

КОМІСАРЕНКО А. Г., МИХАЛЬСЬКА С. І.[✉], КУРЧІЙ В. М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.com

ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ З ДОДАТКОВОЮ КОПІЄЮ ГЕНА ОРНІТИН- δ -АМІНОТРАНСФЕРАЗИ ЗА УМОВ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ

Мета. Проаналізувати показники продуктивності біотехнологічних рослин пшениці з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази (*oat*) за умов водного стресу. **Методи.** Вегетаційний і лабораторний методи вивчення показників структури врожаю. **Результати.** Проведено порівняльний аналіз показників елементів продуктивності за дії осмотичного стресу контрольних і генетично змінених рослин, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Встановлена генотипова відмінність у показниках продуктивності за умов водного дефіциту. **Висновки.** Показано, що за дії осмотичного стресу біотехнологічні рослини (Т2) пшениці озимої генотипів Фаворитка, Достаток, Володарка характеризувалися кращими показниками структури врожаю у порівнянні з контрольними рослинами, окрім сорту Золотоколоса, в якого ці показники достовірно не відрізнялися. Біотехнологічні рослини з додатковою копією гена *oat* за умов недостатнього вологозабезпечення були вищими, мали краще розвинену кореневу систему і утворювали більшу кількість додаткових (бічних) пагонів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., біотехнологічні рослини, ген орнітин- δ -амінотрансферази, показники структури продуктивності.

У зв'язку з глобальними змінами клімату підвищення рівня стійкості рослин до дефіциту води набуло особливої актуальності. Серед культурних рослин велику увагу дослідників привертає пшениця, яка складає основу продуктового раціону більшості людства. Від її врожайності у майбутньому залежить вирішення продовольчої проблеми і якості життя населення багатьох країн [1]. Виробництво зерна в Україні також є провідною галуззю сільського господарства. Позиції лідера серед зернових культур займає пшениця озима, обмежуючим фактором

урожайності якої є недостатнє вологозабезпечення, що негативно впливає на оптимальне проходження фотосинтезу, транспорту асимілятів рослиною та гормональний баланс. Підвищення врожайності та якості продовольчого зерна можливе лише за впровадження нових високопродуктивних, конкурентоспроможних сортів із високою агроєкологічною пластичністю і кращими адаптивними властивостями до несприятливих умов довкілля [1, 2].

Великі перспективи в генетичному поліпшенні рослин покладаються на генетичну інженерію, яка може створювати трансгенні сорти з принципово новими ознаками, стійкі до абіотичних і біотичних стресових факторів, що дозволить кардинально змінити технологію і ареал вирощування багатьох культур, зменшити посівні площі, матеріальні затрати і собівартість продукції [3]. Успіх технології поліпшення цінних ознак важливих сільськогосподарських культур визначається високим і стабільним рівнем експресії перенесених генів. Введення до складу генетичних конструкцій цільових генів, зокрема тих, що можуть одночасно підвищувати рівень стійкості та продуктивність рослин в умовах дії абіотичних стресів, дає можливість отримувати генетично змінені форми, які в подальшому можна залучати в селекційному процесі.

Agrobacterium-опосередкована трансформація *in planta*, з використанням векторних конструкцій, котрі в своєму складі містять гени метаболізму проліну, який розглядається як фактор, що може брати участь у складних інтегральних процесах адаптації/стійкості рослин до абіотичних стресів, успішно застосовується під час створення форм із підвищеним рівнем стрес-стійкості. Таким способом були отримані трансгенні рослини кукурудзи, соняшнику і пшениці, які характеризувалися підвищеною стійкістю до різних осмотичних стресів, за ра-

хунок експресії інтегрованих генів катаболізму проліну [4–7].

До генів, що контролюють метаболізм амінокислот у відповідь на стрес, відноситься і ген орнітин-дельта-амінотрансферази (ОАТ, ЄС 2.6.1.13), що кодує фермент, який каталізує перехід дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (П5К) і глутамату. Ця реакція є частиною перетворень таких амінокислот, як орнітин, аргінін, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний із фіксацією, накопиченням і ремобілізацією азоту, формуванням та проростанням насіння, регуляцією процесів росту та розвитку. Є багато наукових літературних даних і про участь гена *oat* в процесах регуляції стійкості рослин до різних абіотичних стресів, але при цьому остаточно його роль до кінця не встановлена [8–10].

