

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

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОСТІ ТРАНСГЕНА В Т2 БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ОЗНАКОЮ ОСМОСТІЙКОСТІ

Мета. Дослідити функціональність трансгена в насінневному поколінні (Т2) генетично-змінених рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) за показниками продуктивності в умовах нормального і недостатнього водозабезпечення. **Методи.** Визначення показників структури врожаю та кількості білка. **Результати.** Проаналізовані показники продуктивності контрольних і Т2 біотехнологічних рослин за нормальних умов вирощування та дефіциту води. Визначений кількісний склад білка в умовах до і після осмотичного стресу та в період регідратації. **Висновки.** З'ясовано, що за дії водного дефіциту відбувається зниження показників продуктивності для всіх досліджуваних рослин. При цьому генетично-змінені рослини мали перевагу за основними елементами структури врожаю над вихідною формою за обох аналізованих умов вирощування. Встановлено, що за нормальних умов гідратації кількість білка у досліджуваних рослинах достовірно не відрізнялася. Зафіксовано підвищення його вмісту у контрольних рослинах за дії осмотичного стресу, що може свідчити про синтез білків стресової відповіді. Зниження вмісту білка в період регідратації може вказувати на проходження звичайних метаболічних процесів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., біотехнологічні рослини, ген проліндегідрогенази, структурний аналіз врожаю, осмостійкість.

Глобальні екологічні зміни – підвищення температури, водний дефіцит, засолення, забруднення важкими металами ґрунтів і т. д. – призводять до негативних наслідків: зниження потенціалу родючості земельних територій, зміни технології й ареалу вирощування багатьох культур, втрати врожайності і навіть до загибелі рослин. У зв'язку з цим особлива увага науковців біологічного та сільськогосподарського профілю зосереджена на проблемі підвищення рівня стійкості рослин до дії абіотичних стресів [1–4].

Стійкість рослин контролюється складною молекулярно-генетичною системою, яка запускає певний стрес-реагуючий механізм, що забезпечує гомеостаз та захищає від руйнування білки і клітинні компоненти. На відміну від стійкості до біотичних стресів, яка переважно контролюється поодинокими генами, абіотичні стреси експресують мультигенну систему, тому контроль та інженерія резистентності до того чи іншого негативного впливу є достатньо складними. Створення стійких до абіотичних стресів рослин базується на експресії генів, які беруть участь у сигнальних та регуляторних системах, у процесі запуску синтезу стресових білків, функціональних і структурних метаболітів [5, 6].

Утворення стресових поліпептидів асоціюється з розвитком стійкості рослин, тобто розглядається в параметрі адаптаційних змін на макромолекулярному рівні [6]. Комплекс ранніх реакцій на дію стресора також передбачає підвищення вмісту «стресових» фітогормонів, зокрема таких, як АБК та етилен, і синтез великої групи стресових білків, які є ключовим компонентом, що формує клітинний гомеостаз у стресових умовах [7].

Відомо, що після дії стресових чинників на організм відбувається зміна гормонального статусу рослин. Це призводить до гальмування росту, обмін речовин переводиться в режим відносного спокою, енергетичні процеси перемикаються на підтримку цілісності рослини, відновлення і репарацію пошкоджень. Необхідність у синтезі захисних речовин змушує рослини спрямовувати на це матеріальні ресурси, внаслідок чого ростові і формотворні процеси сповільнюються, рослини стають меншими за розмірами та менш продуктивними. Отже, продуктивність рослин залежить від їх здатності швидко реагувати і пристосовуватися до дії стресу [8].

На основі вивчення молекулярних і біохімічних механізмів стресостійкості вченими ак-

тивно розробляється система захисту рослин від абіотичних стресів. Вона може бути посилена обробкою рослин певними хімічними речовинами, зокрема абсцизовою кислотою, цитокиніном, брасиностероїдами, саліциловою кислотою, та створенням відповідних генетично-змінених форм рослин [7, 9].

На сьогодні активізувалися роботи із дослідження генів, що змінюють реакцію рослин на стресові умови, на основі чого ведуться роботи зі створення методами генетичної інженерії сільськогосподарських рослин із підвищеною стресостійкістю, зокрема над виявленням, клонуванням і перенесенням у рослини трансгенів, що кодують утворення різних осмопротекторів (вуглеводів, амінокислот, багатоатомних спиртів, поліамінів), речовин, які регулюють вміст ненасичених жирних кислот у мембранах клітин і т. д. [10, 11].

