

МИХАЛЬСЬКА С. І.[✉], КОМІСАРЕНКО А. Г.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-6644-5921, 0000-0003-2081-4055

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.com, 0503806515

АНАЛІЗ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ, ЩО ОБУМОВЛЮЮТЬ ПІДВИЩЕННЯ ОСМОСТІЙКОСТІ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ ПШЕНИЦІ

Мета. Дослідити фізіолого-біохімічні характеристики насіннєвого покоління (Т4) генетично модифікованої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) за осмотичного стресу.

Методи. Аналіз активності проліндегідрогенази (ПДГ), вмісту вільного L-проліну (Pro), вуглеводів та білка. **Результати.** Встановлено активність *pdh*, вміст проліну, білків та вуглеводів за умов нормального поливу, водного дефіциту та регідратації. **Висновки.** Показано, що генетично модифіковані рослини з частковою супресією *pdh* демонструють зміни у комплексі фізіолого-біохімічних параметрів, які сприяють підвищенню осмостійкості. Вони характеризуються зниженою активністю проліндегідрогенази та підвищеним рівнем проліну. У процесі зневоднення вміст Pro у Т4 рослин зростав і залишався підвищеним у перші години після відновлення зволоження, що сприяло підтримці вуглеводного балансу. Співвідношення сахароза/моноцукри у трансгенних варіантів залишалося стабільним незалежно від умов культивування. Аналіз вмісту білка показав, що за достатнього зволоження його рівень у Т4 рослин та вихідних генотипів був майже однаковим. Водночас у контрольних рослин за умов водного стресу спостерігалось підвищення білкового вмісту, що може свідчити про активацію синтезу білків стресової відповіді.

Ключові слова: пшениця, пролін, проліндегідрогеназа, вуглеводи, білок, осмостійкість.

На сьогодні одним із головних завдань селекціонерів і генетиків є підвищення стійкості рослин до водного дефіциту. Серед культурних рослин значну увагу привертає пшениця, яка є однією з найважливіших продовольчих культур у світі [1].

Потужним інструментом у селекції пшениці є сучасні методи генетичної інженерії, які мають значний потенціал для підвищення стійкості до стресових факторів та покращення ряду

господарсько-цінних ознак [1, 2]. Одним із механізмів, що застосовується у біотехнологічних маніпуляціях, є біологічний процес регуляції активності генів через утворення коротких дволанцюгових фрагментів рибонуклеїнових кислот та синтез спеціальних ферментів, які індукують селективну деградацію цільових нуклеїнових кислот [3]. Це значно підвищує варіабельність за певними ознаками, прискорює отримання рослин із заданими властивостями, а також, що особливо важливо, дозволяє відстежувати генетичні зміни та їх наслідки. Застосування методів генетичної інженерії суттєво розширює можливості створення рослин, як цінного вихідного матеріалу. Крім того, генетично модифіковані рослини є унікальними об'єктами для вивчення фундаментальних механізмів функціонування генів і особливостей метаболічних процесів, вплив трансгенів, на які досі залишається недостатньо дослідженим.

Відомо, що генетична трансформація може спричиняти як передбачувані зміни фізіолого-біохімічних характеристик рослин у разі перенесення гена, пов'язаного з певною ознакою, так і несподівані зміни, якщо інтегрований ген відповідає за інші процеси [4]. У сучасній науковій літературі активно обговорюються відмінності у метаболізмі між трансгенними рослинами та рослинами дикого типу [5]. Водночас часто бракує детальної інформації про конкретні зміни, що відбуваються у трансгенних рослинах, а також про вплив перенесеного гена та його продуктів на функціонування рослинного організму.