Актуальність окресленого напрямку досліджень пов'язана з тим, що створення біотехнологічних рослин пшениці озимої з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази передбачає підвищення рівня їх стійкості та стабільність отримання високого врожаю в умовах осмотичного стресу.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугувало насіннєве покоління (Т2) біотехнологічних рослин, створених на основі таких сортів пшениці озимої: Фаворитка, Володарка, Достаток, Золотоколоса (селекції ІФРГ НАН України). Генетично змінені рослини були отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму *Agrobacterium tumefaciens* AGLO, який містить плазмиду pVi-OAT з геном орнітин- δ -амінотрансферази *Medicago truncatula* (люб'язно надану доктором біологічних наук, чл.-кореспондентом РАН Кочетовим О. В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ). Генетичну трансформацію проводили в умовах вегетаційного досліді в процесі запилення [7].

Селекцію генетично змінених рослин та елімінацію бактеріальних клітин проводили в умовах *in vitro* з використанням селективної концентрації канаміцину сульфату (50 мг/л) та бактерицидного антибіотика цефотаксиму (500 мг/л). Відібрані рослини дорощували в умовах *in vivo* та отримували насіннєві покоління.

Стресове навантаження створювали шля-

хом припинення зволоження ґрунту у вегетаційних посудинах протягом 10 діб у період виходу рослин у трубку. Морфометричні параметри колосу та показники насіннєвої продуктивності визначали у фазі повної стиглості [11]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [12].

Результати та обговорення

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням векторної конструкції pVi-OAT із цільовим геном *oat* було отримано 584 ТО зернівок пшениці озимої, із яких переважна кількість належала сорту Фаворитка (рис. 1).

За примусового запилення після процесу кастрації та нанесення суспензії бактеріальних клітин показник зав'язування насіння у сорту Фаворитка в середньому становив 6,5 насінин на колос. Слід відзначити, що цей генотип характеризувався найвищим рівнем зав'язування насіння і за генетичної трансформації з використанням інших конструкцій [7].

Результатом успішної трансформації є не тільки отримання рослин із високим показником зав'язування насіння, що беззаперечно впливає на вихід рослин із трансгенним статусом, а й відображення функціональності перенесеного гена на показниках продуктивності в стресових умовах. Недостатнє вологозабезпечення є особливо критичним у фазу виходу рослин у трубку, оскільки саме в цей час відбувається значне посилення інтенсивності ростових процесів, коли стебло, листки, корені та вже ініційований колос активно ростуть. Тому дефіцит вологи в цей період може особливо впливати на продуктивність рослин. За допомогою дослідження елементів структури продуктивності можна визначити вплив тих чи інших факторів на урожайність сортів пшениці, а також виставити оцінку стійкості рослин [13].

Під час проведення порівняльного аналізу показників структури врожаю Т2 покоління біотехнологічних рослин із рослинами вихідного сорту встановлена генотипова відмінність у показниках продуктивності за умов водного дефіциту (табл.).

Із табличних даних видно, що у біотехнологічних рослин генотипів Фаворитка, Достаток та Володарка показники структури врожаю були вищими, окрім сорту Золотоколоса, де вони були на рівні контролю.

