

КОМІСАРЕНКО А. Г.✉, МИХАЛЬСЬКИЙ Л. О.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0003-2081-4055, 0000-0001-8835-0862

✉ allakomisarenko2017@gmail.com, 0662374616

ДОСЛІДЖЕННЯ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ДО ПОСУХИ В НАЩАДКІВ ГЕНЕТИЧНО ЗМІНЕНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Мета. Дослідити толерантність насіннєвого покоління (Т4) генетично модифікованих рослин м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), що містять супресор гена катаболізму проліну (pdh), до осмотичного стресу, на основі аналізу фізіолого-біохімічних показників та структури врожаю. **Методи.** Визначення вмісту вільного L-проліну (Pro), фізіологічних і ростових параметрів та зернової продуктивності. **Результати.** Досліджено рівень Pro та проаналізовані ростові параметри, фізіологічний стан і основні елементи продуктивності в трансгенних та вихідних форм за умов норми/стресу/відновлення. **Висновки.** Т4 рослини пшениці за водного дефіциту характеризувались вищим відсотком і більшою швидкістю проростання насіння ніж вихідні генотипи. Показник виживання генетично змінених форм складав 76,8 %, а вихідних лише 14 %. Трансгенні проростки мали більший вміст L-проліну, порівняно з контрольними, за оптимального поливу у середньому у 1,7 раза, за водного дефіциту на 30 %. У період відновлення його рівень знижувався у вихідних форм у середньому на 49 %, а в Т4 на 28 %. В умовах оптимального зрошення досліджувані варіанти рослин не істотно відрізнялися за елементами продуктивності. Посуха призводила до їх зниження, проте у нащадків Т4 вони були менш виражені та достовірно вищі.

Ключові слова: озима пшениця, трансгенні рослини, ген проліндегідрогеназа, водний дефіцит, пролін, осмостійкість.

Провідною галуззю сільського господарства в Україні є виробництво зерна, а основною зерновою культурою – пшениця озима (*Triticum aestivum* L.). Вона має стратегічне значення, оскільки відіграє ключову роль у забезпеченні людей високоякісними продуктами харчування. Крім того, це один із найбільш важливих об'єктів досліджень у галузі біотехнології, генетики, цитогенетики, молекулярної селекції та філогенетики рослин. Тільки зміни клімату чи-

нять негативний вплив на врожайність і якість зерна цієї культури та є суттєвими обмежуючими факторами при її виробництві [1–2].

Найбільшою шкоди посівам завдає посуха. Вона порушує водний режим ґрунту, процес фотосинтезу, ґрунтове живлення, обмін речовин, що шкідливо впливає на врожайність, а інколи призводить і до загибелі посівів. Тому проблема одночасного підвищення рівня стійкості рослин до абіотичних факторів довкілля та елементів продуктивності пшениці має велике теоретичне й практичне значення [2–5].

На сьогодні застосовано багато стратегій поліпшення рослин, таких як класична і клітинна селекція, хімічне праймування та генетична інженерія [6]. Одним з альтернативних підходів останньої є створення генетично змінених рослин пшениці з комплексною стійкістю до біотичних та абіотичних стресових чинників довкілля в умовах клімату, що швидко змінюється зі збереженням і підвищенням їх продуктивності і якості [7]. Триває робота над виявленням, клонуванням і перенесенням у рослини трансгенів, що кодують утворення різних осмопротекторів, серед яких особливий інтерес становлять гени, що контролюють швидкість-лімітуючі ензими синтезу та деградації проліну, одного із найбільш багатофункціональних стресових метаболітів у рослині [8]. Використовують як додаткове введення копій кДНК відповідальних за його синтез, так і за пригнічення катаболізму. Однак низка аспектів біологічної функції цієї вільної амінокислоти та ролі окремих генів у системі регуляції її метаболізму залишаються недостатньо вивченими та спірними [8, 9].

За останні два десятиліття генетично модифіковані рослини, толерантні до абіотичних стресів, були створені шляхом зміни експресії деяких генів, відповідальних за певну ознаку, за допомогою різних методів трансформації [10]. Наші дослідження також були спрямовані на отримання трансгенних рослин м'якої пшениці з генами метаболізму проліну шляхом *Agrobac-*

terium-опосередкованої трансформації методом *in planta* [11–13]. При цьому успіх технології поліпшення цінних властивостей важливих сільськогосподарських культур полягає у сталому рівні експресії цільових трансгенів в наступних поколіннях, що у нашому випадку буде визначатися підвищеною стійкістю біотехнологічних рослин до осмотичного стресу.

