

<https://doi.org/10.15407/frg2023.03.251>

УДК 581.132:633.11

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСУ АДАПТАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДО УМОВ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ ГЕНЕТИЧНО ЗМІНЕНИХ РОСЛИН *TRITICUM AESTIVUM* L. З ЧАСТКОВОЮ СУПРЕСІЄЮ ГЕНА КАТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ

С.І. МИХАЛЬСЬКА, А.Г. КОМІСАРЕНКО, Л.О. МИХАЛЬСЬКИЙ

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

Комплексний аналіз фізіолого-біохімічних параметрів насінневого покоління Т2 трансгенних рослин озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з інтродукованими елементами, що утворюють дволанцюговий РНК супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*), засвідчив їх підвищену толерантність до водного дефіциту та сульфатно-хлоридного засолення. Генетично змінені рослини з частковою супресією гена *pdh* порівняно з вихідними генотипами характеризувалися зниженою активністю ферменту і підвищеним рівнем вільного проліну (Pro). Виявлено закономірності його акумуляції/витрачання як за нормальних умов вирощування, так і за дії осмотичних стресів. Показано, що на 10-ту добу зневоднення вміст Pro у Т2-рослин збільшувався і не змінювався у перші години після регідратації, що сприяло підтриманню балансу вуглеводів, який у рослин вихідної форми істотно знижувався в умовах зневоднення та нормалізувався за регідратації. У трансгенних рослин цей показник майже не змінювався незалежно від умов культивування. Встановлено динамічні зміни вмісту білка в листках в умовах норма → стрес → норма. За оптимальних умов його кількість у Т2-рослин та їх вихідних генотипах достовірно не відрізнялась, тоді як за дії водного стресу зафіксовано підвищення у контрольних рослин, що може свідчити про синтез білків стресової відповіді. Визначено, що за достатнього водозабезпечення вміст основного фотосинтетичного пігменту — хлорофілу — в прапорцевих листках рослин вихідних генотипів та їх трансгенних ліній коливався у близьких межах. Посуха знижувала кількість сумарного хлорофілу в прапорцевих листках усіх досліджуваних рослин, причому різниця між вихідними генотипами і трансгенними варіантами була на користь генетично модифікованих форм. Порівняльний аналіз морфометричних показників у фазу повної стиглості показав, що Т2-рослини після дії водного стресу переважали вихідні генотипи за висотою головного стебла і довжиною його колоса.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., трансгенні рослини, водний дефіцит, проліндегідрогеназа, вміст проліну, фотосинтетичні пігменти, вуглеводи, морфометричні параметри.

Цитування: Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Михальський Л.О. Дослідження комплексу адаптаційних характеристик до умов водного дефіциту генетично змінених рослин *Triticum aestivum* L. з частковою супресією гена катаболізму проліну. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 3. С. 251—264. <https://doi.org/10.15407/frg2023.03.251>

Підвищення рівня толерантності рослин до впливу негативних чинників навколишнього середовища стає особливо актуальним у зв'язку з глобальними змінами клімату. У природних кліматичних умовах рослини особливо часто піддаються дії посухи і тепловим стресам, які значно знижують їх врожайність. Зазвичай швидке зростання температури на 10–15 °С вище за типову температуру навколишнього середовища викликає тепловий стрес у рослин. При цьому температура ґрунту внаслідок підвищення температури повітря також може збільшуватись, якщо вона супроводжується спричиненим посухою зниженням вмісту вологи [1].

На сьогодні поліпшення рослин за ознаками стійкості до водного дефіциту — одне з головних завдань селекціонерів і генетиків. З культурних рослин дослідники особливо увагу приділяють пшениці, оскільки вона є однією з найважливіших продовольчих культур у світі [2–4].

Потужним інструментом у селекційному процесі пшениці є сучасні методи генетичної інженерії, які забезпечують передачу одного або декількох генів від одного генотипу до іншого, причому донор і реципієнт не обов'язково мають бути одного виду або таксона. Це істотно збільшує різноманітність за певними ознаками, прискорює процес отримання рослин із заданими властивостями, а також, що особливо важливо, дає можливість відстежувати генетичні зміни та їх наслідки [5]. Крім того, трансгенні рослини є унікальними об'єктами для вивчення фундаментальних проблем функціонування генів [6–9].

Великий інтерес фахівців у галузі селекції пшениці на стійкість до осмотичних стресів викликаний до генів, які контролюють метаболізм «сумісних осмолітів». Серед них, зокрема, гени синтезу і катаболізму вільного проліну (Pro) та ключові ферменти його біосинтезу та деградації ($\Delta 1$ -піролін-5-карбоксилатсинтетаза (P5CS) та проліндегідрогеназа (PDH)). Більшість несприятливих дій призводять до осмотичного дисбалансу і генерації вільних радикалів, тому вміст проліну є одним із чинників, що визначає неспецифічну стійкість до стресового впливу багатьох видів рослин, у тому числі й пшениці [10]. Pro має високий осмотичний потенціал і навіть у великих концентраціях не порушує структуру інших біологічних молекул. Крім добре відомої ролі інертного сумісного осмоліту пролін за дії стресорів виконує низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, бере участь у регуляції експресії деяких генів, є джерелом енергії, депо азоту і вуглецю [10, 11].

