

<https://doi.org/10.15407/frg2024.06.495>

УДК 581.132+632.112

ВПЛИВ ПОСУХИ НА ФОТОАСИМІЛЯЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ З ЧАСТКОВОЮ СУПРЕСІЄЮ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

**Д.А. КІРІЗІЙ, О.О. СТАСИК, О.В. ДУБРОВНА,
О.Г. СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО, А.С. ГОЛОБОРОДА**

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

В умовах вегетаційного дослідження вивчали особливості впливу посухи на водний режим, вміст хлорофілу, активність антиоксидантних ферментів хлоропластів, асиміляцію CO_2 та продишову провідність прапорцевих листків, а також зернову продуктивність трансгенних рослин озимої м'якої пшениці лінії УК 322/17 (T_3), що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, порівняно з вихідним генотипом. Посуху для рослин обох генотипів створювали зниженням вологості ґрунту в дослідному варіанті до рівня 30 % повної вологоємності (ПВ), який підтримували впродовж семи діб в період колосіння—цвітіння, а потім повертали до рівня контролю. Вологість ґрунту в рослин контрольного варіанта підтримували на оптимальному рівні 60—70 % ПВ. Фізіолого-біохімічні показники вимірювали на прапорцевому листку на першу добу зниження вологості ґрунту до 30 % ПВ, на сьому добу вегетації за цього рівня вологості та через тиждень після відновлення оптимального рівня вологості. Виявлено, що дослідні рослини трансформантів демонстрували кращі відповіді на дію та післядію стресора за всіма дослідженими показниками порівняно з рослинами вихідного генотипу. Так, водний дефіцит і вміст хлорофілів в їхніх листках за посухи практично не змінювались. Інтенсивність асиміляції CO_2 у листках дослідних трансформованих рослин як за умов посухи, так і в період відновлення була істотно вищою, ніж у дослідних рослин вихідної лінії. Виявлено, що за однакової продишової провідності інтенсивність фотосинтезу в листках трансформантів була вищою, ніж у вихідної лінії. Відповідно, перші мали перевагу над другими за ефективністю використання води при фотосинтезі як за умов посухи, так і в період відновлення оптимальної вологості ґрунту. За практично однакових рівнів активності супероксиддисмутази та аскорбатпероксидази хлоропластів у рослин обох досліджених генотипів за стресових умов, у відновний період в листках трансформантів вона поверталася до контрольного рівня швидше, ніж у рослин вихідної лінії. Семидобова посуха в критичний для пшениці період колосіння—цвітіння негативно вплинула на продуктивність рослин обох генотипів, але внаслідок зазначених вище переваг фотосинтетичного апарату листків у рослин трансформантів ступінь цього впливу проявився істотно менше, ніж у вихідної лінії. Маса зерна з рослини у перших була майже на третину вища, ніж у других.

Цитування: Кірізій Д.А., Стасик О.О., Дубровна О.В., Соколовська-Сергієнко О.Г., Голоборода А.С. Вплив посухи на фотоасиміляційну активність листків та продуктивність генетично модифікованих рослин пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази. *Фізіологія рослин і генетика*. 2024. 56, № 6. С. 495—514. <https://doi.org/10.15407/frg2024.06.495>

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., посуха, трансгенні рослини, пролін, фотосинтез, продуктивність.

Нестача вологи є одним із найпоширеніших абіотичних чинників довкілля, який істотно обмежує генетичний потенціал продуктивності культурних рослин у багатьох регіонах Землі [1]. Особливо актуальна ця проблема для провідного хлібного злаку — пшениці, оскільки значні площі вирощування цієї культури знаходяться в зонах ризикованого землеробства, до яких, зокрема, належить і Україна [2]. За останні 20 років частота посух на території нашої країни зросла майже вдвічі, що призводить до істотного зниження врожайності пшениці у посушливі роки.