Тому, метою роботи було дослідження толерантності рослин насінневого покоління генетично модифікованої пшениці до осмотичного стресу на основі аналізу показників структури врожаю та фізіолого-біохімічних характеристик.

Матеріали і методи

Матеріалом для роботи слугували рослини вихідних генотипів УК 171/19h і УК 106/19 та Т4 насінневе покоління трансформованих рослин озимої м'якої пшениці. Генетично змінені форми були отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму LBA4404, що несе бінарний вектор pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) *Arabidopsis thaliana*.

Рівень стійкості до водного дефіциту Т4 біотехнологічних рослин та їх вихідних генотипів визначали шляхом пророщування насіння та культивування проростків в умовах штучно моделюваної посухи, яку створювали додаванням до живильного середовища МС концентрацій маніту 0,5–0,8 М. Ефективність вибраних доз попередньо була протестована на нетрансгенних рослинах пшениці. Контролем слугувало поживне середовище, що не містило непроникаючий осмотик маніт. Аналізували ріст, розвиток проростків та відсоток їх виживання під час культивування в умовах осмотичного стресу протягом трьох тижнів.

Крім того, на початковому етапі вирощування, по закінченню терміну водного дефіциту та в період відновлення після нього в генетично змінених і контрольних проростках пшениці визначали вміст вільного L-проліну за методикою Чинард з модифікаціями, що ґрунтується на утворенні забарвленого продукту взаємодії Pro з нінгідриновим реактивом [11]. Рівень даної амінокислоти встановлювали в середньому із шести проростків кожного досліджуваного варіанту.

Для вимірювання фізіологічних параметрів пов'язаних із посухою Т4 рослини пшениці та їх вихідні форми вирощували у пластикових горщиках, що містили природний польовий ґрунт і культивували в закритому приміщенні за регульованих умов: протягом 16 годин світло і 8 годин темрява при 16°C. На етапі формування трьох листків половину досліджуваних рослин припиняли зрошувати, а іншу продовжували вирощувати за нормальних умов гідратації. Після 10-ти денної посухи відновлювали нормальні умови поливу водою упродовж 7 діб і визначали відсоток виживання аналізованих варіантів та кількість рослин, які повністю відновились.

Рівень стійкості нащадків трансгенних рослин пшениці також визначали в умовах вегетаційного дослідів (*in vivo*). Стресове навантаження створювали у період виходу рослин в трубку, шляхом обмеженого зволоження ґрунту в посудинах протягом 10 діб (30 % від повної вологості (ПВ)), після чого відновлювали зрошення. Паралельно рослини вихідних та трансгенних форм вирощували за умов нормального водопостачання.

Для визначення господарської продуктивності досліджуваних рослин пшениці проводили порівняльний аналіз основних показників структури врожаю Т4 біотехнологічних рослин з їх вихідними формами вирощених за нормальних умов зрошення та недостатнього поливу. Відбір зразків для структурного аналізу здійснювали у період повної стиглості зерна в 3-разовій повторності.

Результати та обговорення

Для оцінки експресії інтродукованого гена селекцію Т4 рослин пшениці проводили в умовах стресового навантаження. При цьому концентрація стрес-моделюючого компонента *in vitro* або тривалість штучно створеного стресу *in vivo* не були летальними чи надмірно затяжними. Такий підхід дозволяє відібрати стійкі варіанти, дослідити реакцію різних форм рослин на стрес, оцінити їх фізіологічний стан та провести порівняльний аналіз деяких фізіолого-біохімічних показників.

Нами було досліджено вплив різних доз непроникаючого осмотика маніту на проростання насіння контрольних і трансгенних рослин пшениці (рис. 1).

