

<https://doi.org/10.15407/frg2023.01.058>

УДК 581.132:633.11

## ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З НАДЕКСПРЕСІЄЮ ГЕНА ОРНІТИН- $\delta$ -АМІНОТРАНСФЕРАЗИ

О.В. ДУБРОВНА, Г.О. ПРЯДКІНА, С.І. МИХАЛЬСЬКА, А.Г. КОМІСАРЕНКО

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

Орнітин- $\delta$ -амінотрансфераза (ОАТ) — важливий регулятор клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує низку біохімічних систем. Введення екзогенного гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази (*oat*) у геном рослини є одним із перспективних методів створення стійких до абіотичних стресів генотипів пшениці. Метою нашої роботи було визначення фізіолого-біохімічних характеристик трансгенних рослин нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці насінневого покоління T2 з надекспресією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази за нормальних і стресових умов. Досліджено активність ферменту, вміст вільного проліну, вміст фотосинтетичних пігментів і морфометричні показники. Показано, що наявність у трансгенних рослин додаткової копії гена *oat* підвищує активність ферменту орнітин- $\delta$ -амінотрансферази (в 1,5—1,7 раза порівняно з вихідними рослинами), але вони істотно не відрізняються від рослин вихідних генотипів за вмістом вільного *L*-проліну ні за нормальних умов, ні за умов водного дефіциту. Виявлено, що у стресових умовах у період виходу в трубку—цвітіння генетично змінені рослини насінневого покоління T2 зберігали вищий сумарний вміст хлорофілів (у середньому на 10 %), порівняно з вихідними генотипами, тоді як за нормальних умов — різниця між ними була незначною. За посухи також встановлено збільшення співвідношення каротиноїдів і хлорофілів у вихідних генотипах, порівняно з трансгенними рослинами. Порівняльний аналіз морфометричних показників головного пагона у фазу повної стиглості показав, що за фізіологічних умов рослини трансгенних ліній не відрізнялися від рослин вихідних генотипів за довжиною колоса, проте переважали їх за висотою стебла головного пагона і довжиною коренів.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum*, трансгенні рослини, ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази, ґрунтова посуха, пролін, фотосинтетичні пігменти, ростові параметри.

Пшениця є однією з основних продовольчих культур світу, яку вирощують на понад 17 % орних земель і споживає близько 40 % населення світу [1]. Поширеність цієї культури зумовлена її високою біологічною пластичністю щодо екологічних умов і насамперед висо-

Цитування: Дубровна О.В., Прядкіна Г.О., Михальська С.І., Комісаренко А.Г. Фізіолого-біохімічні характеристики трансгенних рослин озимої пшениці з надекспресією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 1. С. 58—73. <https://doi.org/10.15407/frg2023.01.058>

кою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів. Незважаючи на загалом зростаючу тенденцію виробництва пшениці у світі, кліматичні зміни, що характеризуються підвищенням температури повітря, зменшенням опадів або зливами, збільшенням частоти й тривалості посух, істотно позначаються на її врожайності. Створення високоврожайних сортів з високим адаптивним потенціалом, зокрема стійких до посухи, може стати однією зі стратегій упередження негативного впливу змін кліматичних умов на продуктивність озимої пшениці.

Сучасним напрямом створення посухостійких сортів пшениці є застосування методів генетичної інженерії. Останнім часом інтенсивно розробляють новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів, шляхом інтеграції у геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості [2, 3]. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, досягнутий в останні десятиліття у галузі фундаментальних досліджень структурно-функціональної геноміки, теоретичних і практичних аспектів генетичної трансформації злаків [4].

Для генетичного удосконалення пшениці залучають біотехнології, пов'язані з використанням генів, які контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин — органічних молекул, здатних у великих концентраціях накопичуватися у клітинах рослин за умов стресу і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації. Одним із найперспективніших підходів є ідентифікація та використання генів, що контролюють синтез і катаболізм проліну [5—8]. Крім добре відомої функції інертного сумісного осмоліту він за дії стресорів також виконує низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів [9—12], є джерелом енергії, азоту й вуглецю [13]. Додатковий синтез цієї амінокислоти підвищує загальну стійкість рослин до абіотичних стресів.

Під час пошуку шляхів посилення акумуляції вільного проліну значну увагу приділяють дослідженню генів, що контролюють лімітувальні ензими його синтезу та деградації [14]. Використовують додаткове введення копій кДНК, відповідальних за синтез вільного проліну (P5KS або  $\delta$ -OAT у сенсовій орієнтації) або часткову супресію ендегенних генів проліндегідрогенази (ProDH), які відповідають за його деградацію [5, 15, 16].

Ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази (*oat*) кодує фермент OAT (EC 2.6.1.13), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням піролін-5-карбоксилату (P5K) і глутамату [17, 18]. Ця реакція є частиною системи взаємоперетворень таких амінокислот, як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Їх метаболізм пов'язаний з фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресорів, регуляцією процесів росту й розвитку [19—23]. Тому орнітин- $\delta$ -амінотрансфераза може бути важливим регулятором

клітинного метаболізму, оскільки реакція, яку він каталізує, пов'язує кілька біохімічних систем.

За літературними даними, ген *oat* бере участь у відповіді на стрес, але конкретна його біологічна роль до кінця ще не визначена [20]. Вважають, що орнітин- $\delta$ -амінотрансфераза бере участь у синтезі проліну під час стресу [19, 23]. Нещодавно виявлено, що фермент ОАТ функціонує в альтернативному шляху метаболізму проліну в мітохондріях за стресових умов [19]. Встановлена взаємодія генів *AtOAT* у ліній гексаплоїдної пшениці з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу проліну та катаболізмом аргініну, підтверджує, що вони беруть участь у синтезі проліну та ремобілізації азоту [5]. Крім цього, орнітин є проміжною сполукою у біосинтезі аргініну, де шлях розходиться з утворенням проліну та поліамінів, що залучені у дуже багато функцій рослин, у тому числі пов'язаних з адаптацією до дії стресових чинників [24, 25].