Гальмування процесів фотосинтезу і порушення репродуктивного розвитку за умов посухи є основними чинниками, що спричинюють втрати зернової продуктивності, які можуть становити від 25 до 70 % залежно від фази розвитку рослин, жорсткості й тривалості дії стресу [3]. Глобальні зміни клімату, що супроводжуються підвищенням температури і посиленням нерівномірності розподілу опадів як по регіонах, так і впродовж вегетаційного періоду, збільшують ці ризики [4, 5]. Найвразливішим щодо впливу посухи на продуктивність пшениці є період колосіння—цвітіння [6]. Посуха в цей час істотно знижує озерненість рослин, що призводить до значних втрат врожаю [7]. Посуха в період наливу зерна погіршує його виповненість, що також негативно позначається на продуктивності [8].

Генетичне поліпшення посухостійкості критично важливе у селекції пшениці. Натепер одним із перспективних напрямів селекції нових форм сільськогосподарських рослин, зокрема й пшениці, стійких до біотичних та абіотичних стресових чинників довкілля, є використання методів генетичної інженерії [9], які уможливають підвищення ефективності створення нових генотипів, стійких до посухи [10, 11]. Останнім часом було досягнуто певного прогресу у визначенні основних регуляторів посухостійкості пшениці [12] та різними методами трансформації створені трансгенні рослини зі зміненою експресією генів, відповідальних за посухостійкість.

Відомо, що стійкість до посухи, засолення та температурних стресів — комплексні ознаки [13]. Для підвищення посухостійкості пшениці досить часто залучаються гени, що контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин — органічних молекул, здатних у значних концентраціях акумулюватися в клітинах рослин за умов стресу і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації. Накопичення цих молекул допомагає рослинам утримувати воду в клітинах і захищає органели від ушкоджень, спричинених зневодненням, або підтримує тургорний тиск за водного стресу.

L-пролін є одним із найфункціональніших стресових метаболітів у рослин. Його накопичення — добре відома фізіологічна реакція на осмотичний стрес, спричинений засоленням, посухою та іншими абіотичними факторами, при цьому відносний внесок різних біологічних функцій проліну у розвиток толерантності рослин може змінюватися залежно від стадії адаптаційного процесу, фази онтогенезу, природи, інтенсивності й тривалості дії стресового чинника. Крім до-

бре відомої функції як інертного сумісного осмоліту, пролін за дії стресорів виконує цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, бере участь у регуляції експресії деяких генів, а також є джерелом енергії, депо азоту та вуглецю [14–17]. Вважають, що пролін регулює кислотність цитозолу і підтримує співвідношення НАД/НАДН, сприяє збереженню фотохімічної активності фотосистеми II в мембранах тилакоїдів і знижує пероксидне окиснення ліпідів. Додатковий синтез цієї амінокислоти підвищує загальну неспецифічну стійкість рослин до абіотичних стресів, оскільки пролін захищає мембрани, макромолекули і структурні елементи клітини [18].

Тому одним із найперспективніших підходів до створення посухостійких генотипів пшениці є використання генів, які контролюють синтез та катаболізм проліну [19]. Неодноразово доведено кореляцію між вмістом проліну та підвищенням рівня стійкості трансгенних рослин [20]. Рівень вільного проліну можна збільшити підсиленням його синтезу або зниженням швидкості деградації. Для цього застосовують дві основні стратегії: 1 — додаткове введення копій кДНК, відповідальних за його синтез (*P5CS* або *OAT*); 2 — часткову супресію ендегенних генів катаболізму проліну *ProDH*, які контролюють перший етап його гідролізу [19]. Щодо другої стратегії, то практичне значення для генетичної інженерії має пов'язаний із катаболізмом проліну ген проліндегідрогенази, оскільки часткове пригнічення його експресії може підвищувати вміст вільного проліну і як наслідок — рівень стійкості рослин до абіотичних стресів [19, 21].

Отже, дослідження фізіологічних особливостей генетично трансформованих рослин пшениці з підвищеним вмістом проліну, зокрема реакції їх фотосинтетичного апарату на ґрунтову посуху, є актуальним з погляду перспективності їх залучення у селекційний процес для створення посухостійких сортів.

Метою нашої роботи було провести порівняльне дослідження фізіологічних показників фотосинтетичного апарату трансформованих рослин пшениці, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, та вихідного генотипу як за умов посухи, так і в період відновлення, а також оцінити ступінь впливу стресора на продуктивність.