У сфері селекції пшениці, спрямованій на підвищення стійкості до осмотичних стресів, значна увага приділяється генам, що контролюють метаболізм «сумісних осмолітів» [6]. Особливий інтерес викликають гени залучені до синтезу та катаболізму вільного проліну, зокрема ті, що кодують ключові ферменти його біосинтезу та деградації — $\Delta 1$ -пірролін-5-карбоксилатсинтетаза (P5CS) та проліндегідрогеназа (PDH). За-

галом на сьогодні роль проліну в осмотичній регуляції та підвищенні стійкості рослин до зневоднення клітин, викликаного посухою, засоленням або екстремальними температурами, досить добре вивчена [7]. Помірне підвищення рівня Pro, характерне для початкових етапів стресової дії, виконує регуляторну та антиоксидантну функції, тоді як більш істотне на пізніх стадіях стресової відповіді може сприяти осмопротекції [7, 8]. Водночас багато аспектів біологічної ролі цієї вільної амінокислоти, а також функції окремих генів у регуляції її метаболізму залишаються недостатньо дослідженими та неоднозначними.

Крім того, при застосуванні будь-яких біотехнологічних маніпуляцій з генами завжди необхідним є дослідження прояву нової ознаки в поколіннях. Особливо це актуально при отриманні стресостійких рослин, оскільки трапляються випадки елімінації набутої характеристики [8, 9]. Важливим для розуміння комплексної дії фізіологічних і генетичних механізмів стійкості пшениці до посухи є визначення фенотипічних ознак, що вносять вклад у підвищення врожайності у стресових умовах. До таких належать: зменшена довжина стебла, що корелює з високим збиральним індексом; скорочений період від цвітіння до стиглості, що дозволяє уникнути тривалого впливу температурного стресу; розгалужена та глибока коренева система, яка забезпечує ефективне поглинання води з ґрунту; висока щільність провідних тканин, інтенсивна транспірація та низка інших фізіологічних характеристик [9].

Враховуючи вищенаведене, важливим є визначення фізіолого-біохімічних характеристик насіннєвих поколінь трансгенних рослин м'якої пшениці за нормальних та стресових умов.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугувало насіннєве покоління T4 генетично модифікованих рослин пшениці озимої УК 106/19, УК 171/19h, УК 95/17 з інтегрованим дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази та їх вихідні форми.

Аналіз рівня стійкості трансгенних рослин проводили в умовах вегетаційного досліду, за природного освітлення. У посудинах ємністю 10 л, наповнених ґрунтосумішшю, культивували по

6 рослин вихідного генотипу (контроль) та насіннєвого покоління T4. На початкових етапах вегетації вологість ґрунту підтримували на рівні 70 % повної вологоємності (ПВ). У фазі виходу у трубку половину посудин піддавали осмотичному стресу, знижуючи вологість ґрунту до 30 % ПВ та підтримуючи цей рівень протягом 10 діб, після чого полив відновлювали. Решту рослин продовжували вирощувати за умов оптимального зволоження (70 % ПВ). Середню пробу для визначення біохімічних показників формували шляхом об'єднання шести прапорцевих листків окремих рослин. Відбір зразків для аналізу здійснювали у триразовій повторюваності. Вміст вільного проліну в досліджуваних рослинах визначали за модифікованою методикою Чинарда [10]. Активність PDH оцінювали за швидкістю використання НАД⁺ на окиснення Pro, вимірюючи збільшення концентрації утвореного НАДН за одиницю часу [10]. Кількість білка в рослинному матеріалі визначали за методом Лоурі [11]. Вміст сахарози вимірювали резорциновим методом після фіксації рослинного матеріалу киплячим етанолом та триразового екстрагування цукрів 80 %-м етанолом, моноцукри — арсеномолібдатним методом [11].

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

Результати та обговорення

Результативність генетичної модифікації у підвищенні їхньої стійкості до стресових умов значною мірою залежить від стабільності та інтенсивності експресії введених генів. Успадкування інтродукованих генів та їхню експресію в T4 пшениці оцінювали за рівнем активності проліндегідрогенази. Для безпосередньої оцінки впливу введеної конструкції на експресію гена *pdh* було проведено порівняння активності фермента в прапорцевих листках трансформованих рослин і вихідних генотипів за оптимального зволоження (70 % ПВ) та за дефіциту води (10 діб при 30 % ПВ). Активність проліндегідрогенази оцінювали, вимірюючи збільшення концентрації НАДН за одиницю часу при окисненні проліну (табл.).