Припущення, що ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази пов'язаний з синтезом проліну підтверджують результати експериментів, отриманих на генетично модифікованих рослинах. Так, рослини рису з підвищеною експресією гена *oat* накопичують більше проліну, ніж не-трансгенні [26]. Також надекспресія цього гена посилювала рівень стійкості трансгенних рослин тютюну до посухи і засолення [27]. Проте є дані, які засвідчують, що ОАТ безпосередньо не впливає на накопичення цієї амінокислоти [28, 29]. Зокрема, за умов стресу у мутантних рослин арабідопсису, дефіцитних за ОАТ, рівень проліну не відрізнявся від значень у контрольних рослин [28].

Нині з'являються дослідження із введення екзогенного гена *oat* у геном пшениці [5, 30–32]. Встановлено, що трансгенні рослини пшениці з надекспресією *AtOAT* характеризуються підвищеною толерантністю до стресів (водного дефіциту, засолення) [5]. Автори показали, що власні *TaOAT* гени брали участь у синтезі цієї амінокислоти та ремобілізації азоту, оскільки вони взаємодіяли з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу проліну та катаболізмом аргініну. Встановлено також, що експресія *AtOAT* посилює посухостійкість пшениці й толерантність до засолення не лише за рахунок збільшення біосинтезу проліну, а й регуляції антиоксидантної системи [5]. У цих трансгенних рослин з надекспресією гена *AtOAT* за дії стресорів виявлено також активацію глутаматного шляху й підвищену експресію генів *TaP5CS1* і *TaP5CR* [5].

Ми отримали генетично модифіковані рослини нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці насінневого покоління T2 з надекспресією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* [33]. Відомо, що у результаті генетичної трансформації фізіологічні й біохімічні характеристики рослин можуть змінюватись, причому як прогнозовано (у разі перенесення гена, відповідального за змінювану ознаку), так і не прогнозовано (у випадку перенесення гена, відповідального за іншу ознаку) [3].

У зв'язку із цим, мета нашої роботи полягала у визначенні фізіолого-біохімічних характеристик трансгенних рослин нових пер-

спективних генотипів озимої м'якої пшениці насінневого покоління T2 з надекспресією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази за нормальних і стресових умов.

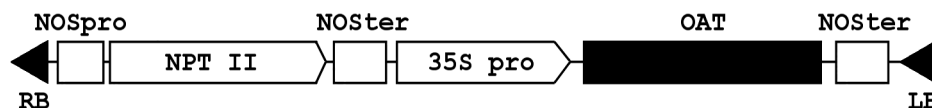
### Методика

Матеріалом досліджень слугували 3 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці — Ук 95/17, Ук 209h, Ук 322/17. Генетичну трансформацію проводили з використанням штаму виду *Agrobacterium tumefaciens* — AGL0, що містить бінарний вектор pBi-OAT з цільовим геном орнітин- $\delta$ -амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний — неоміцинофосфотрансферази II (*nrII*) *Esheria coli* (рисунок).

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду шляхом інокуляції кастрованих суцвіть. Для трансформації обирали колоси завдовжки 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка, середня довжина колоса становила 6,2 см. До початку цвітіння виконували кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожен колос одягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу і етикетували.

Інокуляцію суспензією агробактерій проводили через 3 доби після кастрації, приймочки маточок обробляли нею за допомогою автоматичного дозатора. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* готували за модифікованою методикою Сидорова [34]. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. За повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колоса тієї самої рослини.

З рослин насінневого покоління T1 шляхом самозапилення отримали насіннєве покоління T2, яке перевіряли на наявність трансгенів методом ПЛР. Екстракцію ДНК з листків рослин робили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v. 1.35. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакційні суміші включали: специфічні праймери, 2 мкл буфера для ПЛР 10×DreamTaq™ Green-Buffer (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл



Блок-схема бінарного вектора pBi-OAT:

LB, RB — лівий і правий бордери T-ДНК; NOSpro, NOSter — промотор і термінатори нопалінсинтази; *nrII* — ген неоміцинофосфотрансферази II *Esheria coli*; 35Spro — промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); OAT — ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази *Medicago truncatula*

деіонізованою водою Milli-Q. Наявність гена *oat* визначали з використанням праймерів 5'-CAGTGCCCAACAATTACCATCC-3' (RTF) та 5'-CGAACTTCTTCCCAATCACAAGCCA-3' (RTR). Очікувана довжина амплікону становить 708 пн.

Для вивчення фізіолого-біохімічних ознак рослин в умовах вегетаційного досліду використовували трансгенні рослини насінневого покоління T2. Насіння T2 висіяли восени на огороженій ділянці ґрунту, а навесні пересадили у вегетаційні посудини об'ємом 10 л, наповнені однаковим об'ємом ґрунтосуміші. Ґрунт для вирощування брали однорідний, попередньо вимішували, просіювали через сито з діаметром отворів 3 мм. У половині посудин вихідні й трансгенні рослини вирощували за умов нормального поливу — 70 % повної вологості (ПВ). У іншій половині посудин у фазу виходу в трубку рослини піддавали дії водного стресу: припиненням поливу вологість ґрунту зменшували до 40 % ПВ та підтримували на цьому рівні протягом 10 діб. Після чого відновлювали полив і до збору врожаю рослини дослідних варіантів поливали тією самою кількістю води, що й контрольні варіанти.

Середню пробу для визначення біохімічних показників формували з 5 прапорцевих листків окремих рослин. Повторність визначення — п'ятиразова. Активність орнітин- $\delta$ -амінотрансферази, вміст вільного проліну та фотосинтетичних пігментів визначали на 10-ту добу від початку посухи.