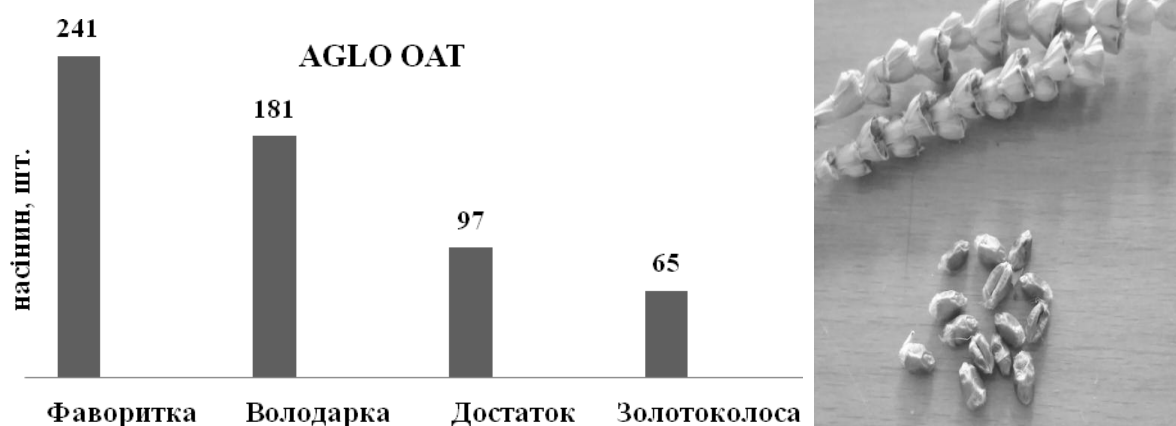


Рис. 1. Кількість отриманого насіння (T0) пшениці озимої після генетичної трансформації *in planta*.

При цьому необхідно також відмітити, що елементи продуктивності у генетично змінених рослин, вирощених за дії осмотичного стресу, були близькими до показників вихідного сорту за нормального вологозабезпечення, про що, зокрема, свідчать дані, отримані для сорту Фаворитка, середні показники елементів структури врожаю якого становили: висота рослин – 94,3 см, кількість колосків у головному колосі – 19,5 шт., маса зерна з головного колоса – 2,3 г, маса зерна з рослини – 5,1 г. Порівняння отриманих результатів свідчить про те, що стресове навантаження, створене водним дефіцитом, менш критичне для біотехнологічних рослин.

Відомо, що продуктивність є основною ознакою, яка характеризує господарську цінність сорту. Для рослин пшениці озимої вона найбільше залежить від двох елементів структу-

ри врожаю – густоти продуктивного стеблостою і маси зерна з одного колоса. У багатоколосих рослин середня маса зерна головного і бокових пагонів значно переважає масу зерна в колосах одностеблових рослин. Додаткові продуктивні стебла можуть підвищувати врожайність на 30–50 % [11].

У нашому випадку також спостерігалася значна різниця між показниками МЗГК і МЗР, що є результатом продуктивності бокових пагонів. Так, у генетично змінених рослин сорту Достаток ця різниця складала 3,5 г, на відміну від вихідного сорту, де вона становила 1,1 г. У генотипу Золотоколоса маса зерна з рослини була більшою від маси зерна з головного колоса на 2,5 г як у трансгенних, так і контрольних рослин.

Таблиця. Структурний аналіз елементів продуктивності контрольних і генетично змінених рослин пшениці озимої

Сорт	Фаворитка		Достаток		Володарка		Золотоколоса	
	Конт-роль	Транс-формант	Конт-роль	Транс-формант	Конт-роль	Транс-формант	Конт-роль	Транс-формант
ВР	71,0±4,2	86±2,0	74,0±1,7	90,3±1,9	73,3±0,3	84,3±0,9	82,0±0,6	91,6±0,9
ККГК	16,3±0,6	17,5±0,6	15,6±0,9	18,3±0,3	15,3±0,3	17,0±0,1	14,0±0,6	13,0±0,6
КЗГК	36,7±3,9	39,5±3,4	36,3±3,2	43,0±0,9	34,3±5,2	39,0±1,2	30,3±4,7	32,3±2,3
МЗГК	1,43±0,3	1,85±0,5	1,4±0,4	2,2±0,05	1,5±0,3	2,0±0,2	1,6±0,1	1,5±0,1
КЗР	97,7±6,8	107,0±4,0	81±8,5	130,3±9,8	64,0±3,7	85,3±8,8	88,7±7,1	113,3±6,0
МЗР	3,3±0,6	4,4±0,5	2,5±0,4	5,7±0,7	2,3±0,6	3,6±0,3	4,1±0,8	4,4±0,5
КП	0,45	0,48	0,44	0,49	0,45	0,47	0,49	0,46

Примітки: ВР (см) – висота рослини (головного колоса); ККГК – кількість колосків у головному колосі; КЗГК (шт.) – кількість зерен із головного колоса; МЗГК (г) – маса зерна з головного колоса; КЗР (шт.) – кількість зерна з рослини; МЗР (г) – маса зерна з рослини; КП – коефіцієнт господарської продуктивності.