Фундаментальна роль проліну в осмотичній регуляції та підвищенні здатності рослин протидіяти зневодненню клітин, спричиненого посухою, засоленням або екстремальними температурами, доволі добре вивчена. Незначне підвищення вмісту Pro (зазвичай на початку дії стресора) відіграє регуляторну і антиоксидантну ролі, а істотніше (на пізніших стадіях стресової реакції) може виконувати осмопротекторну функцію [12, 13]. Разом з тим низка аспектів біологічної функції цієї вільної амінокислоти та ролі окремих генів у системі регуляції її метаболізму залишаються недостатньо вивченими і

неоднозначними [14]. Усі наявні дані свідчать, що метаболізм проліну має складний вплив на ріст рослин і реакції на стрес, але сумнівів щодо його осмопротекторної функції у підвищенні їх толерантності до абіотичних стресів немає. У зв'язку з цим розроблення напряму метаболічної інженерії рослин, пов'язаного з ідентифікацією та аналізом структурних генів, що контролюють, зокрема, синтез і катаболізм Pro, становить інтерес для створення ліній рослин з підвищеним рівнем осмотолерантності. Багато дослідників, в тому числі й ми, показали, що внаслідок РНК-інтерференції гена проліндегідрогенази, акумуляція вільного проліну за умов стресу може підвищувати рівень стійкості рослин [15–17].

Відносно невелике збільшення вмісту Pro, яке спостерігається у трансформантах з супресованою PDH, може виявитися важливим вже на перших етапах стресового впливу [18], оскільки виживання рослин під час неочікуваного (раптового) початку стресу без акліматизації часто визначається швидкістю включення захисних механізмів. Якщо рослина вже містить деяку додаткову кількість захисного агента широкого спектра дії, це забезпечує підвищену стійкість клітинних систем. Наприклад, у відповідь на стресовий тиск він може захистити базові ферменти транскрипції й трансляції від інгібування та забезпечити первинний синтез стресових білків [19].

Основним для розуміння комплексних фізіологічних і генетичних механізмів стійкості пшениці до посухи є визначення фенотипічних характеристик, що сприяють підвищенню врожайності за стресових умов. Найважливішими серед них є зниження висоти рослин, що пов'язано з високим збиральним індексом; зменшення тривалості періоду від цвітіння до стиглості, що дає можливість уникнути тривалого температурного стресу; будова кореневої системи — розгалуження і довжина кореня, що забезпечує ефективне отримання вологи з ґрунту, висока продихова провідність, транспірація та низка інших характеристик [20].

На сьогодні відпрацьовано механізми створення генетично модифікованих рослин з генами, що впливають на процеси стійкості пшениці, але у процесі застосування будь-якої біотехнології завжди необхідне успадкування нової ознаки у поколіннях. Особливо це актуально під час отримання стресостійких рослин, оскільки трапляються випадки порушення мейозу та елімінації набутої характеристики [9]. Тому, об'єктивність оцінювання стійкості рослин, набутої у результаті генетичних маніпуляцій, передбачає поєднання методів *in vitro* та *in vivo*. У першому випадку можна виключити/додати стресові навантаження та дозувати концентрації стрес-моделювальних компонентів, в іншому — дослідити вплив стресового чинника на різних стадіях вегетації рослин. Культивування за умов дефіциту води дає можливість встановити рівень посухотолерантності рослин, який залежить від функціональності трансгена, та пов'язати його зі змінами вмісту Pro, що відображується на ростових параметрах культури.

Метою нашої роботи було дослідити низку біохімічних, фізіологічних і морфометричних показників трансгенних рослин нових

перспективних генотипів озимої пшениці насінневого покоління Т2 з частковою супресією гена проліндегідрогенази для визначення комплексу адаптаційних характеристик до умов водного дефіциту.

Методика

Вихідним матеріалом для досліджень слугували генетично модифіковані рослини озимої пшениці генотипів УК 106/19, УК 171/19h, УК 95/17, а також отримане у результаті самозапилення насінневе покоління рослин Т2 з інтегрованим дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази.

Рівень стійкості Т2-рослин аналізували в умовах штучно змодельованих осмотичних стресів, створених у культурі *in vitro*. Для цього по 100 насінин вихідної і трансгенної форм пророщували у чашках Петрі. Проростки культивували в умовах водного дефіциту та сульфатно-хлоридного засолення, які створювали додаванням до поживного середовища Мурасіге—Скуга (МС) маніту концентраціями 0,5 та 0,8 М (водний дефіцит) і солей морської води 2,0 % (сульфатно-хлоридне засолення).

Вегетаційний дослід проводили в умовах ґрунтової культури у посудинах місткістю 10 л, наповнених ґрунтосумішшю (вирощували у посудині по 6 рослин вихідного генотипу та насінневого покоління Т2), за природного освітлення. Спочатку вологість ґрунту підтримували на рівні 70 % повної вологоємності (ПВ). У період виходу в трубку досліджувані рослини (половина посудин) піддавали дії водного стресу зниженням вологості ґрунту й утримуванням її протягом 10 діб на рівні 30 % ПВ. Після чого полив відновлювали. Іншу половину рослин у посудинах продовжували вирощувати за початкових умов вегетації (70 % ПВ). Середню пробу для визначення біохімічних показників формували об'єднанням 6 прапорцевих листків окремих рослин. Зразки для аналізу відбирали у триразовій повторності. Вміст вільного проліну в досліджуваних рослинах визначали в умовах норма → стрес → регідратація за модифікованою методикою Чинарда [21].