Вміст вільного проліну в листках встановлювали за методикою Чинарда, що ґрунтується на утворенні забарвленого продукту взаємодії *L*-проліну з нінгідринним реактивом, з модифікаціями [35]. Активність орнітин- $\delta$ -амінотрансферази оцінювали за [36] і обчислювали як кількість ферменту, необхідну для отримання 1 нмоль П5К за хвилину (1 U) у перерахунку на 1 мг білка.

Вміст фотосинтетичних пігментів визначали у прапорцевих листках озимої пшениці. Вміст хлорофілів *a* і *b* та загальних каротиноїдів оцінювали безмацераційним методом шляхом екстракції пігментів із висічок диметилсульфоксидом (ДМСО) за методом Wellburn [37]. Для цього 100 мг наважки (усередненої з прапорцевих листків 5 рослин) заливали 10 мл ДМСО. Потім пробірки поміщали на водяну баню (температура води 60 °С) на 4 год, 0,5 мл отриманого розчину розбавляли 4,5 мл ДМСО і визначали оптичну густину цього розчину на спектрофотометрі Specord 200 (AnalyticJena, Germany) за довжин хвиль 480, 649 і 665 нм. Вміст пігментів на 1 г сухої речовини обчислювали з урахуванням усіх розведень і маси листків.

Морфометричні показники контрольних і генетично-модифікованих генотипів визначали на 10 окремих рослинах у фазу повної стиглості зерна. Довжину коренів вимірювали після очищення їх від ґрунту.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням Microsoft Excel. У таблицях і на рисунку результати наведені у вигляді середніх значень та стандартної похибки середнього ( $m \pm SE$ ). Різницю між даними вважали достовірною за  $p \leq 0,05$ .

### Результати і обговорення

Для того щоб безпосередньо оцінити, якою мірою введена конструкція підвищує експресію гена *oat*, проводили дослідження активності цього ферменту в листках трансформантів покоління T2 і у контрольних рослин вихідних генотипів (табл. 1). Встановлено, що у варіанті, де вологість ґрунту підтримували на рівні 70 % ПВ, активність ОАТ у вихідних рослин у середньому становила  $0,46 \pm 0,09$  нмоль П5К/(хв · мг білка), у трансгенних генотипів була у середньому в 1,5 раза вищою —  $0,79 \pm 0,11$  нмоль П5К/(хв · мг білка). На 10-ту добу штучної посухи активність ОАТ і у контрольних, і у трансгенних рослин підвищилась приблизно в 1,5—1,7 раза порівняно з варіантом достатнього вологозабезпечення.

Водночас у трансгенних генотипів активність ферменту, як і у контролі, була вищою, ніж у вихідних рослин (у середньому в 1,5 раза). Отже, у трансгенних рослин порівняно з контролем спостерігали підвищення активності ОАТ як за достатнього вологозабезпечення, так і за водного дефіциту, що очевидно зумовлено експресією чужорідного гена.

За вмістом вільного проліну генетично змінені рослини характеризувались близькими значеннями з вихідними генотипами як за умов нормального поливу, так і за водного дефіциту. При цьому, за дії посухи і у вихідних, і у трансгенних рослин рівень *L*-проліну підвищувався приблизно у 3 рази, порівняно з відповідними контрольними варіантами (табл. 2). Таким чином, за збільшення активності ОАТ рівень вільного проліну значно не змінюється порівняно з

ТАБЛИЦЯ 1. Активність ферменту орнітин- $\delta$ -амінотрансферази у прапорцевих листках трансформантів покоління T2 і контрольних рослин вихідних генотипів за нормальних (70 % ПВ) і посушливих (40 % ПВ) умов ( $m \pm SE$ ,  $n = 5$ )

Генотип	Активність ферменту, нмоль П5К/(хв · мг білка)			
	Оптимальний полив		Посуха	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Ук 95/17	$0,47 \pm 0,09$	$0,81 \pm 0,11^*$	$0,72 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,15^{**}$
Ук 209h	$0,51 \pm 0,10$	$0,86 \pm 0,14^*$	$0,79 \pm 0,09$	$1,31 \pm 0,17^{**}$
Ук 322/17	$0,45 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,09^*$	$0,75 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,12^{**}$

Примітка. Тут і в табл. 3: Різниця з контролем вірогідна за  $p < 0,05$  (\*) і  $p < 0,01$  (\*\*).

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст вільного проліну в прапорцевих листках трансформантів покоління T2 і контрольних рослин вихідних генотипів за нормальних (70 % ПВ) і посушливих (40 % ПВ) умов ( $m \pm SE$ ,  $n = 5$ )

Генотип	Вміст вільного проліну, мг/г сирової речовини			
	Оптимальний полив		Посуха	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Ук 95/17	$0,307 \pm 0,025$	$0,313 \pm 0,026$	$0,859 \pm 0,078$	$0,903 \pm 0,081$
Ук 209h	$0,221 \pm 0,021$	$0,246 \pm 0,023$	$0,663 \pm 0,071$	$0,704 \pm 0,072$
Ук 322/17	$0,243 \pm 0,023$	$0,254 \pm 0,027$	$0,680 \pm 0,072$	$0,706 \pm 0,073$

вихідним генотипом. З'ясовано, що введення генетичної конструкції, яка підвищує експресію гена *oat*, не приводить до істотної зміни вмісту вільного проліну в листках рослин ні в нормальних умовах, ні за посухи.

Важливість оцінювання стану пігментного апарату у генетично змінених рослин зумовлена виявленням у низці досліджень позитивної кореляції між вмістом хлорофілу і зерною продуктивністю пшениці [38—40]. Ми проаналізували зміни вмісту й співвідношення фотосинтетичних пігментів у трансформантів і рослин вихідних генотипів за фізіологічних і стресових умов.