Таблиця. Активність ферменту проліндегідрогенази у листках Т4 рослин і їх вихідних форм за умов нормального поливу та дефіциту води

Генотип	Активність ферменту, нмоль НАДН/хв×мг білка			
	Умови поливу		Умови посухи	
	Вихідні форми	Т4	Вихідні форми	Т4
УК 106/19	1,8±0,4	1,4±0,3	1,4±0,2	0,9±0,1
УК 95/17	2,2±0,6	1,5±0,4	1,8±0,3	1,1±0,1
УК 171/19h	2,4±0,4	1,8±0,3	1,8±0,4	1,3±0,3

Показано, що порівняно з контрольними рослинами (вихідні форми) активність PDH за нормальних умов поливу у рослин пшениці Т4, з дволанцюговим РНК супресором гена проліндегідрогенази, була нижчою майже в 1,3 раза для генотипів УК 106/19 та УК 171/19h і в 1,7 рази для генотипу УК 95/17. Це може свідчити про збереження функціональності елементів введеної генетичної конструкції та РНК-інтерференцію гена *pdh* у рослин Т4 пшениці.

За дії осмотичного стресу активність ферменту зменшувалася як у контрольних, так і генетично модифікованих рослинах. Це узгоджується з результатами досліджень в яких встановлено, що за даних умов накопичення Pro контролюється підвищенням експресії генів біосинтезу та зниженням експресії генів його катаболізму [12]. Нами показано, що зменшення активності PDH для вихідних форм становило від 19 до 25 %, а для трансгенних рослин від 27 до 36 %, що може свідчити про додаткову супресію гена *pdh*.

Таким чином встановлено, що пригнічення експресії гена проліндегідрогенази приводить до зниження активності ферменту у Т4 рослин, результатом чого має бути підвищення акумуляції проліну та осмостійкості рослин пшениці. При цьому, дослідження змін вмісту вільного Pro за

нормальних умов та водного дефіциту дозволить виявити прояв адаптивних реакцій в аналізованих рослин.

На першу добу після припинення зволоження ґрунту рівень проліну залишався відносно невисоким у всіх генотипів, при цьому у трансгенних рослин, із частково супресованою активністю гена проліндегідрогенази, спостерігалася достовірна перевага за цим показником (рис. 1).

Подальше зневоднення приводило до зростання рівня Pro у всіх досліджуваних варіантах. Так, на десяту добу його вміст у контрольних рослин підвищився в середньому більш ніж утричі, тоді як у генетично модифікованих – майже вдвічі. Водночас рівень вільного проліну в Т4 рослин за умов водного дефіциту був значно вищим, ніж у вихідних форм, і зберігався протягом перших годин після регідратації. Це свідчить, що у генетично модифікованих рослин за стресових умов накопичення Pro відбувається не лише завдяки його посиленому синтезу, а й через часткову супресію гена проліндегідрогенази. На користь цього вказують також показники вмісту вільного проліну після відновлення поливу, коли у вихідних форм його рівень знижувався майже вдвічі від максимальних значень (на 40–50 %), тоді як у Т4 рослин скорочувався в середньому лише на 22 %.

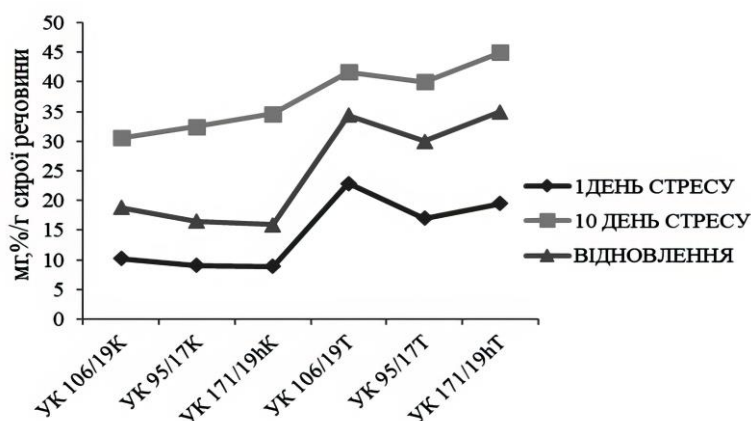


Рис. 1. Вміст вільного проліну в трансгенних рослинах (Т4) та вихідного генотипу (К) за умов зневоднення / регідратації.