Методика

Матеріалом досліджень був новий перспективний генотип озимої м'якої пшениці УК 322/17, створений в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини трансформували бінарним вектором pBi2E, до складу якого входить гетерологічний дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису, а також селективний ген неоміцинфосфотрансфери IІ (*nptII*) *E. coli*. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію in planta [22] здійснювали за умов вегетаційного дослідження інюкуляцією кастрованих суцвіть з отриманням трансформантів T₁, з яких в подальшому одержували насіннєве покоління T₃. Інтеграцію елементів векторної конструкції перевіряли ПЛР-методом за наявності фрагментів екзона та інтрона гена

ProDH1 арабідопсису та селективного гена неоміцинфосфотрансферази *npd1*. Біохімічним аналізом показано, що трансгенні рослини відрізнялися підвищеним вмістом *L*-проліну в листках як в нормі, так і за дії посухи порівняно з рослинами вихідного генотипу [23].

Рослини вихідної лінії УК 322/17 та створені на її основі трансформанти покоління T_3 вирощували за природних освітлення і температури у вегетаційних посудинах на 10 кг ґрунту, удобреного 10 г нітроамофоски, по 15 рослин в посудинах. Добрива вносили в однакових кількостях під час наповнення посудин ґрунтом і в середині фази виходу в трубку (ВВСН 34). Посудини розміщували на вегетаційному майданчику під накриттям із поліетиленової плівки.

В контрольному варіанті впродовж всієї вегетації, вологість ґрунту підтримували на рівні 70 % повної вологоємності (ПВ). В період колосіння—цвітіння (ВВСН 59—65) припиняли полив рослин дослідного варіанта і знижували упродовж трьох діб вологість ґрунту до 30 % ПВ (перша доба посухи), яку підтримували наступні сім діб. Опісля поновлювали полив рослин до 70 % ПВ і підтримували таку вологість ґрунту до кінця вегетації. Вологість ґрунту в посудинах контролювали гравіметрично двічі на добу.

Параметри водного дефіциту, вмісту хлорофілу, активності антиоксидантних ферментів хлоропластів та інтенсивності газообміну прапорцевих листків контрольних і дослідних рослин вимірювали на першу добу досягнення вологості ґрунту 30 % ПВ, на сьому добу посухи та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту в посудинах з дослідними рослинами.

Інтенсивність фотосинтезу реєстрували за контрольованих умов на установці, змонтованій на базі оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М, увімкненого за диференційною схемою. Невідокремлені від рослин листки (по 2 паралельно) розміщували у термостатованій (25 °С) камері розміром 3×7 см та освітлювали (1500 мкмоль/(м² · с) фотосинтетично активної радіації) світлодіодним прожектором ТА-11 50W із колірною температурою 5200 К. Інтенсивність транспірації вимірювали портативним газоаналізатором EGM-5 (США) за різницею вологості повітря на вході та виході із камери. Розрахунки показників газообміну здійснювали згідно зі стандартними методиками [24].

Водний дефіцит листка визначали за стандартною методикою [25]. Для визначення маси сухої речовини зразки фіксували за 105 °С упродовж 30 хв і висушували до постійної маси за 65 °С. Вміст хлорофілів (*a+b*) у листках вимірювали спектрофотометричним методом після екстракції диметилсульфоксидом [26] і розраховували на масу сухої речовини.

Активність антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (СОД) і аскорбатпероксидази (АПО) — визначали у хлоропластах прапорцевих листків. Хлоропласти виділяли механічним способом за температури 0—4 °С. Середню наважку (2 г) прапорцевих листків пшениці гомогенізували в 7-кратному об'ємі буферного розчину такого складу: 0,33 М сорбітол, 5 мМ MgCl₂, 0,1 % БСА, 4 мМ аскорбінова кислота та 50 мМ *трис*-HCl (рН 7,5). Гомогенат фільтрували крізь 2 шари капронової тканини та центрифугували на центрифугі

К-24D за 80 g і температури 0—4 °C упродовж 5 хв для осадження важких часточок. Надосадову рідину зливали в інші попередньо охолоджені центрифужні пробірки та центрифугували за 2000 g 10 хв для отримання фракції хлоропластів. Осад хлоропластів ресуспендували в ізотонічному середовищі з 4 мМ аскорбінової кислоти, 50 мМ *трис*-HCl (рН 7,5) об'ємом 2 мл і в подальшому використовували для визначення активності СОД та АПО.