За нормальних умов сумарний вміст хлорофілів (*a+b*) у прапорцевих листках як вихідних, так і трансгенних генотипів варіював у близьких межах (табл. 3). Водночас, за дії посухи у модифікованих рослин сумарний вміст хлорофілів був у середньому для трьох ліній на 10 % вищим, ніж у вихідних за тих самих умов. Крім цього, його вміст у вихідних генотипів, які зазнали дії посухи, зменшився на 12—17 %, порівняно з нормальними умовами, тоді як у трансгенних ліній істотної різниці за таких умов не було виявлено.

Співвідношення хлорофілів *a/b* між вихідними і трансгенними лініями також не відрізнялося ні за нормальних, ні за посушливих умов (див. табл. 3). Це пов'язано з тим, що різниця за вмістом окремих форм хлорофілів між модифікованими та вихідними рослинами не була виявлена (дані не представлені).

ТАБЛИЦЯ 3. Вміст і співвідношення фотосинтетичних пігментів у прапорцевих листках рослин трансформантів покоління T2 і у контрольних рослин вихідних генотипів за нормальних (70 % ПВ) і посушливих (40 % ПВ) умов ( $m \pm SE$ ,  $n = 5$ )

Генотип	Оптимальний полив		Посуха	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Вміст сумарного хлорофілу, мг/г сухої речовини				
Ук 95/17	8,99±0,34	8,95±0,15	7,87±0,23	8,45±0,26*
Ук 209h	9,25±0,19	9,33±0,09	7,88±0,36	8,79±0,33*
Ук 322/17	9,36±0,33	9,38±0,29	7,81±0,26	8,71±0,30**
Співвідношення хлорофілів <i>a/b</i>				
Ук 95/17	3,23±0,03	3,17±0,10	3,17±0,03	3,17±0,03
Ук 209h	3,07±0,04	3,14±0,04	3,13±0,05	3,13±0,05
Ук 322/17	3,13±0,08	3,06±0,01	3,13±0,04	3,13±0,04
Вміст загальних каротиноїдів, мг/г сухої речовини				
Ук 95/17	1,84±0,06	1,84±0,05	1,85±0,04	1,90±0,07
Ук 209h	1,86±0,03	1,92±0,02	1,92±0,06	1,97±0,07
Ук 322/17	1,90±0,08	1,89±0,05	1,86±0,07	1,93±0,06
Співвідношення каротиноїдів до хлорофілів ( <i>a+b</i> )				
Ук 95/17	0,21±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,22±0,01
Ук 209h	0,20±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,22±0,01*
Ук 322/17	0,20±0,01	0,20±0,01	0,24±0,01	0,22±0,01*

Вміст загальних каротиноїдів коливався у межах 1,84—1,97 мг/г сухої речовини листка та істотно не відрізнявся між вихідними і трансгенними генотипами (див. табл. 3).

Збільшення вмісту каротиноїдів у рослин вихідних генотипів за дії посухи на фоні зменшення у них вмісту хлорофілу привело до збільшення співвідношення каротиноїдів до хлорофілів як за нормальних умов, так й порівняно з трансгенними рослинами, що зазнали дії посухи (див. табл. 3).

Отже, виявлено, що генетично змінені рослини насінневого покоління T2 за нормальних умов не відрізнялися від вихідних ліній за сумарним вмістом хлорофілів, тоді як за умов посухи — зберігали вищий, ніж у них, вміст хлорофілу. За умов посухи також встановлено збільшення співвідношення каротиноїдів до хлорофілів у вихідних ліній порівняно з трансгенними рослинами, що зазнали дії посухи.

Порівняльний аналіз морфометричних показників головного пагона у фазу повної стиглості показав, що за нормальних умов рослини трансгенних ліній не відрізнялися від вихідних за довжиною колоса, але переважали їх за висотою головного пагона і довжиною коренів (табл. 4). За довжиною стебла генетично-модифіковані рослини перевищували рослини вихідних генотипів у середньому на 7 см, за довжиною коренів — на 4 см.

В умовах посухи різниця за висотою рослин між трансгенними і вихідними варіантами становила у середньому 10 см, за довжиною коренів — 3 см на користь генетично модифікованих ліній (див. табл. 4). За довжиною колоса, як і для нормальних умов, не було виявлено істотної різниці між рослинами T2 і вихідними лініями.

ТАБЛИЦЯ 4. Рістові показники головного пагона рослин трансформантів покоління T2 і контрольних рослин вихідних генотипів за нормальних (70 % ПВ) і посушливих (40 % ПВ) умов ( $m \pm SE$ ,  $n = 10$ )

Генотип	Оптимальний полив		Посуха	
	Контроль	Трансформанти	Контроль	Трансформанти
Висота рослин, см				
Ук 95/17	89,2±3,0	95,4±2,0*	74,2±4,0	82,4±2,8*
Ук 209h	91,9±3,7	99,7±3,2*	76,7±3,4	87,7±3,1*
Ук 322/17	95,5±2,7	103,0±4,2*	79,1±3,9	89,0±4,2*
Довжина колоса, см				
Ук 95/17	8,96±0,66	9,38±0,70	7,85±0,64	8,65±0,75
Ук 209h	9,16±0,86	9,62±0,67	8,21±0,71	8,73±0,65
Ук 322/17	9,30±0,65	9,84±0,67	8,30±0,71	8,98±0,71
Довжина коренів, см				
Ук 95/17	7,4±0,6	11,6±0,7*	6,2±0,5	9,7±0,4*
Ук 209h	8,3±0,5	12,2±1,0*	7,5±0,6	10,8±0,6*
Ук 322/17	9,8±0,5	14,4±1,2*	8,7±0,7	12,6±0,8*

Примітка. Різниця з контролем вірогідна за  $p < 0,05$  (\*).