Активність РДН оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ для окиснення проліну, вимірюючи збільшення концентрації утвореного НАДН за одиницю часу [22]. Кількість білка у рослинному матеріалі визначали методом Лоурі [23]. Вміст сахарози встановлювали резорциновим методом після фіксації рослинного матеріалу киплячим етанолом і триразового екстрагування цукрів 80 %-м етанолом, моноцукри — арсеномолібдатним методом [24].

Вміст хлорофілу в листках трансгенних і контрольних рослин визначали безмацераційним методом після екстракції висічок диметилсульфоксидом за температури 65 °С протягом 4 год за Велбурном [25]. Коефіцієнти екстинкції вимірювали спектрофотометром Spесord M-40 (Німеччина).

Інтеграцію рекомбінантних молекул ДНК аналізували полімерно-ланцюговою реакцією за наявності елементів векторної конструкції із використанням специфічних праймерів до фрагмента першого екзона гена *pdh* арабідопсису (545 пн) [26].

Морфометричні показники трансгенних рослин T2 і їх вихідних форм досліджували за нормальних умов вирощування та водного дефіциту. Вимірювання проводили у період повної стиглості зерна у триразовій повторності.

Статистичну обробку отриманих даних виконували за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням Microsoft Excel. Різницю між даними вважали достовірною за $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Ефективність генетичної модифікації рослин для підвищення їх стресостійкості визначається насамперед високим і стабільним рівнем експресії перенесених генів. Для встановлення успадкування інтродукованих чужорідних генів та їх експресії у T2-пшениці скринінг трансгенних варіантів проводили безпосередньо на стресовому фоні, створеному додаванням великих доз маніту (0,5 М) і морської солі (2,0 %), що моделюють *in vitro* умови водного дефіциту і сульфатно-хлоридного засолення. Такий підхід до тестування рослин дає можливість визначити відсоток варіантів із функціональною генетичною конструкцією, в яких зміни рівня L-проліну не корелюють з осмотолерантністю або ж можуть бути пов'язані з окремим типом стресора [28, 29].

Встановлено, що осмотичний тиск середовища істотно впливав на проростання насіння вихідних генотипів і зменшував відсоток появи проростків трансгенних рослин. Тоді як за нормальних умов культивування, під час пророщування насіння на поживному середовищі МС, відсоток пророслого насіння становив майже 95–98 % для всіх форм досліджуваних генотипів (табл. 1).

За культивування досліджуваних рослин в умовах сульфатно-хлоридного засолення, як і за водного дефіциту, спостерігали істотні відмінності за кількістю появи проростків, що засвідчує різну чутливість генотипів пшениці до модельованого осмотичного стресу уже на стадії проростання. Крім того, отримані дані показали, що агресивнішим стресором є засолення, оскільки зміни осмотичного потенціалу підсилюються іонною складовою. Однак стійкість рослин до зневоднення визначає не лише їх здатність проростати в умовах осмотичного стресу, а й витримувати пролонговану дію шкідливого чинника, яка з часом може ще більше підсилюватись. У зв'язку з цим перевіряли адаптаційну пластичність проростків пшениці до умов наджорсткого стресу, створеного підвищенням концентрації непро-

ТАБЛИЦЯ 1. Проростання насіння (%) у трансформантів покоління T2 і контрольних рослин вихідних генотипів пшениці озимої за умов водного дефіциту і засолення протягом 7 діб

Генотип	Маніт 0,5 М		Морська сіль 2,0 %	
	Контроль	Трансформант	Контроль	Трансформант
УК 95/17	42,1±1,7	68,3±1,9*	24,1±1,3 [#]	49,2±2,2* [#]
УК 106/19	57,1±3,5	83,0±1,3*	38,5±2,4 [#]	68,9±1,7* [#]
УК 171/19h	39,1±2,7	75,7±2,4*	23,5±3,3 [#]	58,6±2,7* [#]

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

никаючого осмоліта маніту до 0,8 М. Через 10 діб культивування майже всі рослини вихідних форм гинули, а кількість життєздатних Т2-рослин становила близько 50 % перенесених для вирощування в наджорстких умовах. Отримані дані доводять, з одного боку, стресостійкість трансформантів, з іншого — демонструють різний рівень експресії трансгена.

Рослини Т2, які характеризувалися життєздатністю під час культивування в умовах довготривалого модельованого осмотичного стресу, аналізували за наявністю в сумарній ДНК листків першого екзона гена проліндегідрогенази арабідопсису (*pdh*) (рис. 1).

Молекулярно-генетичний аналіз з використанням праймерів до першого екзона гена *pdh* арабідопсису показав його наявність у сумарній ДНК листків Т2-рослин пшениці, стійких до летальних концентрацій маніту.

Часткову супресію гена *pdh* у другому поколінні генетично змінених рослин визначали за рівнем активності ферменту. Для того, щоб безпосередньо оцінити, якою мірою введена конструкція впливає на експресію гена *pdh*, порівняли активність ферменту проліндегідрогенази у прапорцевих листках трансформантів і рослин вихідних генотипів за нормальних фізіологічних умов та умов посухи (10 діб 30 % ПВ). Активність проліндегідрогенази оцінювали, вимірюючи збільшення концентрації НАДН за одиницю часу під час окиснення проліну (рис. 2).

У результаті досліджень встановлено, що часткова супресія гена *pdh* знижувала активність ферменту. Так, у рослин пшениці з дволанцюговим РНК супресором гена *pdh* активність проліндегідрогенази за нормальних умов поливу була нижчою в 1,4—1,6 раза, ніж у контрольних рослин, що зумовлено функціональністю введеної генетичної конструкції та РНК-інтерференцією гена *pdh*. В умовах водного стресу активність ферменту знижувалася на 20,0—33,3 %, що узгоджується з результатами численних досліджень, в яких показано, що за таких умов накопичення Р_{го} контролюється підвищенням експресії генів його біосинтезу та зниженням експресії генів катаболізму [29].