Активність СОД визначали спектрофотометрично за допомогою нітротетразолієвого блакитного за довжини хвилі 560 нм [27]. Активність АПО вимірювали в ультрафіолетовій області спектра за 290 нм [28].

Наприкінці вегетації визначали масу сухої речовини надземної частини та елементи зернової продуктивності рослин.

Повторність досліду становила 5 посудин на варіант, аналітична повторність визначень — 3-разова, продуктивності — 20-разова. Дані були статистично оброблені з використанням ANOVA та критерію вірогідних відмінностей Тьюкі для середніх значень. Результати на діаграмах і в таблиці виражені як середнє значення та стандартна похибка ($x \pm SE$). Відмінності між варіантами вважали вірогідними за $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За аналізу результатів визначення динаміки водного дефіциту в листках рослин пшениці одразу впадає в око, що у підданих посузі дослідних рослин вихідної лінії УК 322/17 цей показник був набагато більший, ніж в інших варіантах за усіх строків вимірювань (рис. 1). У контрольних рослин вихідної лінії та її трансформантів водний де-

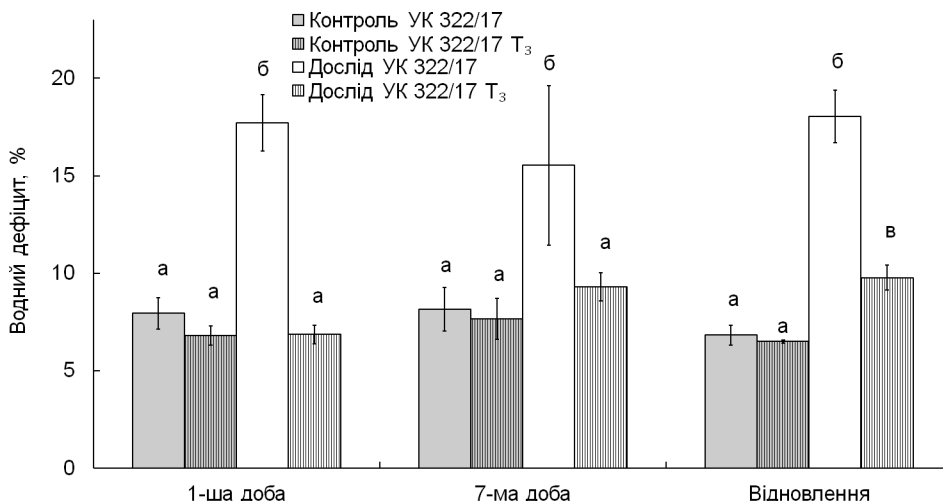


Рис. 1. Водний дефіцит у прапорцевих листках рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T₃ із дволанцюговим РНК-супресором гену проліндегідрогенази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ).

Тут і на рис. 2—4, 6—8 різні літери вказують на істотні відмінності між варіантами за $p < 0,05$ для кожного періоду вимірювання

фіцит майже не відрізнявся і коливався в межах 7–8 %. У перший день посухи водний дефіцит в дослідних рослин трансформантів був на рівні контролю, а наприкінці періоду дії стресора цей показник мав тенденцію до підвищення, хоча й неістотного, порівняно з контролем. Через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту в посудинах з дослідними рослинами водний дефіцит в листках трансформантів був вірогідно вищий за контроль, але це відбулося переважно внаслідок деякого зниження даного показника в останній тиждень порівняно з першим тижнем експерименту (див. рис. 1). Якщо порівняти водний дефіцит в листках трансформованих рослин наприкінці посухи і в період відновлення, то різниця між ними буде неістотною (всього лише 5 %). У дослідних рослин вихідної лінії УК 322/17 цей показник на першу добу посухи був більший, ніж у її трансформантів у 2,58 раза, на сьому добу дії стресора — 1,67, в період відновлення — в 1,84 раза.