До таких генів, які мають здатність підвищувати стійкість рослин до несприятливих умов довкілля, належать гени метаболізму (синтезу і катаболізму) проліну, баланс яких є одним із основних елементів механізму стійкості до осмотичного стресу. Ферментом, що лімітує швидкість деградації проліну, є проліндегідрогеназа (*pdh*). Надлишок L-проліну в трансгенних рослинах у нормі здатний пом'якшити наслідки перших етапів впливу стресу саме в фазі індукції експресії відповідних генів, що дозволяє більш швидко і ефективно запустити напрацювання захисних білків. При цьому пролін розглядається і як учасник стресової реакції (неспецифічних механізмів стійкості), і як важливий фактор спеціалізованої адаптації до стресорів, що спричиняють зневоднення клітин [9–12].

Дослідження механізмів, що регулюють метаболізм L-проліну, є актуальним як для розуміння фундаментальних механізмів стресової відповіді й адаптації рослин до абіотичних стресів, так і для практичного використання в селекції і біотехнології. Сучасні методи генетичної інженерії дозволяють змінити вміст L-проліну і дослідити зв'язок цього параметра зі стійкістю рослин до різних видів стресу. Крім того, такі трансгенні рослини широко використовуються як для вивчення функцій окремих генів, так і для реконструкції мережі взаємодіючих генів, які контролюють формування морфологічних, біохімічних і фізіологічних ознак у процесі розвитку і за впливу зовнішніх факторів різної природи.

Тому метою нашої роботи було провести порівняльний аналіз показників продуктивності T2 трансгенних рослин *Triticum aestivum* L. із частково супресованою активністю проліндегідрогенази з їх вихідними формами за умов нормального і недостатнього водозабезпечення та дослідити зміни рівня кількості білка в умовах норма → стрес → норма.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було друге покоління біотехнологічних рослин пшениці озимої генотипів УК 065 і УК 209h з інтегрованим геном катаболізму проліну (длРНК-супресором гена проліндегідрогенази *Arabidopsis thaliana*).

Для визначення показників врожайності генетично-змінени рослини T2 та їх вихідні форми вирощували в умовах *in vivo*. Стресове навантаження створювали шляхом припинення зволоження ґрунту в вегетаційних посудинах протягом 10 діб у період виходу рослин у трубку. Відбір зразків для структурного аналізу проводили у фазі повної стиглості насіння в трьох повтореннях. Умовою вибірки дослідного матеріалу було підтвердження інтеграції трансгенів шляхом ПЛР, як описано раніше [13].

Для визначення кількості білка насіння T2 трансгенних і контрольних (вихідна форма) рослин пророщували в лабораторних умовах *in vivo*. Спочатку проростки культивували за нормальних умов зволоження протягом 7 діб. Потім створювали 1-тижневий водний дефіцит, після чого продовжували вирощувати за нормальних умов гідратації. Зразки рослинного матеріалу відбирали після кожної зміни умов культивування. Визначення кількості білка в екстракті проводили за методом Лоурі [14]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [15].

Результати та обговорення

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* з використанням штаму *A. tumefaciens* LBA4404, що несе векторну конструкцію pBi2E, в складі якої знаходиться длРНК-супресор гена проліндегідрогенази *Arabidopsis thaliana*, нами були отримані генетично-модифіковані рослини пшениці озимої та їх T1 покоління, які характеризувалися підвищеною стійкістю до різних осмотичних стресів, за рахунок часткової супресії генів катаболізму проліну [13].

Для перевірки збереження функціональності трансгенів та встановлення залежності, пов'язаної з рівнем експресії генів катаболізму проліну і стрес-стійкістю рослин, досліджували показники продуктивності Т2 біотехнологічних рослин та їх вихідної форми за умов оптимального та недостатнього водозабезпечення. Для порівняльного аналізу були відібрані два генотипи, які під час вирощування насіннєвого покоління Т1 продемонстрували найвищу продуктивність (табл. 1).