Таким чином, встановлено, що часткове інгібування експресії гена *pdh* знижує активність ферменту, результатом чого є підвищення вмісту проліну та рівня стійкості рослин пшениці до стресових чинників. При цьому ефективність виживання залежить не лише від стабілізації процесів життєдіяльності, а й швидкості активізації захисних механізмів. Імовірно, що за наявності супресії окремої ланки

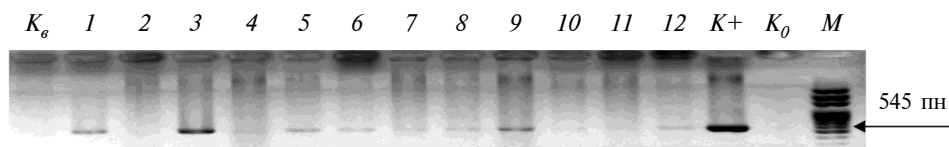


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до першого екзона гена *pdh* арабідопсису (545 пн):

1—12 — зразки ДНК пшениці; K_0 — контроль (вихідна форма); K^+ — контроль позитивний LBA4404; K_0 — TE буфер; M — маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix

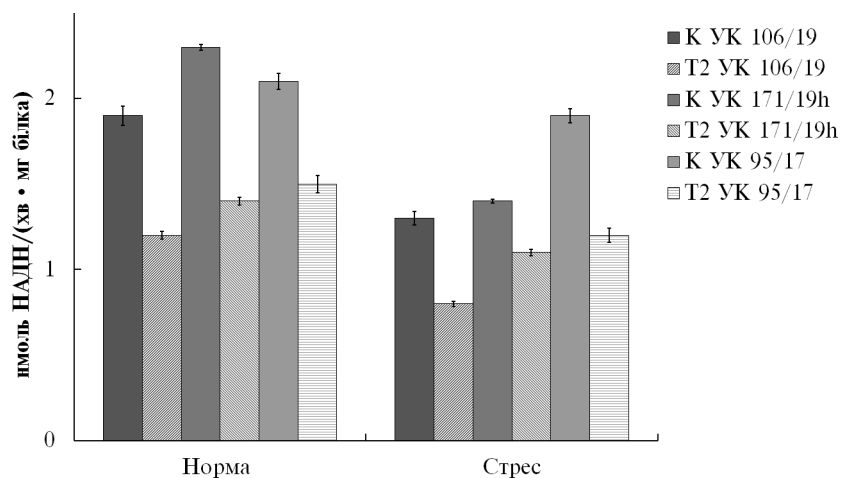


Рис. 2. Активність ферменту проліндегідрогенази у прапорцевих листках трансформантів покоління T2 і контрольних рослин вихідних генотипів за умов нормального вирощування та дефіциту води

метаболізму баланс синтезу та деградації Pro також мав змінитись. У зв'язку з цим аналіз вмісту вільного проліну у генетично змінених форм за нормальних умов і водного дефіциту створить передумови виявлення адаптивних реакцій у досліджуваних рослин.

Рівень Pro на 1-шу добу після припинення зволоження ґрунту був незначним у всіх генотипів за достовірної переваги трансгенних варіантів з частково супресованою активністю гена *pdh* (табл. 2).

Із продовженням зневоднення (на 10-ту добу) вміст Pro підвищувався: у контрольних рослин у 3–4 рази, у генетично модифікованих — 1,8–2,3 рази.

Після відновлення поливу рівень вільного проліну у вихідних форм знижувався до ~50 % максимальних показників, у T2-рослин — у середньому на 20 %.

Збільшення вмісту Pro у рослин, що зазнали дії стресу, може відбуватися як у результаті посилення його синтезу, так і внаслідок деградації проліномістких структур клітини [30]. Характер змін рівня амінокислоти у контрольних варіантів за умов норма → стрес → відновлення найімовірніше свідчить на користь першого. Разом з тим у генетично модифікованих рослин за посилення водного дефіциту рівень вільного проліну був значно вищим, ніж у вихідних форм, і підтримувався у перші години після регідратації, що є результатом часткової супресії гена *pdh*.

Саморегуляція рівня Pro, що забезпечують його системи синтезу/катаболізму/транспорту, є динамічним процесом який триває постійно. Особливо це виявляється за стресових умов, коли чинник може впливати різною силою на органи рослини. Відомо, що продукти катаболізму проліну можуть бути індукторами експресії осмочутливих генів, які кодують білки, необхідні для специфічної стрес-адаптації. У формуванні стійкості рослин до дії несприятливих чинників довкілля важливу роль відіграють стресові білки, які є компонентом захисної реакції живих організмів. Реакція рослин на стрес

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст вільного проліну (мг/г сирої речовини) у трансгенних рослинах (Т2) і рослинах вихідного генотипу (К) за умов зневоднення/регідрації

Генотип	1-ша доба зневоднення	10-та доба зневоднення	Регідрація
К УК 106/19	0,102±0,019	0,306±0,007	0,188±0,012
Т2 УК 106/19	0,229±0,013*	0,417±0,024*	0,344±0,017*
К УК 171/19h	0,091±0,010	0,325±0,009	0,165±0,02
Т2 УК 171/19h	0,170±0,011*	0,392±0,007*	0,289±0,015*
К УК 95/17	0,89±0,003	0,346 ±0,008	0,158±0,016
Т2 УК 95/17	0,195±0,007*	0,449 ±0,01*	0,356 ±0,009*

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

на тлі загальної тенденції пригнічення синтезу нормальних білків і посилення стресових залежить від параметрів негативного впливу, зокрема, від його тривалості, діапазону, інтенсивності та власне природи несприятливого чинника [32, 33].