Отже, часткова супресія гена проліндегідрогенази сприяла стабілізації водного режиму листків за впливу посухи. Безсумнівно, це відбулося внаслідок підвищення вмісту в їх тканинах осмотично активної речовини — проліну. З одного боку, це підвищувало водоутримувальну здатність листків. З іншого боку, можна припустити, що підвищення вмісту проліну в рослинних тканинах, в тому числі й коренях, посилювало їх водопоглинальну здатність, що також сприяло оптимізації водного режиму всієї рослини за нестачі вологи в ґрунті.

Вміст суми хлорофілів у листках контрольних рослин обох генотипів був майже однаковим із деяким зменшенням загального рівня наприкінці періоду вимірювань (рис. 2). На перший день посухи з'явилася тенденція до зниження цього показника у дослідних рослин без істотної різниці між генотипами. На сьому добу вміст суми хлорофілів у листках трансформантів не різнився із контролем, а у

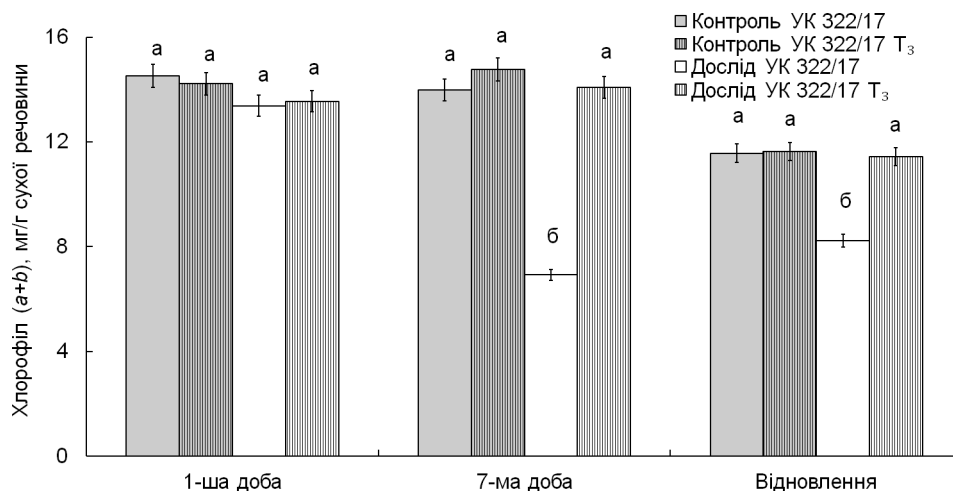


Рис. 2. Загальний вміст хлорофілів ($a+b$) у прапорцевих листках рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 Т₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ)

рослин вихідної лінії був удвічі менший за інші варіанти. В період відновлення спостерігалось подібне, лише з деякою відмінністю у дослідних рослин вихідної лінії, де цей показник дещо підвищився і був менший за інші варіанти лише на 28 %.

Отже, часткова супресія гена проліндегідрогенази та збільшення рівня вільного проліну сприяли стабілізації вмісту хлорофілів у листках за впливу посухи і у відновний період після зняття дії стресора. Очевидно, цьому сприяли як оптимізація водного режиму рослин, так і захисна роль проліну як антиоксиданту. Відомо, що за посухи в рослинних тканинах різко посилюється утворення АФК, що призводить до окиснювального стресу й пошкодження багатьох клітинних структур, включно з мембранами та хлорофіл-білковими комплексами хлоропластів [29]. При цьому важливого значення набувають антиоксидантна та шаперонна властивості проліну, що виразно проявляється у трансформованих рослин.