Досліджуючи різні елементи структури врожаю, автори рідко згадують про таку важливу ознаку, як співвідношення зерна до соломи, а тим більше – про відношення зерна до всієї надземної маси (КП), яке у наших дослідженнях для всіх тестованих рослин коливався в межах 0,44–0,49, що відповідає рекомендаціям у селекційних програмах для пшениці, в яких говориться, що цей показник повинен бути не меншим, ніж 0,40.

Слід також зазначити, що генетично змінені рослини відрізнялися достовірно більшими значеннями висоти стебла (рис. 2).

Ріст рослин можливий за рахунок розвинутої кореневої системи, яка характерна для рослин із підвищеним синтезом орнітин-дельта-амінотрансферази. Зокрема, у попередніх наших дослідженнях було з'ясовано, що трансгенні проростки кукурудзи з додатковою копією гена *oat* мали більшу кореневу систему та випереджали в рості нетрансгенні варіанти. Також вони характеризувалися здатністю проростати

за дії модельованого засолення, створеного 1,2 % Na_2SO_4 . Відомо, що тривале культивування в умовах високого вмісту іонів чинить негативний вплив на фізіологічні процеси, викликаючи при цьому анатомічні зміни в тканинах і органах, особливо коренях, які більш чутливі до засолення [14].

Інші автори також спостерігали, що трансформанти з підвищеною експресією гена *oat* як на контрольному середовищі, так і в умовах осмотичного стресу розвивалися більш інтенсивно – мали пагони більшого розміру та формували більше коренів, ніж контрольні рослини, тобто мали підвищену здатність до зростання [15].

Нами також було помічено збільшення кореневої системи у рослин пшениці з додатковою копією гена *oat* як в умовах *in vitro* під час проведення селекції, так і під час вирощування рослин у вегетаційному досліді за умов водного дефіциту (рис. 3).

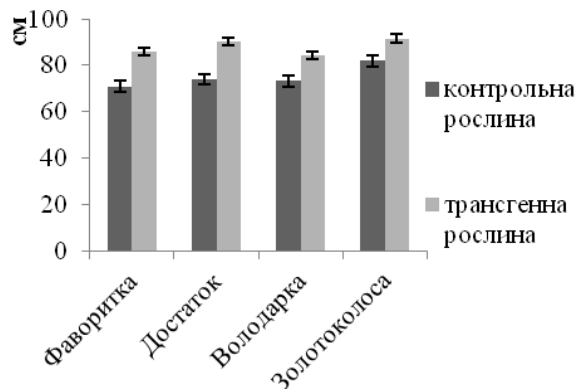


Рис. 2. Висота рослин пшениці озимої.