Відомо, що за високої концентрації ендогенний пролін може виконувати роль регуляторної або сигнальної молекули, здатної змінювати рівень транскрипції генів, пов'язаних зі стресовою відповіддю. Зокрема, продукти його катаболізму можуть індукувати експресію осмочутливих генів, що кодують білки, необхідні для специфічної адаптації до стресу. При цьому, на тлі загальної тенденції до пригнічення синтезу нормальних білків, відбувається посилений синтез стресових білків [13]. Нами встановлено, що за оптимальних умов загальна кількість білка у вихідних форм та Т4 рослин достовірно не відрізнялася й у середньому становила $43,2 \pm 2,4$ мг/г сирової маси для генотипу УК 95/17 та $49,5 \pm 3,5$ мг/г для УК 171/19h.

Після періоду дефіциту вологи, порівняно з нормальними умовами вирощування, рівень білка підвищувався лише у контрольних рослин — у середньому на 2,4 % для генотипу УК 95/17 та майже на 3 % для УК 171/19h. Це може свідчити про захисну реакцію рослин на стрес, що реалізується через синтез білків стресової відповіді. Натомість у Т4 рослин за стресових умов спостерігалось незначне зниження загального вмісту білка — у середньому в 1,2 рази для обох досліджуваних генотипів. Це, ймовірно, є адаптивною відповіддю, спрямованою на економію енергетичних ресурсів клітини, або ж свідчить про перебіг метаболічних процесів, що супроводжуються залученням білкових макромолекул до виконання широкого спектра функцій.

Під час зневоднення у захисті білково-ліпідного комплексу, окрім проліну, протекторну

функцію виконують вуглеводи [14]. Вони сприяють захисту білків від денатурації та підвищують осмотичний потенціал клітин, діючи як осмопротектори. Перебудова вуглеводного метаболізму, яка відбувається під впливом стресів, орієнтована на адаптацію рослин до несприятливих умов. Моносахариди беруть участь у процесах, що активуються сахарозою, тому взаємозв'язок між цими вуглеводами і змінами у співвідношенні сахароза/моносахариди є важливим аспектом формування реакції на стрес. У межах нашого дослідження було проаналізовано вміст сахарози та моноцукрів у клітинах Т4 рослин трансгенної пшениці і вихідного генотипу за звичайних умов вирощування та під впливом водного дефіциту (рис. 2).

Встановлено, що на початкових етапах осмотичного стресу вміст сахарози в тканинах контрольних рослин пшениці був дещо нижчим, ніж у генетично змінених рослин. Це свідчить про можливі відмінності в механізмах регуляції вуглеводного метаболізму між контрольними і трансгенними рослинами на ранніх етапах стресу. Із продовженням терміну зневоднення у рослин Т4 вміст сахарози знижувався в 1,5 рази для обох досліджуваних генотипів, що підтверджує їх здатність до метаболічних змін під впливом водного дефіциту. Проте у рослин вихідних форм рівень сахарози майже не змінювався, що може вказувати на відсутність значної адаптаційної реакції або на обмежену здатність цих рослин до регулювання вуглеводного балансу при осмотичному стресі.

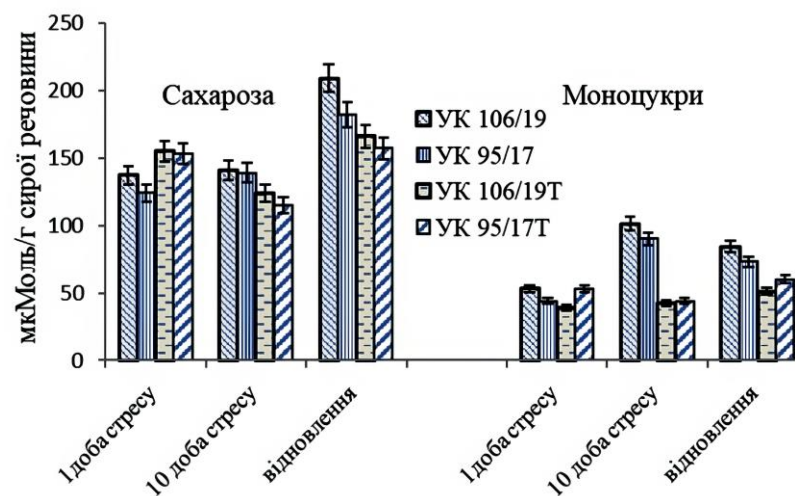


Рис. 2. Вміст сахарози та моноцукрів у листках генетично модифікованих рослин та їх вихідних форм за різних умов культивування.