З даних, представлених на рис. 3, видно, що відбувались динамічні зміни вмісту білка в прапорцевих листках в умовах норма → стрес → норма. За оптимальних умов в обох типах рослин достовірної різниці не було. Після водного дефіциту рівень білка відносно нормальних умов вирощування підвищувався лише у вихідних форм, що може свідчити про захисну реакцію рослин у відповідь на стрес — синтез стресових білків. Незначне зниження його у Т2-рослинах найімовірніше має адаптивне значення, пов'язане з економією енергетичних ресурсів клітини, або ж вказує на проходження процесів, що супроводжуються широким спектром функцій білкових макромолекул.

Після регідрації вміст білка зменшувався в обох варіантах рослин майже однаково, у середньому в 1,1–1,3 раза, що свідчить про проходження звичайних метаболічних процесів у період відновлення після стресу. Рівень стійкості й реагування на стрес визначається біологічними особливостями видів та їхнім генотипом. Рослини, що

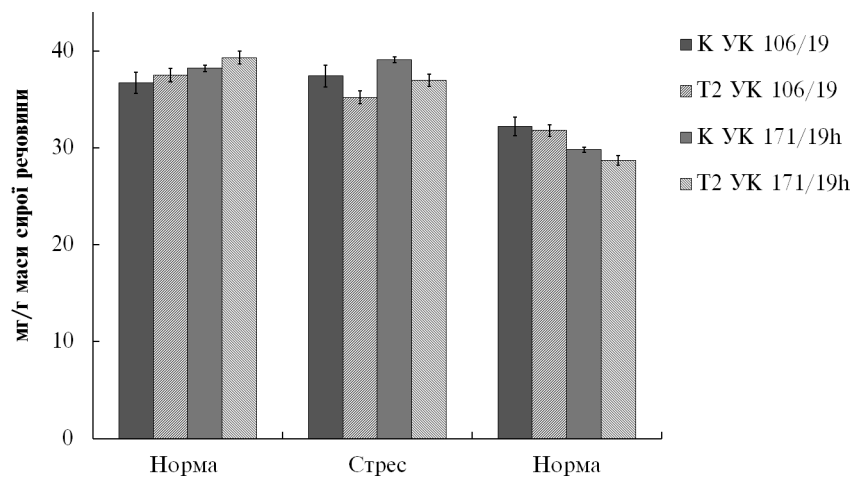


Рис. 3. Вміст білка в листках генетично змінених (Т2) і контрольних (вихідний генотип) рослинах в умовах норма → стрес → норма

розрізняються за стійкістю, на стресові дії зазвичай реагують однотипно, але істотно відрізняються за швидкістю фізіологічних і структурних перебудов [32]. Інтенсивність порушень, спричинених водним дефіцитом, зростає пропорційно терміну його впливу. Очевидно, що фізіолого-біохімічні механізми стійкості починають реалізовуватись на початкових етапах стресу. При цьому стійкість в умовах стресу корелює із підвищенням вмісту вільного проліну і під час пророщування, і в подальшому процесі росту та розвитку.

Відомо, що крім Pro рівень стійкості рослинного організму до стресових чинників забезпечує перебудова вуглеводного метаболізму, спрямованого на адаптацію рослинного організму до несприятливих умов. Низькомолекулярні вуглеводи сприяють різним фізіологічним процесам і необхідні як субстрат і сигнал при захисних реакціях рослин пшениці. Протекторна функція цукрів полягає у захисті білково-ліпідних комплексів клітин у разі зневоднення, а як осмопротектори вони підвищують осмотичний потенціал клітин рослин. Вміст сахарози в листках визначається динамічною рівновагою її синтезу й гідролізу, а індукована стресами зміна її кількості може бути пов'язана з регуляцією активності ферментів, які синтезують і залучають цей дисахарид у метаболізм. У підтриманні процесів, що генеруються сахарозою, задіяні моноцукри, тому у формуванні реакції на стрес розглядається взаємозв'язок цих вуглеводів та пов'язаних змін у балансі співвідношення сахароза/моноцукри [33]. Ми проаналізували вміст сахарози і моноцукрів у клітинах рослин трансгенної пшениці та вихідного генотипу за нормальних умов вирощування й водного дефіциту (табл. 3).

Так, за нормальних умов культивування вміст сахарози у тканинах контрольних рослин пшениці був дещо нижчим, ніж у генетично змінених. На 10-ту добу зневоднення фіксували різноспрямовані

ТАБЛИЦЯ 3. Вміст сахарози та моноцукрів (мкмоль/г сирої речовини) у клітинах трансгенних (Т2) і контрольних (К) рослин пшениці за умов норма → стрес → відновлення