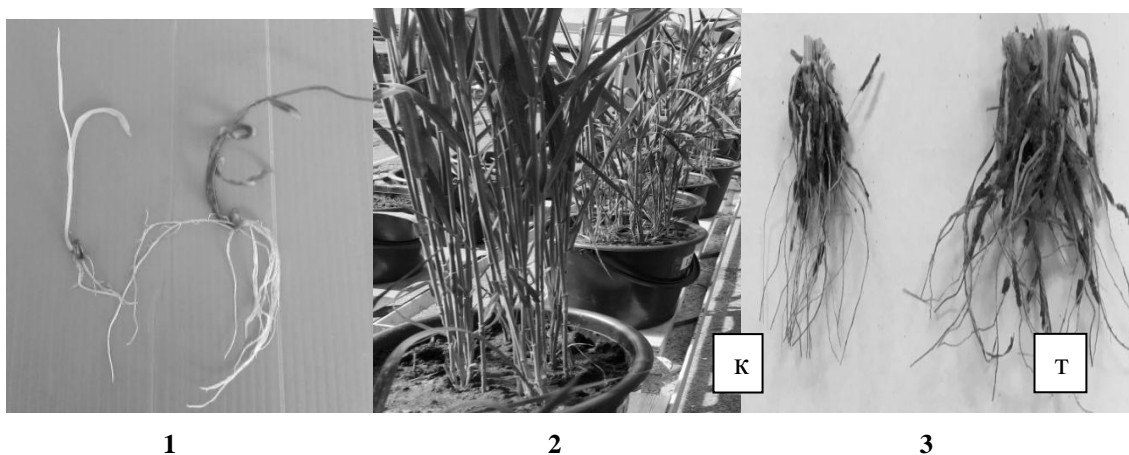


Рис. 3. Біотехнологічні рослини пшениці з геном *oat*: **1** – відбір на селективному середовищі; **2** – вирощування у вегетаційному досліді; **3** – коренева система контрольної (к) і трансгенної (т) рослин.

Для оптимального забезпечення водою і поживними речовинами рослинам необхідна добре розвинута й активна коренева система. Тому генетично змінені рослини з потужною кореневою системою були більш толерантні до посухи, що, на нашу думку, могло позитивно вплинути на показники структури врожаю.

Таким чином, порівняльний аналіз показників елементів продуктивності врожаю контрольних і насінневого покоління (Т2) генетично змінених рослин пшениці озимої в умовах водного дефіциту показав, що додаткове вбудовування копії гена *oat* в геном рослин може впливати на їх ростові параметри, зокрема на висоту стебла та розвиток кореневої системи.

Висновки

Встановлено, що за дії осмотичного стресу біотехнологічні рослини (Т2) пшениці озимої генотипів Фаворитка, Достаток, Володарка характеризувалися кращими показниками структури врожаю у порівнянні з контрольними рослинами, окрім сорту Золотоколоса, в якого ці показники достовірно не відрізнялися. Біотехнологічні рослини з додатковою копією гена *oat* за умов недостатнього вологозабезпечення були вищими, мали краще розвинену кореневу систему і утворювали більшу кількість додаткових (бічних) пагонів.

References

1. Morgun V.V., Kirisii D.A. Prospects and modern strategies for improving the physiological characteristics of wheat to increase its productivity. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 2012. Vol. 44, № 6. P. 463–483. [in Ukrainian] / Моргун В.В., Кірізій Д.А. Перспективи та сучасні стратегії поліпшення фізіологічних ознак пшениці для підвищення її продуктивності. *Фізіологія і біохімія культ. рослин*. 2012. Т. 44, № 6. С. 463–483.
2. Rybalka A.I. Wheat quality and its improving. Kyiv: Logos, 2011. 496 p. [in Ukrainian] / Рибалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення. К.: Логос, 2011. 496 с.
3. Morgun V.V. Problems of genetics and plant breeding in Ukraine at the turn of the millennium. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 2001. Vol. 33, № 5. P. 452–455. [in Ukrainian] / Моргун В.В. Проблеми генетики и селекции растений в Украине на рубеже тысячелетий. *Физиол. и биохим. культ. растений*. 2001. Т. 33, № 5. С. 452–455.
4. Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Matveyeva A.Yu., Kobernik N.I., Kochetov A.V., Tishchenko O.M., Morgun V.V. The free proline elevated levels of osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor proline dehydrogenase gene. *Plant Physiology and Genetics*. 2014. Vol. 46, № 6. P. 482–489. [in Ukrainian] / Михальська С.І., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю., Коберник Н.І., Кочетов А.В., Тищенко О.М., Моргун В.В. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супресором гена пролиндегидрогеназы. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46, № 6. С. 482–489.
5. Komisarenko A.G., Mykhalska S.I. The free proline levels in transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) T3 plants with double-stranded proline dehydrogenase gene RNA-suppressor. *Factors in experimental evolution of organisms*. Kyiv: Logos, 2017. Vol. 20. P. 211–214. [in Ukrainian] / Комісаренко А.Г., Михальська С.І. Рівень вільного проліну в Т3 трансгенних рослинах соняшника (*Helianthus annuus* L.) з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегидрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2017. Т. 20. С. 211–214.
6. Morgun V.V., Tishchenko E.N. Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv: Logos, 2014. 221 p. [in Russian]. / Моргун В.В., Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. 221 с.
7. Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Kurchii V.M., Tishchenko O.M. Agrobacterium-mediated *in planta* genetic transformation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Factors in experimental evolution of organisms*. Kyiv: Logos, 2018. Vol. 22. P. 293–298. [in Ukrainian] / Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Курчій В.М., Тищенко О.М. Генетична трансформація *in planta* пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2018. Т. 22. С. 293–298.
8. Stránská J., Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Sebela, M. Biochemical characterization of pea ornithine-δ-aminotransferase: substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*. 2010. Vol. 92. P. 940–948. doi: 10.1016/j.biochi.2010.03.026.
9. Gerasimova S.V., Kolodazhnaya Y.S., Titov S.E., Romanova A.V., Koval V.S., Kochetov A.V., Shumny V.K. Tobacco transformants expressing kDNA the ornithine amino transferase gene *Medicago truncatula*l. *Genetics*. 2010. Vol. 46, № 7. P. 1000–1003. [in Russian] / 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 гена орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*l. *Генетика*. 2010. Т. 46, № 7. С. 1000–1003.
10. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. Overexpression of ornithine-8-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002. Vol. 9. P. 73–80.
11. Likhochvor V.V. Structure of winter wheat crop. Lviv: Ukrainski tekhnologii, 1999. 200 p. [in Ukrainian] / Лихочвор В.В. Структура врожаю озимої пшениці. Львів: Українські технології, 1999. 200 с.
12. Dospikhov V.A. Methods of field experiment. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p. [in Russian] / Доспехов В.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