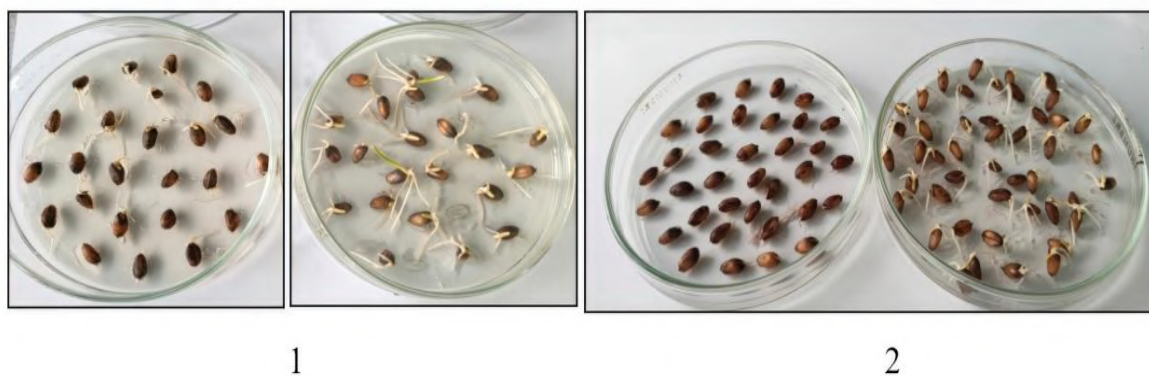


Рис. 1. Проростання насіння у вихідного генотипу і Т4 (зліва на право) генетично зміненої пшениці в умовах осмотичного стресу (0,5 – 1 та 0,8 – 2 М маніту).

Як видно із рисунка концентрація в поживному середовищі маніту 0,5 М не чинила значного токсичного впливу на швидкість і відсоток проростання насіння в аналізованих форм рослин. Попри те, що трансгенні варіанти демонстрували кращі фізіологічні показники, зі збільшенням інтенсивності стресового чинника у Т4 рослин спостерігалось уповільнення розвитку. У контрольних зразках проростання зернівок було поодиноким і відбувалося зі значним запізненням. Зменшення кількості насіння біотехнологічних рослин, що проросло за сильного стресу, може свідчити про варіабельність функціональності трансгена або його можливу інактивацію.

Також нами було проаналізовано вплив різних доз маніту на ріст і виживання проростків при культивуванні зрілих зерен вихідних та трансгенних форм пшениці на поживних середовищах, що моделюють умови водного дефіциту (рис. 2).

Більш виражений негативний ефект простежувався за концентрації маніту 0,8 М. По за-

кінченню терміну культивування на середовищі, що містило найвищу дозу стресового чинника показник виживання генетично модифікованих проростків складав 76,8 %, тоді як нетрансгенних лише 14 %. Щодо біотехнологічних рослин пшениці, то такий результат може бути пов'язаний із низьким рівнем експресії чужорідного гена. За меншої дози маніту (0,5 М) спостерігалась не значна відмінність між досліджуваними варіантами рослин. Проте проведені нами виміри довжини пагона показали суттєві переваги на користь трансгенних нащадків. Різниця за показником виживання між аналізованими формами рослин становила 22 %.

Також рівень толерантності Т4 рослин пшениці визначали, порівнюючи середні значення показників вмісту вільного L-проліну за нормальних умов культивування, після 14 добового осмотичного стресу та в період відновлення після нього. Зміни в стані Про трансгенних варіантів оцінювали відносно контролю (рис. 3).



Рис. 2. Культивування проростків вихідного генотипу (К) і трансгенної пшениці (Т) за різних доз маніту (а – 10 діб і б – 20 діб). 1 – поживне середовище МС; 2–3 – поживні середовища з додаванням 0,5 – 0,8 М маніту, відповідно.

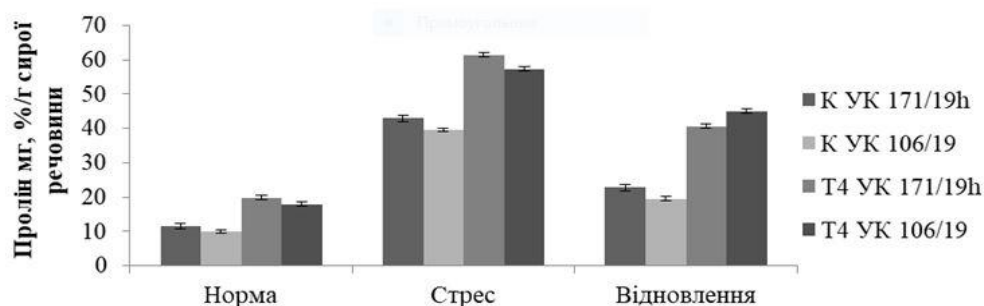


Рис. 3. Вміст вільного L-проліну у контрольних – К (вихідна форма) та в трансгенних – Т4 проростках пшениці в умовах норми/стресу/відновлення.