Таким чином, проведені дослідження трансгенних рослин нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці насінневого покоління Т2 з надекспресією гена *oat* за нормальних і стресових умов виявили їх певні відмінності за фізіолого-біохімічними та морфометричними показниками від вихідних генотипів. Показано, що наявність у генетично змінених рослин додаткової копії гена *oat* підвищує активність ферменту орнітин- $\delta$ -амінотрансферази (у середньому в 1,5–1,7 раза порівняно з вихідними рослинами), при цьому за вмістом вільного *L*-проліну вони істотно не відрізняються від вихідних генотипів ні за нормальних умов, ні за умов водного дефіциту. Більша активність ОАТ спостерігається у трансгенних ліній як за достатнього забезпечення вологою, так і її дефіциту, що, очевидно, зумовлено експресією трансгена.

Встановлений нами факт, що збільшення активності ферменту за нормальних умов не впливає на рівень проліну, а в умовах стресу збільшується рівень і проліну, і активність ферменту, свідчить на користь припущення, що не збільшення активності ОАТ приводить до накопичення проліну, а, навпаки, підвищений рівень амінокислоти індукує активність ферменту [41].

Роль ОАТ у підтриманні стійкості рослин до осмотичних стресів і акумуляції проліну до кінця не визначена, а наявна інформація з цього питання досить суперечлива, проте в літературі є окремі припущення щодо можливого механізму його дії. Так, у низці досліджень показано, що цей фермент каталізує перетворення деяких амінокислот (у тому числі й проліну), пов'язаних зі стійкістю до різних абіотичних стресів, регуляцією процесів росту та розвитку [19, 29]. Також вважають, що підвищений рівень проліну за дії стресових чинників може бути зумовленим активністю ОАТ, оскільки фермент задіяний у біосинтезі і накопиченні проліну альтернативним шляхом (через П5К) і є способом регулювання осмолярності клітин у відповідь на осмотичний стрес [9, 17, 19].

Деякі дослідники підтримують концепцію про істотну роль ОАТ у рециркуляції азоту через шлях аргініну, що не пов'язано з біосинтезом проліну [28, 29]. Орнітин є важливим для засвоєння вуглецю і азоту, що сприяє збільшенню продуктування біомаси та стійкості рослин до абіотичних стресів [21]. У зв'язку з цим цілком ймовірно, що збільшене накопичення орнітину в рослинах з надекспресією гена *oat* пов'язане з продукцією пулу захисних сполук, що приводить до підвищення толерантності. Крім цього, його вважають попередником таких протекторних і регуляторних сполук, як поліаміни, які залучені в дуже багато функцій рослин, у тому числі пов'язаних з адаптацією до дії стресових чинників. Захисні ефекти поліамінів можуть бути зумовлені стабілізацією макромолекул (білків, нуклеїнових кислот) і мембранних структур, прямою дією як скавенджерів кисневих радикалів і можливих інгібіторів НАДФН-оксидази [25]. Як ймовірні сигнальні сполуки вони можуть індукувати антиоксидантні ферменти [25].

Вищий вміст хлорофілу за дії посухи вважають ознакою генотипів пшениці, толерантних до дії цього стресу [40, 42, 43]. Зокрема

показано, що вміст хлорофілу в листках рослин вихідного сорту Tugela, на 7-му, 14-ту і 21-шу доби посухи зменшувався істотніше, ніж у мутантних рослин з підвищеною стійкістю до посухи, отриманих шляхом хімічного мутагенезу [43]. Тому виявлене нами збереження сумарного вмісту хлорофілів ( $a+b$ ) у прапорцевих листках трансгенних ліній за умов посухи порівняно з вихідними генотипами може свідчити про їх кращу посухостійкість.

Важливою характеристикою стану фотосинтетичного апарату рослин є співвідношення жовтих і зелених пігментів. Підвищене співвідношення каротиноїдів і хлорофілів, на яке вказує більший вміст каротиноїдів у пулі фотосинтетичних пігментів у рослин вихідних генотипів за дії посухи (див. табл. 3), може свідчити про необхідність посилення захисту світлозбиральних комплексів фотосистеми. Навпаки, близькі величини цього співвідношення у рослин T2 з надекспресією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази за умов посухи та нормальних умов можуть підтверджувати їх кращу адаптацію до стресу.

Встановлено, що підвищена експресія гена *oat* впливає на ріст рослин і розвиток кореневої системи. Біотехнологічні рослини з додатковою копією гена *oat* відрізнялись вірогідно більшими значеннями висоти стебла (різниця становила до 10 см). Крім того, вони характеризувались розвиненішою кореневою системою, що підтверджує участь ОАТ у ростових процесах. Збільшення довжини коренів у генетично модифікованих рослин сприяє кращій адаптації рослин до умов посухи, оскільки рослини з добре розвинутою кореневою системою можуть мати переваги у забезпеченні водою і поживними речовинами порівняно з рослинами з короткими коренями [44].

Проведений фізіолого-біохімічний аналіз генетично модифікованих рослин м'якої озимої пшениці насінневого покоління T2 з гетерологічним геном орнітин- $\delta$ -амінотрансферази засвідчив, що рослини відрізняються підвищеною активністю ферменту ОАТ як за нормальних, так і стресових умов. Встановлено, що введення генетичної конструкції, яка збільшує експресію гена *oat*, не приводить до істотної зміни рівня вільного проліну в листках рослин ні в нормі, ні за дії ґрунтової посухи. Показано, що введення в геном рослин пшениці генетичної конструкції, яка підсилює експресію гена *oat*, стимулює ріст коренів, а це сприяє кращій здатності рослин до зростання за водного дефіциту. Збільшення висоти стебла і розвиненіша коренева система впливають на адаптаційну пластичність і врожайність генетично модифікованих рослин.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Shewry P.R. Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2009. **60**, N 6. P. 1537–1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
2. Wang K., Liu H., Du L., Ye X. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an Agrobacterium-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnology Journal*. 2017. **15**. P. 614–623. <https://doi.org/10.1111/pbi.12660>
3. Joshi R., Anwar K., Das P., Singla-Pareek S., Pareek A. Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. *Wheat Biotechnology*.