Як видно із даних, за нормальних умов вирощування отримані високі показники структури врожаю для обох досліджуваних типів рослин (контрольних і генетично-змінених), на що, беззаперечно, вплинули сприятливі кліматичні умови протягом вегетаційного періоду. Однак суттєва перевага за основними елементами продуктивності належала біотехнологічним рослинам. Так, маса зерна з головного колоса в Т2 УК 209h була вищою від рослин вихідного генотипу в 1,3 раза, а різниця в масі зерна з рослини складала 4,4 грама. В контрольних і трансгенних формах генотипу УК 065 не спостерігалося відмінностей за показником МЗГК, при цьому маса зерна з рослини в останніх була вищою на 25 %.

Отже, біотехнологічні рослини за рахунок продуктивності додаткових пагонів мали достовірну перевагу за кількістю і масою отриманого зерна з рослини, при цьому показник МТЗ, який залежить від вивпненості зерна, достовірно не відрізнявся.

У нашому випадку доказом ефективності генетичної трансформації буде підвищений рівень стійкості біотехнологічних рослин до дії осмотичного стресу, що позитивно відобразиться на показниках продуктивності. Тому паралельно досліджували показники структури врожаю за умов дефіциту води (табл. 2).

Посуха вважається одним із головних чинників, що лімітує продуктивність сільськогосподарських культур, оскільки недостатнє водозабезпечення гальмує фізіолого-біохімічні процеси, ріст і розвиток рослин [2].

Аналіз отриманих результатів показав, що після осмотичного стресу спостерігалося зниження показників структури врожаю для всіх досліджуваних рослин у порівнянні з нормальними умовами вирощування. При цьому біотехнологічні рослини характеризувалися кращою врожайністю. Хоча перевага у масі зерна з головного колоса була характерною тільки для Т2 УК 209h, проте за масою зерна з головного колоса (МЗР) однозначно переважали трансгенні рослини обох генотипів.

Слід зазначити, що за дії водного дефіциту відбувається значне зниження цього показника для всіх аналізованих рослин. Причиною може бути закладання меншої кількості колосків у колосі й отже, зниження показника КЗГК в результаті негативного впливу ґрунтової посухи в критичну фазу росту рослин – початок виходу в трубку. За масою тисячі зернин генетично-змінені та їх вихідні форми не відрізнялися.

Таблиця 1. Структурний аналіз врожаю контрольних (вихідна форма) і Т2 генетично-змінених (із дволанцюговим РНК-супресором гена *pdh*) рослин пшениці озимої за нормальних умов вирощування

Генотип пшениці	УК 065		УК 209h	
	Контрольні рослини	Трансгенні рослини	Контрольні рослини	Трансгенні рослини
ВР	86,2±2,3	96,3±0,7	101,2±1,9	95,4±0,6
ДГК	8,6±0,6	9,4±0,1	7,8±0,3	9,8±0,4
ККГК	17,4 ±0,4	18,6±0,1	17,0 ±0,2	19,6±0,5
КЗГК	44,3±1,3	49,7±2,8	45,6±1,8	53,6±3,2
МЗГК	1,9±0,1	1,9±0,2	2,1±0,1	2,7±0,3
МЗР	11,3±0,9	15,2±3,1	10,2±1,2	14,6±2,8
МТЗ	41,5±2,2	42,9±1,9	45,7±1,9	44,0±0,9
КП	0,48	0,46	0,47	0,49

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

Таблиця 2. Порівняльний аналіз елементів продуктивності контрольних (вихідна форма) і Т2 генетично-змінених (з дЛРНК-супресором гена *pdh*) рослин пшениці озимої за умов водного дефіциту

Генотип пшениці	УК 065		УК 209h	
	Контрольні рослини	Трансгенні рослини	Контрольні рослини	Трансгенні рослини
ВР	83,6±2,9	91,8±2,0	87,2±1,4	90,0±2,4
ДГК	8,3±0,5	9,0±0,3	8,2±0,2	9,3±0,3
ККГК	16,6±0,7	17,1±0,5	16,3±0,4	17,6±0,7
КЗГК	42,7±2,4	45,2 ±3,0	40,0±2,0	48,5±3,2
МЗГК	1,7±0,4	1,8±0,2	1,8±0,3	2,3±0,4
МЗР	9,7±0,8	13,6±0,3	8,9±1,8	12,8±1,3
МТЗ	43,3±1,2	40,7±0,9	47,3±0,7	48,9±0,4
КП	0,49	0,5	0,49	0,49