Так, за оптимальних умов вирощування Т4 проростки обох генотипів мали вищі показники вмісту вільного L-проліну, в порівнянні з вихідними формами, у середньому у 1,7 раза. За тривалості модельованого водного дефіциту рівень цього осмоліта підвищувався в усіх досліджуваних типів рослин. Після завершення періоду осмотичного стресу між Т4 варіантами спостерігалася незначна різниця в акумуляції Pro, однак вона була достовірною порівняно з вихідними генотипами. У нащадків біотехнологічних рослин рівень проліну зростав у середньому в три рази, тоді як у вихідних форм його вміст підвищувався майже в чотири рази, проте загальний рівень у останніх був майже на 30 % нижчим. Напевно підвищений вміст вільного L-проліну в трансгенних проростках у нормі пом'якшив наслідки впливу стресу і якраз такий рівень амінокислоти оптимальний для підтримки осмотичного статусу всього організму аналізованих типів рослин.

У період відновлення після стресу Pro знижувався як у контрольних проростків обох генотипів, так і в трансгенних варіантах у середньому на 49 % та 28 %, відповідно. Оскільки фізіологічний стан рослинних організмів може характеризувати критерій зміни вмісту L-проліну, то, мабуть саме такої кількості його необхідно для повноцінного відновлення життєздатності досліджуваних форм.

Надалі проводили порівняльний аналіз рівня стійкості насіннєвого покоління біотехнологічних рослин пшениці та їх вихідних генотипів до ґрунтової посухи при культивуванні *in vivo*. Переважна більшість досліджуваних рослин

росли нормально, хоча частково демонстрували в'янення. Затяжне зневоднення негативно впливало на проходження фізіологічних процесів як у контрольних варіантів, так і трансгенних. Однак у вихідних форм ознака дефіциту води проявлялася більш виражено, на що вказують ростові параметри аналізованих рослин та тривалість періоду відновлення була значно довшою (рис. 4).

Отримані результати свідчать на користь того, що експресія інтродукованого гена дещо підвищує толерантність трансгенної пшениці до посухи. Ймовірно для дорослих рослин вирощених *in vivo* застосований термін її дії був незначний. Хоча негативні наслідки стресового фактора демонструють проаналізовані нами ростові параметри, за якими генетично модифіковані рослини випереджали нетрансгенні форми.

Для встановлення залежності пов'язаної з рівнем експресії генів катаболізму проліну і стрес-стійкістю рослин досліджували деякі елементи продуктивності нащадків Т4 пшениці та їх вихідних генотипів за умов оптимального і недостатнього поливу, штучно створюваного в критичний період вегетації (табл.).

За умов нормального зрошення Т4 рослини пшениці та їх вихідні форми не суттєво відрізнялися за структурою врожаю. Хоча серед нащадків біотехнологічних рослин кращими елементами продуктивності характеризувався генотип УК 106/19, зокрема кількістю зерна з головного колоса, масою зерна з головного колоса та з рослини. При цьому маса 1000 зерен була однаковою в усіх аналізованих формах.

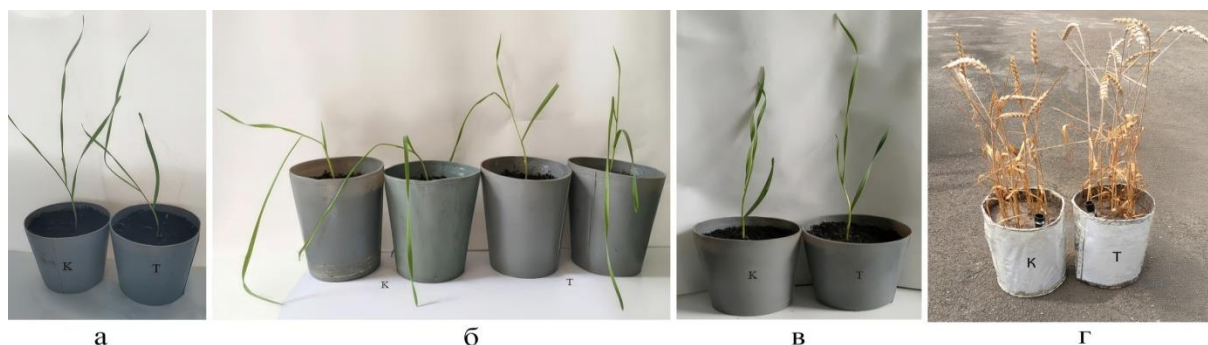


Рис. 4. Ростові параметри та стан рослин пшениці вихідної форми (К – зліва) і трансформантів (Т – справа): а – за оптимального поливу водою; б – за водного дефіциту; в – у період відновлення після стресу; г – у фазу повної стиглості зерна.