Після відновлення поливу вміст сахарози зростав у всіх досліджуваних рослин в 1,3–1,5 рази, з перевагою вихідних генотипів, що може свідчити про більш ефективну реакцію на відновлення водного балансу у контрольних рослин. У трансгенних рослин цей процес, ймовірно, більш стабільний, що підтверджує їх адаптивні особливості до змін умов навколишнього середовища.

Аналогічні зміни спостерігались і у рівнях моноцукрів. У контрольних рослин їх рівень збільшувався майже в 2 рази при водному дефіциті, що може бути механізмом для підтримки осмотичного потенціалу клітин та забезпечення функціонування біохімічних процесів за умов зневоднення. Після регідратації рівень моноцукрів знижувався в середньому на 20 %, що вказує на їх використання як осмопротекторів та участь у процесах стабілізації клітинних структур. У генетично модифікованих рослин вміст моноцукрів залишався стабільним, що свідчить про більш стійку регуляцію вуглеводного метаболізму в умовах зміненої гідратації.

Щодо балансу сахароза/моносахариди, то у контрольних рослин це співвідношення знижувалось при зневодненні та нормалізувалось після регідратації, що є показником адаптаційної відповіді на осмотичний стрес. У трансгенних рослин цей показник майже не змінювався, що може вказувати на більш сталу регуляцію вуглеводного метаболізму незалежно від змін водного режиму.

На нашу думку, вплив на встановлення вуглеводного балансу у генетично змінених рослин міг мати пролін. Рівень якого у Т4 рослин був значно вищим, ніж у контрольних варіантів і зростав при посиленні водного дефіциту. Це може бути пов'язано з його роллю в захисті клітин від стресу та збереженні їх гідратації. Крім того, рівень проліну підтримувався протягом перших годин після регідратації, що вказує на важливість цього амінокислотного метаболіту в механізмах адаптації до водного стресу та відновлення після нього. Результати досліджень показують, що генетично модифіковані рослини Т4 мають стабі-

льніші механізми регуляції вуглеводного та осмопротекторного метаболізму, що може бути обумовлено збільшеною кількістю проліну.

Різна чутливість досліджуваних об'єктів до дії перенесеного стресу відображалась на ростових параметрах рослин. Результати досліджень показали, що Т4 рослини переважали їх вихідні форми за висотою головного стебла та довжиною головного колоса. Зокрема, їх стебла були на 5–7 см вищими, а головний колос — на 0,4–0,6 см довшим у фазу повної стиглості зерна. Це може свідчити про те, що рослини Т4 мають кращу адаптацію або здатність компенсувати вплив перенесеного стресу порівняно з вихідними формами.

Таким чином, порівняльне дослідження реакцій рослин пшениці на дію водного дефіциту показало збереження адаптаційних властивостей до його впливу у Т4 рослин. При цьому вільний пролін виступав як стрес-протекторна сполука для генетично змінених варіантів, і підвищення його вмісту сприяло оптимізації балансу вуглеводного складу в умовах стресу, що позитивно впливало на ростові параметри.

Висновки

Показано, що генетично модифіковані рослини з частковою супресією *pdh* демонструють зміни у комплексі фізіолого-біохімічних параметрів, які сприяють підвищенню осмостійкості. Вони характеризуються зниженою активністю проліндегідрогенази та підвищеним рівнем проліну. У процесі зневоднення рівень Pro у Т4 рослин зростав і залишався підвищеним у перші години після відновлення зволоження, що сприяло підтримці вуглеводного балансу. Співвідношення сахароза/моноцукри у трансгенних варіантів залишалося стабільним незалежно від умов культивування. Аналіз вмісту білка показав, що за оптимального зволоження його рівень у Т4 рослин та вихідних генотипів суттєво не відрізнявся. Водночас у контрольних рослин за умов водного стресу спостерігалось підвищення білкового вмісту, що може свідчити про активацію синтезу білків стресової відповіді.

