55-60 [in Russian].
26. Mattioni, C., Lacerenza, N.G., Troccoli, A., de Leonardi, A.M. & di Fonzo, N. (1997). Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant*, 101, pp. 787-792. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.tb01064.x>
 27. Dospikhov, B.A. (1985). *Methods of field experiment*. Moscow: Agropromizdat [in Russian].
 28. Morgun, V.V. (2001). Problems of genetics and plant breeding in Ukraine at the turn of the millennium. *Fiziologia i biokhimiya kult. rastenii*, 33, No. 5, pp. 452-455 [in Ukrainian].
 29. Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I. & Kurchii, V.M. (2020). Priority level of stiffness up to water deficiency T3 generation of biotechnological winter wheat growths (*Triticum aestivum* L.). *Zbirnyk naukovykh prats. Biologichni doslidzhennya. Zhytomyr*, pp. 340-343 [in Ukrainian].
 30. Pat. 97229 UA, IPC A01H 1/04, A01H 4/00, Method of selection of transgenic plants with increased level of resistance to water stress, Sergeeva, L.E., Komisarenko, A.G., Mychalska, S.I., Tishchenko, O.M., Publ. 10.03.2015 [in Ukrainian].
 31. Marenkova, T., Deineco, E. & Shumny, V. (2007). Mosaic expression pattern of the nptII gene in transgenic tobacco plants Nu 21. *Russ. J. Genet.*, 43, No. 7, pp. 780-790. <https://doi.org/10.1134/S1022795407070101>
 32. Mani, S., Van de Cotte, B., Van Montagu, M. & Verbruggen, N. (2002). Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128, No. 1, pp. 73-83. <https://doi.org/10.1104/pp.010572>
 33. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Yoshitaka Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461, No. 3, pp. 205-210. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01451-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01451-9)
 34. Vij, S. & Tyagi, A. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.*, 3, pp. 361-380. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x>
 35. Sergeeva, L.E., Mykhalska, S.I., Kurchiy, V.M. & Tishchenko, E.N. (2015). Free proline content in maize seedlings as an indicator of rapid responses to lethal osmotic stress in vitro. *Fiziol. rast. genet.*, 47, No. 6, pp. 491-496 [in Ukrainian].

Received 17.09.2020

OSMOTOLERANCE OF T4 GENERATION MONOCOTYLEDONOUS AND DICOTYLEDONOUS PLANTS WITH SUPPRESSED EXPRESSION OF PROLINE CATABOLISM GENE

A.G. Komisarenko, S.I. Mykhalska, V.M. Kurchii

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

Analysis of transgene function retention in seed generation (T4) of genetically modified plants of maize, wheat and sunflower was carried out. It was shown that about 80–85 % of seeds of plants created by the biotechnological method had the ability to germinate under conditions of water deficiency and salinization, while in plants of the original forms this index was 20–28 %. Variability in transgene expression among individual variants of the seed generation of genetically modified forms was noted. Almost 65 % of T4 seedlings of corn and wheat withstood the conditions of super hard osmotic stress created by adding 0,8 M mannite to the culture medium, which was lethal to the original forms. Progenies of transgenic plants were also characterized by an increased level of resistance to drought created by

the water cessation, which was manifested in the indices of growth processes. At the stage of restoration after the action of prolonged dehydration, the biotechnological plants of sunflower were 17 cm higher than the original form and had 1.5 times larger biomass. Maintaining the viability of genetically modified plants under hard stressful conditions was associated with an increase in the level of free *L*-proline (Pro). Genetically modified plants had 1.5–2 times higher Pro content compared to the original form both under normal moisture supply and under its deficiency, which may result from partial suppression of the proline dehydrogenase (*PDH*, *pdh*) gene. It was found that under normal growth conditions, the activity of the PDH enzyme in transgenic T4 maize and sunflower seedlings was almost 3 times lower than in the original forms, while for wheat, this difference was 1.6 times. The tendency to lower relatively to control PDH activity in the T4 generation of the studied representatives of transgenic monocotyledonous and dicotyledonous plants was observed at all stages of growth.

Key words: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L., genetic modification, seed generation, proline dehydrogenase, proline, osmotic resistance.