Таблиця. Показники структури урожайності рослин вихідних форм та насіннєвого покоління генетично зміненої пшениці озимої за умов задовільного водозабезпечення та дефіциту води

Генотип	КЗГК, шт.		МЗГК, г	МЗР, г	МТЗ, г
	Норма (70 % ПВ)				
УК 171/19h	К	41,8±1,2	1,8±0,04	2,7±0,8	43,0±1,1
	T4	43,3±1,0	1,9±0,02	2,9±0,4	43,9±0,5
УК 106/19	К	44,1±1,6	1,9±0,07	2,8±0,4	43,1±0,7
	T4	48,0±1,3	2,1±0,03	3,1±0,4	43,8±0,4
Водний дефіцит (30 % ПВ)					
УК 171/19h	К	37,3±1,4	1,5±0,04	2,2±0,6	40,2±0,4
	T4	41,1±1,3	1,8±0,06	2,6±0,2	43,8±0,4
УК 106/19	К	40,3±1,4	1,7±0,04	2,4±0,6	42,2±0,4
	T4	45,3±1,0	1,9±0,03	2,9±0,6	41,9±0,2

Примітки: КЗГК – кількість зерна у головному колосі, МЗГК – маса зерна з головного колосу, МЗР – маса зерна з рослини, МТЗ – маса тисячі зерен; ПВ – повна вологосмкість; К – вихідний генотип, T4 – насіннєве покоління трансгенних рослин.

Після осмотичного стресу відбувалось зниження показників урожайності, відносно оптимальних умов вирощування, проте у вихідних генотипів воно було більш істотним. Так, зернова продуктивність колосу головного пагону в контрольних рослин УК 171/19h і УК 106/19, порівняно з варіантом 70 % ПВ, зменшувалась на 16,7 % та 10,5 %, відповідно. Тоді як у T4 рослин генотипу УК 171/19h ця різниця була на рівні 11,4 %, а в УК 106/19 незначною.

Щодо показника МЗР то більш вираженим його зниженням характеризувались вихідні форми. Так у контрольних рослин генотипів УК 171/19h та УК 106/19 він був меншим на 18,5 % і 14,3 %, а в T4 на 10,4 % і 6,5 %, відповідно. Маса 1000 зерен у рослин вихідного генотипу УК 171/19h, порівняно з варіантом 70 % ПВ, була нижчою на 6,5 %, проте у нащадків T4 взагалі не було виявлено змін відносно виповненості зерна. Для контрольних і трансгенних рослин УК 106/19 різниця за цим показником була не суттєвою і складала 2 % і 4 %, відповід-

но. Також незначна відмінність спостерігалась і за довжиною головного пагону, у межах 5–6 см (рис. 4, г).

Отже, різна чутливість досліджуваних об'єктів до дії стресу відображалась на елементах продуктивності за якими насіннєве покоління генетично змінених рослин характеризувалось кращою врожайністю, оскільки ефект від експресії трансгенів проявлявся за стресового навантаження.

Висновки

Таким чином, культивування вихідних форм і T4 біотехнологічних рослин пшениці озимої за дії водного дефіциту дозволило встановити рівень їх сприйнятливості до перенесеного стресу та пов'язати його зі змінами вмісту вільного L-проліну, фізіологічного стану, ростових параметрів та зернової продуктивності.

Генетично модифіковані рослини в умовах осмотичного стресу характеризувались вищим відсотком і більшою швидкістю пророс-

тання насіння та кращим показником виживання проростків, відносно вихідних генотипів. Трансгенні варіанти мали переваги в акумуляції Pro за всіх аналізованих умов вирощування, що

відіграло провідну роль у підвищенні стійкості рослин до осмотичного стресу і подоланні його наслідків та позитивно відображалось на елементах продуктивності.