Пряма антиоксидантна (антирадикальна) функція для проліну не є основною, але він має чітко виражені антиоксидантні властивості, зменшуючи вміст АФК у клітині. Вільний пролін, а також його кінцеві групи у складі поліпептидів, можуть прямо реагувати з пероксидом водню і синглетним киснем, формуючи стабільні вільні радикали — аддукти похідних проліну та гідроксипроліну [16, 30]. Про антиоксидантні властивості проліну свідчить його здатність усувати індуковану H_2O_2 фрагментацію ДНК та попереджати програмовану загибель клітин внаслідок зменшення вмісту АФК [31]. Антиоксидантна дія проліну також пов'язана з його здатністю захищати білково-ліпідні комплекси мембран та опосередковано зменшувати інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів інактивацією гідроксильних радикалів та інших АФК [32]. Пролін поряд з такими класичними антиоксидантами як глутатіон і аскорбінова кислота є одним із компонентів системи клітинної редокс-сигналізації та редокс-регуляції [33]. Як окрему функцію антиоксидантної дії проліну розглядають його здатність зв'язувати іони металів зі змінною валентністю і тим самим обмежувати неферментативні вільнорадикальні процеси [16, 30]. Завдяки своїм властивостям молекулярного шаперону він запобігає агрегації білків, попереджає денатурацію та стабілізує антиоксидантні ферменти [15, 30].

Вимірювання інтенсивності газообміну прапорцевих листків контрольних і підданих посузі рослин виявили, що на першу добу досягнення вологості ґрунту 30 % ПВ інтенсивність асиміляції CO_2 істотно зменшилась порівняно з умовами оптимального поливу (рис. 3). Так, у рослин вихідної лінії цей показник зменшився на 49,3 %, а у трансформантів — на 32,8 %. Через 7 діб перебування за умов посухи інтенсивність фотосинтезу дослідних рослин помітно підвищилась порівняно з першою добою дії стресора. У рослин вихідної лінії відставання від контролю в цей період становило 14 %, а у трансформантів — 6,6 %. Через тиждень після відновлення оптимального поливу дослідних рослин цей показник практично зрівнявся з контролем як у вихідної, так і трансформованої лінії. Проте слід відзначити, що певною мірою цьому сприяло поступове зменшення інтенсивності фотосинтезу контрольних рослин упродовж дослідженого пе-

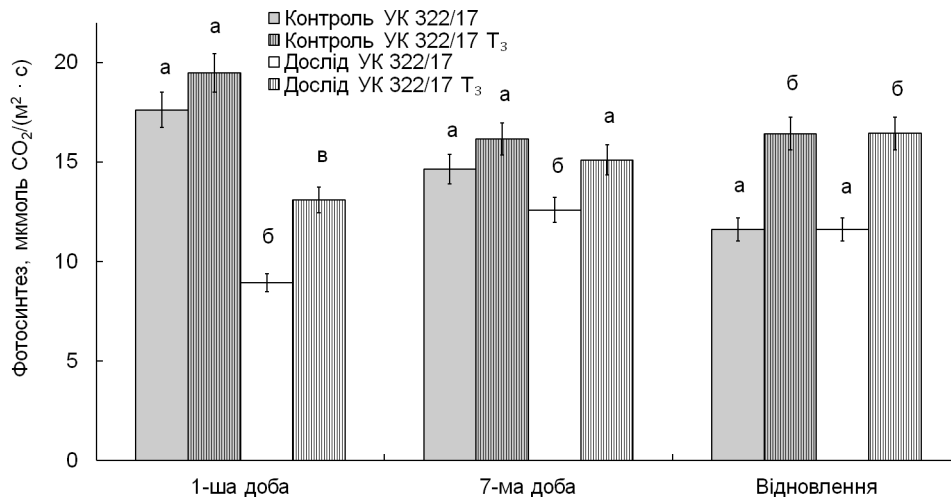


Рис. 3. Інтенсивність фотосинтезу прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогепази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ)

ріоду, яке було особливо помітним у рослин вихідної лінії. Це явище можна пояснити початком старіння листків з переходом рослин до репродуктивного розвитку, що супроводжується деградацією білків фотосинтетичного апарату і реутилізацією азотовмісних сполук до колоса [34, 35].

Отже, за приблизно однакових початкових показників інтенсивності фотосинтезу контрольних рослин вихідної і трансформованої лінії, які росли весь час за оптимальної вологості ґрунту, зниження цього показника у дослідних рослин під впливом посухи в останніх було меншим, ніж у перших. В результаті інтенсивність асиміляції CO₂ прапорцевими листками дослідних трансформованих рослин як за умов посухи, так і в період відновлення була істотно вищою, ніж у дослідних рослин вихідної лінії.