13. Dubrovna O.V., Chugunkova T.V., Baval A.V., Lyalko I.I. Biotechnological and cytogenetic bases for the creation of plants resistant to stress. Kyiv: Logos, 2012. 428 p. [in Ukrainian] / Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с.
14. Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Kurchii V.M., Obtaining biotech plants with increased resistance to stress. *Climate change and agriculture: challenges for science and education*: Book of abstracts of international scientific and practical conference with the support of the FAO. Kyiv, 2018. P. 453–457. [in Ukrainian] / Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Курчій В.М. Отримання біотехнологічних рослин з підвищеною стійкістю до стресів. *Кліматичні зміни та сільськогосподарські виклики для аграрної науки та освіти*: тези науково-практичної конференції за участю ФАО. К., 2018. С. 453–457.
15. Honcharuk O.M., Dubrovna O.V. Analysis of resistance osmotic transgenic wheat plants, carrying the gene ornithine aminotransferase. *Factors in experimental evolution of organisms*. Kyiv: Logos, 2017. Vol. 20. P. 173–178. [in Ukrainian] / Гончарук О.М., Дубровна О.В. Аналіз осмотостійкості трансгенних рослин пшениці, що містять ген орнітинамінотрансферази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2017. Т. 20. С. 173–178.

KOMISARENKO A. G., MYKHALSKA S. I., KURCHII V. M.

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

PRODUCTIVITY OF WINTER WHEAT PLANTS WITH THE ADDITIONAL COPY OF THE ORNITHINE- δ -AMINOTRANSFERASE GENE UNDER WATER DEFICIT CONDITIONS

Aim. The evaluation of the productivity components of wheat biotech plants with the additional copy of the ornithine- δ -aminotransferase (*oat*) gene under water stress conditions. **Methods.** Field and laboratory approaches for studying the parameters of the crop structure. **Results.** A comparative analysis of productivity components of control plants and forms, obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation were made. During plants cultivation under water deficit the genotype differences among variants were detected. **Conclusions.** It was showed that under osmotic stress pressure biotech plants (T2) of wheat winter genotypes Favoritka, Dostatok, Volodarka demonstrated better indices of crop structure compared with control plants. The differences between T2 Zolotocolosa and control plants were not essential. Biotechnological plants with the additional copy of the *oat* gene under poor water supply conditions were higher, had better developed root systems and formed the increased number of additional (lateral) shoots.

Keywords: *Triticum aestivum* L., biotechnological plants, ornithine- δ -aminotransferase gene, productivity components.