Варіант	Сахароза			Моноцукри		
	Норма	Стрес	Відновлення	Норма	Стрес	Відновлення
К УК 95/17, № 1	124,1±0,5	139,5±1,6*	182,8±0,1#	44,9±0,3	90,7±0,7*	73,6±0,4#
К УК 95/17, № 2	137,0±1,2	141,4±1,9*	209,2±1,8#	53,8±1,1	101,9±1,3*	84,6±0,8#
Т2 УК 95/17, № 1	172,4±1,1	111,7±0,8*	153,1±1,9#	43,1±0,1	55,5±1,2*	75,0±2,0#
Т2 УК 95/17, № 2	155,9±2,4	124,0±1,5*	166,9±1,7#	39,7±1,1	42,8±0,7*	51,4±1,8#
Т2 УК 95/17, № 3	153,3±2,7	115,6±0,2*	157,3±2,5#	53,6±0,7	44,0±0,3*	60,9±1,0#
Т2 УК 95/17, № 4	189,6±3,0	119,8±2,5*	150,9±3,3#	75,5±1,7	53,6±1,5*	64,2±0,2#

Примітка. Різниця між варіантами за умов норма → стрес і стрес → відновлення вірогідна за $p < 0,05$ (*, #).

зміни її рівня. У T2-рослин вміст сахарози знижувався на 35—50 %, у рослин вихідного генотипу він майже не змінювався. Після регідратації рівень сахарози зростав у всіх досліджуваних рослин. Різниця між аналізованими варіантами становила близько 10 % на користь вихідного генотипу.

Аналогічну тенденцію спостерігали і з моноцукрами. За водного дефіциту їх вміст у листках змінювався, що засвідчує підтримання метаболізму сахарози. У контрольних варіантів рівень моноцукрів збільшувався під час зневоднення майже у 2 рази та знижувався після регідратації у середньому на 18 %. У генетично модифікованих рослин рівень моноцукрів змінювався у незначних межах. При цьому баланс вуглеводів (співвідношення сахароза/моноцукри) у контрольних рослин істотно знижувався під час зневоднення та нормалізувався після регідратації. У T2-рослин цей показник майже не змінювався. Як зазначено вище, у генетично змінених рослин за посилення водного дефіциту рівень проліну був значно вищим, ніж у контрольних, і підтримувався у перші години після регідратації, що сприяло встановленню балансу вуглеводів.

Таким чином, проведене дослідження з порівняння реакцій рослин пшениці на дію короткотривалого водного дефіциту показало, що вони активно адаптуються до несприятливих умов. При цьому стрес-протекторною сполукою для генетично змінених варіантів є вільний пролін, підвищення рівня якого у T2-рослин відносно вихідного генотипу сприяло підтриманню балансу вуглеводів.

Для створення на основі біотехнологічних рослин сортів, здатних формувати високі урожаї за дії стресових чинників, необхідне розуміння зв'язків між внесеними генетичними змінами та системою регуляції фізіологічних функцій рослин. Однією з чутливих до дефіциту води ланок є фотосинтетичний апарат, тому пов'язані з ним фізіологічні та біохімічні показники можуть слугувати опосередкованими маркерами посухостійкості. Так, за дії посухи відбувається зменшення кількості або деградація основних фотосинтетичних пігментів, зміни вмісту й активності антиоксидантних ферментів, накопичення осмолітів (низькомолекулярних вуглеводів, амінокислот, метиламінів) тощо [34]. Важливу роль пігментного апарату в толерантності пшениці до посухи підтверджує встановлена у низці робіт позитивна залежність між вмістом хлорофілу в листках та інтенсивністю фотосинтезу. Крім того показано, що зернова продуктивність озимої пшениці тісно пов'язана із вмістом хлорофілу в прапорцевому листку на 4- і 14-ту доби посухи (30 % ПВ) [34]. За умов достатнього водозабезпечення вміст основного фотосинтетичного пігменту — хлорофілу — у прапорцевих листках рослин вихідних генотипів та їх трансгенних ліній зі зниженою активністю гена *pdh* коливався у близьких межах (табл. 4).

Так, у вихідного генотипу УК 95/17 вміст сумарного хлорофілу ($a + b$) становив $9,85 \pm 0,12$ мг/г сухої речовини, тоді як у T2-рослин зі зниженою активністю гена *pdh* за умов достатнього поливу його вміст був близьким до $10,60 \pm 0,48$ мг/г сухої речовини. Посуха знижувала кількість сумарного хлорофілу в прапорцевих листках вихідних і трансформованих рослин на 34 та 20 % відповідно. До того ж

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСУ АДАПТАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

ТАБЛИЦЯ 4. Вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г сухої речовини) у листках T2-рослин (T2) пшениці та їх вихідної форми (К) за різних умов вологозабезпечення

Варіант	Умови	Хлорофіл		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
К УК 95/17	Контроль	7,28±0,14	2,57±0,04	9,85±0,12
	Посуха	5,56±0,11	1,90±0,07	6,47±0,04
T2 УК 95/17	Контроль	8,06±0,38	2,54±0,10	10,60±0,48
	Посуха	6,42±0,09	2,04±0,06	8,46±0,15

за таких умов різниця між вмістом сумарного хлорофілу у прапорцевих листках вихідного генотипу і T2-рослин становила близько 24 % на користь генетично модифікованих форм.

Негативний вплив осмотичних стресів на рослини посилюється пропорційно його тривалості. Аналіз реакції рослин пшениці на дію водного дефіциту показав відповідні зовнішні зміни (ослаблення тургору в нижніх листках, скручування молодих листкових пластинок). Після поновлення поливу рослини набували звичайного вигляду і в подальшому розвивались без порушень. При цьому різна чутливість досліджуваних об'єктів до дії перенесеного стресу відображалась на ростових параметрах рослин, зокрема, на висоті головного стебла та довжині головного колоса (рис. 4).