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

Щодо коефіцієнта господарської продуктивності, то він був більш однозначним для рослин, вирощених за умов недостатнього водозабезпечення. В першому випадку (нормальні умови вирощування) для всіх досліджуваних рослин цей показник коливався в межах 0,45 – 0,5, що могло бути ефектом формування великої кількості додаткових пагонів, про це також свідчить отримана МЗР. За рахунок додаткових пагонів збільшується не тільки маса зерна, а й листостеблова маса, завдяки якій, у свою чергу, зростає асиміляційний апарат, який нагромаджує більше пластичних речовин, що пізніше переміщуються у колосоносні стебла і підвищують їхню продуктивність [13].

У формуванні стійкості рослин до дії несприятливих факторів довілля важливу роль відіграють стресові білки, які є компонентом захисної реакції живих організмів. Зокрема, вони забезпечують фотосинтетичну активність у стресових умовах. Особливу увагу приділяють можливості використання стресових білків у якості біомаркерів у процесі вивчення рослин різних екологічних стратегій, під час проведен-

ня біотехнологічних робіт, отримання стійких високоврожайних сортів [5].

Реакція рослин на стрес (на фоні загальної тенденції пригнічення синтезу нормальних білків і посилення – стресових) залежить від параметрів негативного впливу, від його тривалості, діапазону, інтенсивності та ін. і самої природи несприятливого фактора. Рівень стійкості та реагування на стрес визначається біологічними особливостями видів і їхнім генотипом. Рослини, що розрізняються за стійкістю, зазвичай на стресові дії реагують однотипно, але суттєво відрізняються за швидкістю фізіологічних і структурних перебудов [2].

Велике значення за стресових умов має вплив амінокислоти проліну на білоксинтезуючий апарат. Також продукти катаболізму проліну можуть виступати індукторами експресії осмочутливих генів, що кодують білки, необхідні для специфічної адаптації [9]. Можливо, саме підвищений рівень проліну в трансгенних рослинах у нормі (за відсутності стресу) здатний пом'якшити наслідки перших етапів впливу стресу.

Таблиця 3. Вміст білка (мг/г сирої маси) в Т2 генетично-змінених рослин та їх вихідної форми в умовах норма → стрес → норма

Варіанти	Норма	Стрес	Норма
Т2 УК 065	44,5±3,5	39,4±0,6	32,0±1,3
Вихідна форма	42,0±0,3	43,6±0,1	32,1±1,9
Т2 УК 209 h	47,9±3,1	42,0±0,3	35,5±0,2
Вихідна форма	51,4±2,4	53,8±1,2	37,7±0,4

Примітки: Норма – полив; Стрес – водний дефіцит.

Як видно із даних, представлених у таблиці 3, на ранніх етапах росту і розвитку спостерігалися динамічні зміни вмісту білка в умовах норма → стрес → норма. За оптимальних умов його кількість в обох типах рослин (Т2 і вихідна форма) достовірно не відрізнялася. За дії водного стресу рівень білка (відносно нормальних умов вирощування) підвищувався тільки у контрольних рослинах, що може свідчити про захисну реакцію рослин у відповідь на стрес – синтезом стресових білків. Незначне зниження його в біотехнологічних рослинах швидше за все має адаптивне значення, пов'язане з економією енергетичних ресурсів клітини [6].

Після регідратації вміст білка зменшився в обох варіантах рослин. При цьому для Т2 ця різниця була меншою (1,2 раза), на відміну від вихідної форми (1,4 раза). Пониження інтенсивності білкового синтезу в досліджуваних рослинах у період відновлення після стресу свідчить про проходженням звичайних метаболічних процесів.

Отже, створення біотехнологічних рослин пшениці озимої з цільовими генами, що можуть сумісно підвищувати рівень стійкості та продуктивність рослин в умовах дії абіотичних стресів і які в подальшому можна залучати в селекційному процесі, є перспективним напрямом досліджень.

Висновки

Встановлено, що за дії осмотичного стресу відбувається зниження показників продуктивності для всіх досліджуваних рослин у порівнянні з нормальним вологозабезпеченням. При цьому генетично-змінені рослини мали перевагу за основними елементами структури врожаю над вихідною формою за обох аналізованих умов вирощування.