- Springer: New York. 2017. **1679**. P. 83–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5)
4. Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. **7**, N 5. P. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
  5. Anwar A., Wang K., Wang J. Expression of *Arabidopsis ornithine* aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Reports*. 2021. **40**, N 7. P. 1155–1170. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02699-0>
  6. Arabia S., Shah M., Sami A., Ghosh A., Islam T. Identification and expression profiling of proline metabolizing genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* to reveal their stress-specific transcript alteration. *Physiology Molecular Biology of Plants*. 2021. **27**, N 7. P. 1469–1485. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01023-0>
  7. Dubrovna O.V., Stasik O.O., Priadkina G.O. Zborivska O.V., Sokolovska-Sergiienko O.G. Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricultural Science and Practice*. 2020. **7**, N 2. P. 24–34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
  8. Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Курчій В.М. Гени метаболізму проліну в біотехнології підвищення осмотійкості пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2021. **28**. С. 94–99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
  9. Ghosh U.K., Islam M.N., Siddiqui M.N., Cao X., Khan M.A.R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*. 2022. **24**, N 2. P. 227–239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
  10. Hossain M.A., Hoque M.A., Burritt D.J., Fujita M. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. *Oxidative Damage to Plants. Antioxidant Networks and Signaling*: Ahmad P. (ed.). Academic Press is an imprint of Elsevier. 2014. P. 477–521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
  11. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Пролін: фізіологічні функції і регуляція вмісту в рослинах в стресових умовах. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2014. **2**, № 32. С. 6–22. <https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/9047>
  12. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Andleeb Z., Vaishali S., Mukesh Y., Upadhyay R. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*. 2019. **5**, N 12. P. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
  13. Mansour M.M.F., Ali E.F. Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry*. 2017. **140**. P. 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
  14. 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. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
  15. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D., Pereira L., Vieira L. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo*. *Molecular Biology Reports*. 2013. **40**. P. 3269–3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
  16. Chen C., Cui X., Zhang P., Wang Z., Zhang J. Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021. **168**. P. 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.004>
  17. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine amino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biology*. 2020. **20**. P. 187. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2>
  18. Stranska J., Kopečný D., Kopečná M., Snýgaroff J., Sebelá M. Biochemical characterization of pea ornithine- $\delta$ -aminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*. 2010. **92**, N 8. P. 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.026>
  19. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. **19**. P. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>

20. Szabados L., Savoure A. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2009. **15**. P. 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
21. Liu C., Xue Z., Tang D., Shen Y., Shi W., Ren L., Du G., Li Y., Chenget Z. Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant Journal*. 2018. **96**, N 4. P. 842–854. <https://doi.org/10.1111/tpj.14072>
22. Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*. 2011. **157**. P. 292–304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
23. Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. **19**. P. 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
24. Kalamaki M.S., Merkouropoulos G., Kanellis A.K. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in Arabidopsis? *Plant Signaling Behavior*. 2009. **4**, N 11. P. 1099–1101. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9873>
25. Колупаев Ю.Е., Кокорев О.И. Участие полиаминов в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза растений. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2019. **1**, № 46. С. 6–22. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
26. Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Zhang W., Qu L., Chen Z. Over-expression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Science Bulletin*. 2003. **48**, N 23. P. 2594–2600. <https://link.springer.com/article/10.1360/03wc0218>
27. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding*. 2002. **9**, N 2. P. 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1026791932238>
28. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology*. 2008. **8**, N 1. P. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
29. Герасимова С.В., Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Романова А.В., Коваль В.С., Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансформанты табака, экспрессирующие кДНК орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*. *Русский журнал генетики*. 2010. **46**, № 7. С. 1000–1003. <https://doi.org/10.1134/S102279541007015X>
30. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці in planta з використанням гена орнітинамінотрансферази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. **17**. С. 131–135. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/177493>
31. Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М. Продуктивність рослин пшениці озимої з додатковою копією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази в умовах водного дефіциту. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. **25**. С. 247–252. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171>
32. Dubrovna O.V., Priadkina G.O., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G. Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene. *Agricultural Science and Practice*. 2021. **8**, N 1. P. 25–39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
33. Сливка Л.В., Дубровна О.В. Генетична трансформація перспективних генотипів озимої м'якої пшениці методом in planta. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2021. **28**. С. 106–111. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1384>
34. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods in Molecular Biology*. 2009. **526**. P. 47–58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)
35. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973. **39**. P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
36. Madan S., Nainawatee H.S., Jain R.K., Chowdhury J.B. Proline and proline metabolizing enzymes in-vitro selected NaCl-tolerant. *Annals of Botany*. 1995. **76**, N 1. P. 51–57. <https://www.jstor.org/stable/42764614>
37. Wellburn A.P. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 1994. **144**, N 3. P. 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

38. Barutcular C., Yildirim M., Koc M., Akinci C., Toptas I., Albayrak O., Tanrikulu A., El Sabagh A. Evaluation of SPAD chlorophyll in spring wheat genotypes under different environments. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2016. **25**, N 4. P. 1258–1266 ref.35
39. Yasir T.A., Wasaya A., Hussain M., Ijaz M., Farooq M., Farooq O., Nawaz A., Hu Y.G. Evaluation of physiological markers for assessing drought tolerance and yield potential in bread wheat. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2019. **25**, N 5. P. 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00694-0>
40. Javed A., Ahma N., Ahmed J., Hameed A., Ashra M.A., Zafar S.A., Maqbool A., Al-Amrah H., Alatawi H.A., Al-Harbi M.S., Ali E.F. Grain yield, chlorophyll and protein contents of elite wheat genotypes under drought stress. *Journal of King Saud University – Science*. 2022. **34**, N 7. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102279>
41. Sharma S., Verslues P.E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a pre-dominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant, Cell & Environment*. 2010. **33**, N 11. P. 1838–1851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02188.x>
42. Ahmed H.G.M.-D., LI M.-j., Khan S.H., Kashif M. Early selection of bread wheat genotypes using morphological and photosynthetic attributes conferring drought tolerance. *Journal of Integrative Agriculture*. 2019. **18**, N 11. P. 2483–2491. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62083-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62083-0)
43. le Roux M.L., Burger N.F.V., Vlok M., Kunert K.J., Cullis C.A., Botha A-M. Wheat Line «RYNO3936» Is associated with delayed water stress-induced leaf senescence and rapid water-deficit stress recovery. *Frontiers in Plant Science*. 2020. **11**. P. 1053. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01053>
44. Yue Z., Shen Y., Chen Y., Liang A., Chu C., Chen C., Sun Z. Microbiological insights into the stress-alleviating property of an endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 in wheat under low-phosphorus and high-salinity stresses. *Microorganisms*. 2019. **7**, N 11. P. 508. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110508>