Порівняльний аналіз морфометричних показників у фазу повної стиглості показав, що T2-рослини переважали вихідні форми за висотою стебла у середньому на 6—7 см, за довжиною головного колоса — на 0,4—0,6 см.

Отже, встановлено, що часткова супресія гена *pdh* пшениці за водного дефіциту позитивно відображається на ростових параметрах рослин. Це є важливим чинником при формуванні врожаю. Комплексний аналіз біохімічних показників показав, що адаптаційні властивості T2-рослин до умов водного дефіциту зумовлені підвищеним рівнем вільного проліну, коливання якого за умов норма → стрес-

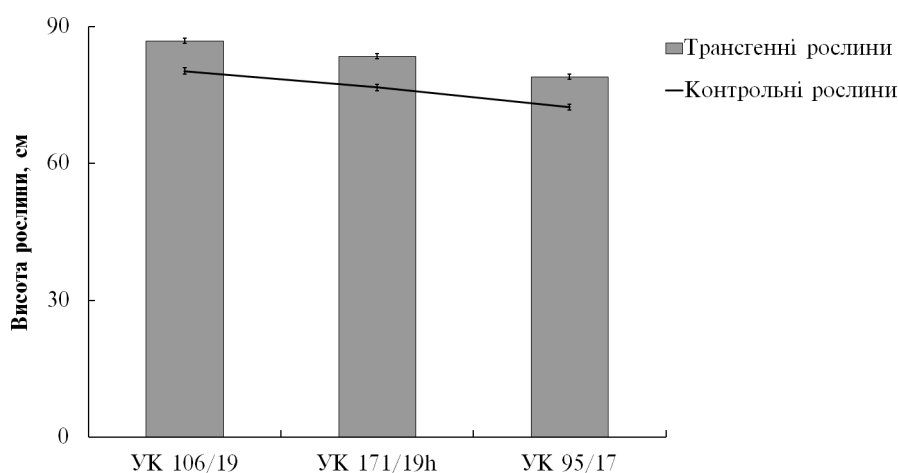


Рис. 4. Висота головного стебла у трансгенних (T2) і контрольних (вихідна форма) рослин пшениці після дії водного дефіциту

с → норма сприяє підтриманню балансу вуглеводного складу, поліпшенню фотосинтетичних параметрів та загалом зменшує рівень чутливості біотехнологічних рослин до перенесеного стресу, що виявляється в кращому проростанні насіння за умов осмотичних стресів та адаптаційній пластичності.

REFERENSES

1. Akpinar, B.A., Avsar, B., Lucas, S.J. & Budak, H. (2012). Plant abiotic stress signaling. *Plant Signaling Behavior*, 7, pp. 1450-1455. <https://doi.org/10.4161/psb.21894>
2. 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/frg2016.03196>
3. 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)
4. Khan, H. (2019). Genetic improvement for end-use quality in wheat. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04609-5_12
5. Zhang, Y., Bai, Y., Wu, G., Zou, S., Chen, Y., Gao, C. & Tang D. (2017). Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant Journal*, 91, No. 4, pp. 714-724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
6. Morgun, B.V. & Tishchenko, E.N. (2014). Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv: Logos [in Russian].
7. Shrawat, A.K. & Armstrong, C.L. (2018). Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37, No. 1, pp. 1-87. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1514718>
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/10.11144/javeriana.sc23-1.amto>
9. Sergeeva, L.E., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2019). Modern biotechnologies for increasing plant resistance to osmotic stresses. Kyiv: Kondor [in Russian].
10. 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 ahrarnoho universytetu. Seriya Biologiya*, 2, No. 32, pp. 6-22. [in Russian]. <https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/9047>
11. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. & Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal*, 19, pp. 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
12. 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>
13. Dubrovna, O.V., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2022). Using Proline Metabolism Genes in Plant Genetic Engineering. *Cytology and Genetics*, 56, No. 4, pp. 361-378. <https://doi.org/10.3103/S009545272204003X>
14. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., Yadav, M. & Upadhyay, R.S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5, No. 12. e02952 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
15. Barro, J.C., Iehisa, M.J. & Giménez, M.J. (2016). Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnology Journal*, 14, No. 3, pp. 986-996. <https://doi.org/10.1111/pbi.12455>
16. Mykhalska, S.I., Komisarenko, A.G. & Kurchii, V.M. (2021). Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability. *Factory eksperymentalnoy*