Встановлені зміни вмісту білка в біотехнологічних і контрольних рослинах в умовах норма → стрес → норма, що характеризують різний ступінь чутливості їх до дії стресового фактора.

References

1. Bray E.A., Bailey_Serres J., Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants Amer. Soc. Rockville*. 2000. P. 1158–1249.
2. Bengough A.G., McKenzie B.M., Hallett P.D., Valentine T.A. Root Elongation, Water Stress, and Mechanical Impedance: A Review of Limiting Stresses and Beneficial Root Tip Traits. *J. Exp. Bot.*, 2011. Vol. 62. P. 59–68. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq350>.
3. Budak H., Hussain B., Khan Z., Ozturk N.Z., Ullah N. From Genetics to Functional Genomics: Improvement in Drought Signaling and Tolerance in Wheat. *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 19, No. 6. P. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01012>.
4. Morgun V.V., Dubrovna O.V., Morgun B.V. Modern biotechnologies for stress-resistant wheat plants. *Fiziologiya rasteniy i genetika*. 2016. Vol. 48, No. 3. P. 196–213. doi: 10.15407/frg2016.03.196. [in Ukrainian]
5. Kosakovskaya I.V. Stress proteins of plants. 2008. Kiev: Fitosotsiotsentr, 153 p. [in Russian]
6. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V. Formation of adaptive reactions of plants to the action of abiotic stressors. Kiev: Basis, 2010. 352 s. [in Russian]
7. Kolupaev Y.E., Kosakivska I.V. The role of signaling systems and phytohormones in the implementation of stress reactions of plants. *Ukr. bot. Journal*. 2008. Vol. 65, No. 3. P. 418–430. Retrieved from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/UBJ_2008_65_3_11. [in Ukrainian]
8. Kolodyazhnaya Ya.S., Kutsokon N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses. *Cytology and genetics*. 2009. Vol. 43, No. 2. P. 72–93. Retrieved from: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/66636>. [in Russian]
9. Morgun B.V., Tishchenko E.N. Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv: Logos, 2014. 219 s. [in Russian]
10. Tishchenko E.N. Genetic engineering using genes of L-proline metabolism to increase the osmotolerance of plants. *Fiziologiya rasteniy*. 2013. Vol. 45, No. 6. P. 488–500. Retrieved from: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>. [in Russian]
11. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G. Modern biotechnologies for increasing plant resistance to osmotic stresses. Kyiv: Kondor, 2019. 160 s. [in Russian]
12. Ibragimova S.S., Kolodyazhnaya Ya.S., Gerasimova S.V., Kochetov A.V. Partial suppression of the proline dehydrogenase gene increases plant resistance to various types of abiotic stresses. *Fiziologiya rasteniy*. 2012. Vol. 59. P. 99–107. [in Russian]
13. Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Kurchii V.M., Khristan O.O. Genetic and physiological analysis of T1 biotechnological plants of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Fakty eksperimental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv*. 2020. T. 26. P. 222–227. [in Ukrainian]
14. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.J., Rondall A.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 192, No. 2. P. 265–275.
15. Dospekhov B.A. Methods of field experiment. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 s. [in Russian]

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*

STUDY OF TRANSGENE FUNCTIONALITY IN T2 BIOTECHNOLOGICAL PLANTS OF WINTER WHEAT ON THE SIGN OF OSMORESISTANCE

Aim. To investigate the functionality of the transgene in the seed generation (T2) of genetically modified winter wheat plants (*Triticum aestivum* L.) in terms of productivity in conditions of normal and insufficient water supply. **Methods.** Determination of yield structure and protein content. **Results.** The indicators of productivity of control and T2 biotechnological plants under normal growing conditions and water deficit are analyzed. The quantitative composition of protein in the conditions before and after osmotic stress and in the period of rehydration was determined. **Conclusions.** It is shown that under the action of water deficit there is a decrease in productivity for all studied plants. In this case, genetically modified plants had an advantage in the main elements of the crop structure over the original form under both analyzed growing conditions. It was found that under normal conditions of hydration, the amount of protein in the studied plants did not differ significantly. An increase in its content in control plants under the action of osmotic stress was recorded, which may indicate the synthesis of stress response proteins. Decreased protein content during rehydration may indicate the passage of normal metabolic processes.

Keywords: *Triticum aestivum* L., biotechnological plants, proline dehydrogenase gene, structural analysis of yield, osmostability.