References

1. Nowsherwan I., Shabbir G., Malik S. I., Ilyas M. Effect of drought stress on different physiological traits in bread wheat. *Journal of Agriculture*. 2018. Vol. 16 (1). P. 1–6. <https://doi.org/10.3329/sja.v16i1.37418>.
2. Ulich L. Winter wheat yield in drought conditions. *Proposal - Main Journal of Agribusiness*. Kyiv, 2008. Retrieved from: <https://propozitsiya.com/ua/urozhaynist-ozimoyi-pshenici-v-umovah-posuhi>. [in Ukrainian]
3. Esmaeili N., Shen G., Zhang H. Genetic manipulation for abiotic stress resistance traits in crops. *Frontiers Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 1011985. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1011985>.
4. Budak H., Hussain B., Khan Z., Ozturk N. Z., Ullah N. From Genetics to Functional Genomics: Improvement in Drought Signaling and Tolerance in Wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. P. 1012. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01012>.
5. Kapoor D., Bhardwaj S., Landi M., Sharma A., Ramakrishnan M., Sharma A. The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied Sciences*. 2020. Vol. 10 (16). P. 5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>.
6. Kumar K., Gambhir G., Dass A., Tripathi A. K., Singh A., Jha A. K., Yadava P., Choudhary M., Rakshit S. Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*. 2020. Vol. 251 (4). P. 91. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>.
7. Rivero R. M., Mittler R., Blumwald E., Zandalinas S. I. Developing climate resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *Plant J*. 2022. Vol. 109 (2). P. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>.
8. Dubrovna O. V., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G. Using proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology and Genetics*. 2022. Vol. 56 (4). P. 361–378. <https://doi.org/10.3103/S009545272204003X>.
9. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Zehra A., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R. S. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*. 2019. Vol. 5. (12). P. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>.
10. Wang K., Riaz B., Ye X. Wheat genome editing expedited by efficient transformation techniques: progress and perspectives. *The Crop Journal*. 2018. Vol. 6 (1). P. 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.09.009>.
11. Komisarenko A. G., Mikhalska S. I., Kurchii V. M. Agrobacterium-mediated transformation is a method of genetic modification of *Triticum aestivum* L. plants. *Factors of experimentation evolution of organism*. 2022. Vol. 30. P. 85–90. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1466>. [in Ukrainian]
12. Dubrovna O. V., Priadkina G. O., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G. Drought-tolerance of transgenic winter wheat with partial suppression of the proline dehydrogenase gene. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2022. Vol. 13 (4). P. 385–392. <https://doi.org/10.15421/022251>.
13. Mikhalska S. I., Komisarenko A. G. Inheritance of signs of resistance to osmotic stresses in genetically modified wheat. *Factors of experimentation evolution of organism*. 2024. Vol. 35. P. 187–192. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v34.1636>. [in Ukrainian]

KOMISARENKO A. G., MYKHALSKIY L. O.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

STUDY OF ADAPTIVE POTENTIAL TO DROUGHT IN OFFSPRING OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT PLANTS (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Aim. To investigate the tolerance of the seed generation (T4) of genetically modified common wheat plants (*Triticum aestivum* L.) containing a suppressor of the proline catabolism gene (*pdh*) to osmotic stress, based on the analysis of physiological and biochemical parameters and yield structure. **Methods.** Determination of free L-proline (Pro) content, physiological and growth parameters and grain yield. **Results.** The Pro level was investigated and growth parameters, physiological state and main elements of yield were analyzed in transgenic and original forms under normal/stress/recovery conditions. **Conclusions.** T4 wheat plants under water deficit were characterized by a higher percentage and faster seed germination rate than the original genotypes. The survival rate of genetically modified forms was 76.8 %, while the original ones were only 14 %. Transgenic seedlings had a higher L-proline content, compared to the control ones, under optimal irrigation by an average of 1.7 times, and under water deficit by 30 %. During the recovery period, its level decreased in the initial forms by an average of 49 %, and in T4 by 28 %. Under optimal irrigation conditions, the studied plant variants did not significantly differ in productivity elements. Drought led to their decrease, but in T4 descendants they were less pronounced and significantly higher.

Keywords: winter wheat, transgenic plants, proline dehydrogenase gene, water deficit, proline, osmosis resistance.