Отримано 06.03.2023

#### REFERENCES

1. Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60, No. 6, pp. 1537-1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
2. Wang, K., Liu, H., Du, L. & Ye, X. (2017). Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an Agrobacterium-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnology Journal*, 15, pp. 614-623. <https://doi.org/10.1111/pbi.12660>
3. Joshi, R., Anwar, K., Das, P., Singla-Pareek, S. & Pareek, A. (2017). Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. *Wheat Biotechnology*. Springer: New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5)
4. Hiei, Y., Ishida, Y. & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Frontiers in Plant Science*, 7, No. 5, p. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
5. Anwar, A., Wang, K. & Wang, J. (2021). Expression of Arabidopsis ornithine aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Reports*, 40, No. 7, pp. 1155-1170. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02699-0>
6. Arabia, S., Shah, M., Sami, A., Ghosh, A. & Islam, T. (2021). Identification and expression profiling of proline metabolizing genes in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa to reveal their stress-specific transcript alteration. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, No. 7, pp. 1469-1485. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01023-0>
7. Dubrovna, O.V., Stasik, O.O., Priadkina, G.O. Zborivska, O.V. & Sokolovska-Sergiienko, O.G. (2020). Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricultural Science and Practice*, 7, No. 2, pp. 24-34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
8. Mykhalska, S.I., Komisarenko, A.G. & Kurchii, V.M. (2021). Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability. *Fakty eksperymentalnoy*

- evolyutsiyi orhanizmiv, 28, pp. 94-99 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
9. Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X. & Khan, M.A.R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*, 24, No. 2, pp. 227-239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
  10. Hossain, M.A., Hoque, M.A., Burritt, D.J. & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. *Oxidative Damage to Plants. Antioxidant Networks and Signaling*: Ahmad P. (ed.). Academic Press is an imprint of Elsevier, pp. 477-521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
  11. Kolupaev, Yu.E., Vainer, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Seriya Biolohiia*, 2, No. 32, pp. 6-22 [in Russian]. <https://repo.btu.kharkov.ua//handle/123456789/9047>
  12. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Andleeb, Z., Vaishali, S., Mukesh, Y. & Upadhyay, R. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5, No. 12, p. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
  13. Mansour, M.M.F. & Ali, E.F. (2017). Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry*, 140, pp. 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
  14. Tishchenko, E.N. (2013). Genetic engineering with use of L-proline metabolism genes for increase the of plants osmotolerance. *Fyzyolohiya rastenyi y henetyka*, 45, No. 6, pp. 488-500 [in Ukrainian]. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
  15. Carvalho, K., Campos, M.K., Domingues, D., Pereira, L. & Vieira, L. (2013). The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Molecular Biology Reports*, 40, pp. 3269-3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
  16. Chen, C., Cui, X., Zhang, P., Wang, Z. & Zhang, J. (2021). Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168, pp. 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.004>
  17. Anwar, A., She, M., Wang, K. & Ye, X. (2020). Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine amino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biology*, 20, pp. 187-187. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2>
  18. Stranska, J., Kopecny, D., Kopecna, M., Snýgaroff, J. & Sebel, M. (2010). Biochemical characterization of pea ornithine- $\delta$ -aminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*, 92, No. 8, pp. 940-948. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.026>
  19. Anwar, A., She, M., Wang, K. & Ye, X. (2018). Biological roles of ornithine amino-transferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, p. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>
  20. Szabados, L. & Savoure, A. (2009). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, pp. 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
  21. Liu, C., Xue, Z., Tang, D., Shen, Y., Shi, W., Ren, L., Du, G., Li, Y. & Chenget, Z. (2018). Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant Journal*, 96, No. 4, pp. 842-854. <https://doi.org/10.1111/tpj.14072>
  22. Sharma, S., Villamor, J.G. & Verslues, P.E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*, 157, pp. 292-304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
  23. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. & Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, pp. 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
  24. Kalamaki, M.S., Merkouropoulos, G. & Kanellis, A.K. (2009). Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signal Behav*, 4, No. 11, pp. 1099-1101. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9873>
  25. Kolupaev, Y.E. & Kokorev, O.I. (2019). Participation of polyamines in regulation of redox homeostasis in plants. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universyte-*