References

1. Morgun VV., Dubrovna O. V., Morgun B. V. Modern biotechnologies for stress-resistant wheat plants. *Fiziologiya rasteniy i genetika*. 2016. Vol. 48 (3). P. 196–213. [in Ukrainian]
2. 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. Vol. 18 (11). P. 2483–2491. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62083-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62083-0).
3. Khan H. Genetic improvement for end-use quality in wheat. Springer Nature. Switzerland. 2019. 253 s. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04609-5_12.

4. Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant Journal*. 2017. Vol. 91 (4). P. 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>.
5. Shrawat A. K., Armstrong C. L. Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2018. Vol. 37 (1). P. 1–87. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1514718>.
6. Joshi R., Anwar K., Das P., Sneh L. S.-P. Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. In *Wheat Biotechnology*; Springer: New York, NY, USA. 2017. Vol. 1679. P. 83–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5.
7. Kolupaev Yu. E., Vainer A. A., Yastreb T. O. Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *The bulletin of Kharkiv national agrarian university. Ser. Biol.* 2014. Vol. 2 (32). P. 6–22. Retrieved from: <https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/9047>. [in Russian]
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. Ahmad M., Zaffar G., Razvi S. M., Dar Z. A., Mir S. D., Bukhari S. A., Habib M. Resilience of cereal crops to abiotic stress: a review. *African J. Biotechnology*. 2014. Vol. 13 (29). P. 2908–2921. doi: 10.5897/AJBX2013.13532.
10. Mykhalska S. I., Komisarenko A. G., Kurchii V. M. Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmo-stability. *Factors of experimentation evolution of organism*. 2021. Vol. 28. P. 94–99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>. [in Ukrainian]
11. Sakalo V. D., Larchenko K. A., Kurchii V. M. Synthesis and metabolism of sucrose in leaves of corn seedlings under conditions of water deficit. *Physiology and biochemistry cult. plants*. 2009. Vol. 41 (4). P. 305–313. [in Ukrainian]
12. Sergeeva L. E., Mykhalska S. I., Komisarenko A. G., Modern biotechnologies for increasing the resistance of plants to osmotic stress. Kyiv : Condor. 2019. 161 s. [in Russian]
13. Kosakovskaya I. V. Stress proteins of plants. Kyiv : Fitosotsiotsentr, 2008. 153 s. [in Russian]
14. Proels R. K., Hüchelhoven R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Mol. Plant Pathol.* 2014. Vol. 15. P. 858–864.

MYKHALSKA S. I., KOMISARENKO A. G.

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

ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL INDICATORS THAT CAUSE THE INCREASE IN OSMO-RESISTANCE OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT

Aim. To investigate the physiological and biochemical characteristics of the seed generation (T4) of genetically modified wheat (*Triticum aestivum* L.) with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase (*pdh*) gene under osmotic stress. **Methods.** Proline dehydrogenase (PDH) activity assay, free L-proline (Pro) content; carbohydrates and protein. **Results.** The activity of proline dehydrogenase, the content of proline, proteins and carbohydrates under conditions of normal irrigation, water deficit and irrigation restoration were determined. **Conclusions.** It has been shown that genetically modified plants with partial suppression of *pdh* demonstrate changes in the complex of physiological and biochemical parameters that contribute to increased osmototoxicity. They are characterized by reduced activity of proline dehydrogenase and increased levels of proline. During dehydration, the level of Pro in T4 plants increased and remained elevated in the first hours after rehydration, which contributed to maintaining carbohydrate balance. The sucrose/monosaccharide ratio in transgenic variants remained stable regardless of cultivation conditions. Analysis of protein content showed that under optimal hydration, its level in T4 plants and the original genotypes did not differ significantly. At the same time, in control plants under water stress conditions, an increase in protein content was observed, which may indicate activation of the synthesis of stress response proteins.

Keywords: wheat, proline, proline dehydrogenase, carbohydrates, protein, osmotic stability.