- evolyutsiyi organizmiv, 28, pp. 94-99 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
17. Dubrovna, O.V., Pryadkina, G.A., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2023). Physiological and biochemical characteristic of transgenic winter wheat plants with over-expression of ornithine- Δ -aminotransferase gene. *Fiziol. rast. genet.*, 55, No. 1, pp. 58-73 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2023.01.058>
 18. Sergeeva, L.E., Mykhalskaya, S.I., Kurchii, V.M. & Tishchenko, E.N. (2014). The changer of the free proline contents in the differential tissues of corn shoots under initial stages of osmotic stresses. *Factory eksperimentalnoy evolyutsiyi organizmiv*, 15, pp. 133-136 [in Russian].
 19. Szabados, L. & Savoure, A. (2009). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sciences*, 15, pp. 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
 20. Ahmad, M., Zaffar, G., Razvi, S.M., Dar, Z.A., Mir, S.D., Bukhari, S.A. & Habib, M. (2014). Resilience of cereal crops to abiotic stress: a review. *African Journal Biotechnology*, 13, No. 29, pp. 2908-2921. <https://doi.org/10.5897/AJBX2013.13532>
 21. 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. & Niutin, Yu.I. (1981). The modification of proline estimation method for detection drought tolerant forms of genus *Lycopersicon* Tourn. *Izvestiya AN MSSR*, No. 4, pp. 55-60 [in Russian].
 22. Mattioni, C., Lacerenza, N.G., Troccoli, A., de Leonardis, A.M. & di Fonzo, N. (1997). Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiology Plant*, 101, pp. 787-792. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01064.x>
 23. Lowry, O.N., Rosebrough, N.J., Farr, A.J. & Rondall, A.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 192, No. 2, pp. 265-275.
 24. Sakalo, V.D., Larchenko, K.A. & Kurchii, V.M. (2009). Synthesis and metabolism of sucrose in leaves of corn seedlings under conditions of water deficit. *Fyzyolohiya y byokhymiya kulturnukh rastenyi*, 41, No. 4, pp. 305-313 [in Ukrainian].
 25. 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)
 26. Tishchenko, E.N., Komisarenko, A.G., Mykhalskaya, 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 strain LBA4404 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].
 27. Komisarenko, A.G., Mykhalskaya, S.I., Kurchii, V.M. & Sergeeva, L.E. (2015). The analysis of transgenic corn and sunflower plants levels resistance to water stress. *Factory eksperimentalnoy evolyutsiyi organizmiv*, 17, pp. 189-192 [in Ukrainian]. https://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2015_17_42
 28. Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J., Damsz, B., Narasimhan, M., Hasegawa, P., Joly, R. & Bressan, R. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*, 31, No. 6, pp. 699-712. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01389.x>
 29. Anwar, A., She, M., Wang, K. & Ye, X. (2018). Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *International Journal Molecular Sciences*, 19, pp. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>
 30. Stein, H., Honig, A., Miller, G., Erster, O., Eilerberg, H. & Csonka, L.N. (2011). Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Sciences*, 181, No. 2, pp. 140-150. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.013>
 31. Kolupaev, Yu.E. & Karpets, Yu.V. (2010). Formation of adaptive reactions of plants to the action of abiotic stressors. *Kiev: Basis* [in Russian].
 32. Kosakovskaya, I.V. (2008). Stress proteins of plants. *Kiev: Fitosotsiotsentr* [in Russian].
 33. Proels, R.K. & Huckelhoven, R. (2014). Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 15, No. 8, pp. 858-864. <https://doi.org/10.1111/mpp.12139>

34. Kiriziy, D.A., Stasik, O.O., Pryadkina, G.A. & Shadchina, T.M. (2014). Assimilation of CO₂ and the mechanisms of its regulation. Photosynthesis. Vol. 2. Kiev: Logos [in Russian].
35. Morgun, V.V., Stasyk, O.O., Kiriziy, D.A. & Pryadkina, G.O. (2016). The relationship between the response of photosynthetic parameters and grain productivity to soil drought in winter wheat plants contrasting in terms of resistance. Fiziol. rast. genet., 48, No. 5, pp. 371-381 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2016.05.371>

Received 13.07.2023

STUDY OF COMPLEX ADAPTATION CHARACTERISTICS TO WATER DEFICIT CONDITIONS OF GENETICALLY MODIFIED *TRITICUM AESTIVUM* L. PLANTS WITH PARTIAL SUPPRESSION OF THE PROLINE CATABOLISM GENE

S.I. Mykhalska, A.G. Komisarenko, L.O. Mykhalskyi

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

A comprehensive analysis of the seed generation of transgenic plants (T2) of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with introduced elements forming a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene (*pdh*, *PDH*) proved their increased tolerance to water deficit and sulfate-chloride salinity. Genetically modified plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, in comparison with the original genotypes, were characterized by reduced enzyme activity and an increased level of free proline (Pro). At the same time, the regularities of its accumulation/expenditure both under normal growing conditions and under the effects of osmotic stress were revealed. It was shown that on the 10th day of dehydration, the content of Pro in genetically modified plants increased and was maintained in the first hours after rehydration, which could contribute to the maintenance of carbohydrate balance, which in control plants was significantly reduced during dehydration and normalized during rehydration. In T2-plants, this index almost did not change regardless of cultivation conditions. Dynamic changes in the leaves protein content under normal → stress → normal conditions were established. Under optimal conditions, its amount in T2-plants and their original genotypes did not differ significantly, while under the influence of water stress, an increase in protein content was recorded in control plants, which may indicate the synthesis of stress response proteins. It was shown that under the conditions of sufficient water supply, the content of the main photosynthetic pigment — chlorophyll in the flag leaves of plants of the original genotypes and their transgenic lines fluctuated within close limits. Drought reduced the amount of total chlorophyll in the flag leaves of all studied plants, and the difference between the original genotype and the transgenic variants was in favor of the genetically modified forms. A comparative analysis of morphometric indices in the stage of full maturity showed that T2-plants after water stress prevailed over the original forms in terms of the height of the main stem and the length of its ear.

Key words: *Triticum aestivum* L., transgenic plants, proline catabolism gene, water deficit, proline, photosynthetic pigments, carbohydrates, morphometric parameters.

ORCID

С.І. МИХАЛЬСЬКА — S.I. Mykhalska <https://orcid.org/0000-0002-6644-5921>

А.Г. КОМІСАРЕНКО — A.G. Komisarenko <https://orcid.org/0000-0003-2081-4055>

Л.О. МИХАЛЬСЬКИЙ — L.O. Mykhalskyi <https://orcid.org/0000-0001-8835-0862>