- tu. *Seriia Biolohiia*, 1, No. 46, pp. 6-22 [in Russian]. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
26. Wu, L., Fan, Z., Guo, L., Li, Y., Zhang, W., Qu, L. & Chen, Z. (2003). Over-expression of an Arabidopsis  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Science Bulletin*, 48, No. 23, pp. 2594-2600. <https://link.springer.com/article/10.1360/03wc0218>
  27. Roosens, N.H., Bitar, F.A. & Loenders, K. (2002). Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding*, 9, No. 2, pp. 73-80. <https://doi.org/10.1023/A:1026791932238>
  28. Funck, D., Stadelhofer, B. & Koch, W. (2008). Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 8, No. 1, p. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
  29. Gerasimova, S.V., Kolodyazhnaya, Ya.S., Titov, S.E., Romanova, A.V., Koval', V.S., Kochetov, A.V. & Shumnyi, V.K. (2010). Tobacco transformants expressing the *Medicago truncatula* ornithine aminotransferase cDNA. *Russkyi zhurnal henetyky*, 46, No. 7, pp. 1000-1003 [in Russian]. <https://doi.org/10.1134/S102279541007015X>
  30. Goncharuk, O.M., Bovol A.V. & Dubrovna O.V. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of wheat with ornithine-aminotransferase gene by an in planta method. *Fakty eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmiv*, 17, pp. 131-135 [in Ukrainian]. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/177493>
  31. Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I. & Kurchii, V.M. (2019). Productivity of winter wheat plants with the additional copy of ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene under water deficit conditions. *Fakty eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmiv*, 25, pp. 247-252 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171>
  32. Dubrovna, O.V., Priadkina, G.O., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2021). Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene. *Agricultural Science and Practice*, 8, No. 1, pp. 25-39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
  33. Slyvka, L.V. & Dubrovna, O.V. (2021). Genetic transformation of promising genotypes of winter soft wheat by the in planta method. *Fakty eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmiv*, 28, pp. 106-111 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1384>
  34. Sidorov, V. & Duncan, D. (2009). Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods in Molecular Biology*, 526, pp. 47-58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)
  35. Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, pp. 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
  36. Madan, S., Nainawatee, H.S., Jain, R.K. & Chowdhury, J.B. (1995). Proline and proline metabolizing enzymes in-vitro selected NaCl-tolerant. *Annals of Botany*, 76, No. 1, pp. 51-57. <https://www.jstor.org/stable/42764614>
  37. Wellburn, A.P. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology*, 144, No. 3, pp. 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
  38. Barutcular, C., Yildirim, M., Koc, M., Akinci, C., Toptas, I., Albayrak, O., Tanrikulu, A. & El Sabagh, A. (2016). Evaluation of SPAD chlorophyll in spring wheat genotypes under different environments. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25, No. 4, pp. 1258-1266 ref.35.
  39. Yasir, T.A., Wasaya, A., Hussain, M., Ijaz, M., Farooq, M., Farooq, O., Nawaz, A. & Hu, Y.G. (2019). Evaluation of physiological markers for assessing drought tolerance and yield potential in bread wheat. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, No. 5, pp. 1163-1174. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00694-0>
  40. Javed, A., Ahmad, N., Ahmed, J., Hameed, A., Ashraf, M.A., Zafar, S.A., Maqbool, A., Al-Amrah, H., Alatawi, H.A., Al-Harbi, M.S. & Ali, E.F. (2022). Grain yield, chlorophyll and protein contents of elite wheat genotypes under drought stress. *Journal of King Saud University — Science*, 34, No. 7. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102279>
  41. Sharma, S. & Verslues, P.E. (2010). Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a pre-dominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant, Cell & Environment*, 33, No. 11, pp. 1838-1851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02188.x>

42. Ahmed, H.G.M.-D., LI, M.-J., Khan, S.H. & Kashif, M. (2019). Early selection of bread wheat genotypes using morphological and photosynthetic attributes conferring drought tolerance. *Journal of Integrative Agriculture*, 18, No. 11, pp. 2483-2491. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62083-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62083-0)
43. le Roux, M.L., Burger, N.F.V., Vlok, M., Kunert, K.J., Cullis, C.A. & Botha, A-M. (2020). Wheat line «RYNO3936» is associated with delayed water stress-induced leaf senescence and rapid water-deficit stress recovery. *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 1053. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01053>
44. Yue, Z., Shen, Y., Chen, Y., Liang, A., Chu, C., Chen, C. & Sun, Z. (2019). Microbiological insights into the stress-alleviating property of an endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 in wheat under low-phosphorus and high-salinity stresses. *Microorganisms*, 7, No. 11, p. 508. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110508>

Received 06.03.2023

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF TRANSGENIC WINTER WHEAT PLANTS WITH OVEREXPRESSION OF ORNITHINE- $\delta$ -AMINOTRANSFERASE GENE

*O.V. Dubrovna, G.O. Priadkina, S.I. Mykhalska, A.G. Komisarenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine  
e-mail: dubrovny@ukr.net

Ornithine- $\delta$ -aminotransferase may be an important regulator of cellular metabolism, as the reaction catalyzed by this enzyme links a number of biochemical systems. Introducing the exogenous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene (*oat*) into the plant genome is one of the promising methods of creating wheat genotypes resistant to abiotic stresses. The aim of this study has been to determine the physiological and biochemical characteristics of transgenic plants of new promising genotypes of winter soft wheat of the seed generation T2 with overexpression of the ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene under normal and stressful conditions. The enzyme activity, the free proline content, the photosynthetic pigments content and morphometric indicators were studied. It was shown that the presence of an additional copy of the *oat* gene in transgenic plants leads to an increase in the activity of the ornithine- $\delta$ -aminotransferase enzyme (by 1.5–1.7 times, compared to the original plants), but they do not significantly differ from the original genotypes in terms of the free of *L*-proline content neither under normal conditions nor under conditions of water deficit. It was found that under stressful conditions during period booting–anthesis, genetically modified plants of the seed generation T2 kept a higher total chlorophyll content (on average by 10 %) compared to the original genotypes, while under normal conditions the difference between them was insignificant. Under drought conditions, an increase in the carotenoids to chlorophylls ratio in the original genotypes, compared to transgenic plants, was also established. A comparative analysis of the morphometric indicators of the main shoot at full maturity showed that under normal conditions, the plants of transgenic lines did not differ from the plants of the original genotypes in spike length, however, they prevailed in terms of the main shoot stem height and the length of the roots.

*Key words:* *Triticum aestivum*, transgenic plants, ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene, soil drought, proline, photosynthetic pigments, growth parameters.