Також заслуговує на увагу той факт, що адаптація фотосинтетичного апарату до посухи (зменшення ступеня інгібування фотосинтезу на сьому добу зниженого вологозабезпечення порівняно з першою) у трансформованих рослин була ефективнішою, ніж у вихідної лінії. Так, ступінь інгібування асиміляції CO₂ в рослин вихідної лінії зменшився в 3,5 рази, а в трансформованих — майже в 5 разів. Поліпшену порівняно з вихідною лінією адаптивну здатність фотосинтетичного апарату після семидобової посухи та формування кростолерантності (підвищеної стійкості до високої температури) відзначено нами раніше в трансгенних рослин озимої пшениці зі зниженою експресією гена проліндегідрогепази лінії УК 065 [36].

Аналогічні закономірності спостерігалися і для продихової провідності для CO₂ (рис. 4). Так, у дослідних рослин вихідної лінії зменшення цього показника порівняно з контролем на першу добу посухи становило 58 %, на сьому добу посухи — 18,9 %, через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту — 7,5 %. У трансформованих рослин таке зниження становило, відповідно,

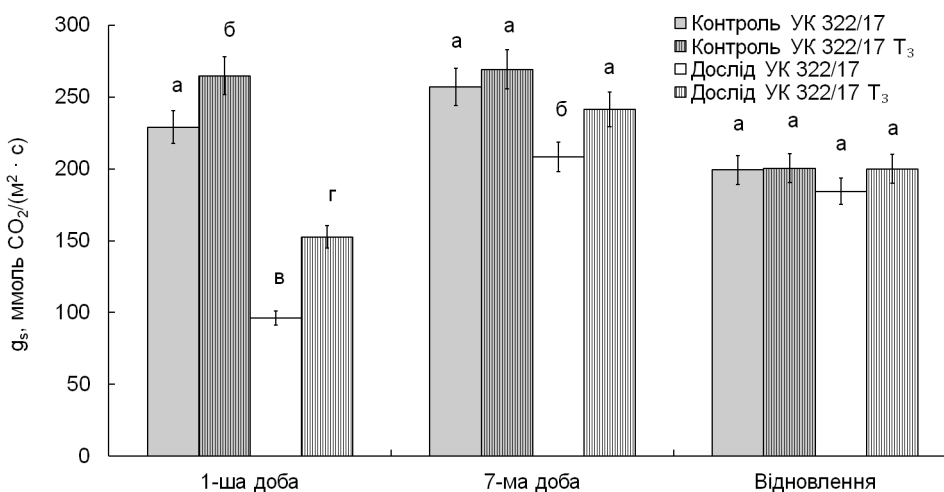


Рис. 4. Продихова провідність (g_s) прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогепази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ)

42,4 %, 10,3 і 0,2 %. Слід зазначити, що хоча дослідні рослини в період відновлення повністю не зрівнялися з контролем (як це спостерігалось для фотосинтезу), однак різниця між ними була статистично невірогідною.

Отже, як і у випадку інтенсивності фотосинтезу, трансформовані рослини пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогепази характеризувалися меншим падінням продигової провідності щодо контролю за умов посухи порівняно з рослинами вихідної лінії. Тобто, підвищений вміст проліну, який передбачається внаслідок інгібування його катаболізму [19], сприяв підвищенню стійкості фотосинтетичного апарату до впливу посухи. Очевидно, що комплексна дія проліну як осмотично активної речовини, так і антиоксиданту, відіграє позитивну роль у підтриманні функціонування структурних і ферментних систем клітин мезофілу загалом, та їх хлоропластів зокрема, за умов недостатнього вологозабезпечення.

Відомо, що головна функція продихів полягає в оптимізації балансу між надходженням CO₂ всередину листка та витоком водяної пари назовні, тобто, з одного боку — в підтриманні концентрації CO₂ у міжклітинниках листка, необхідної для нормального перебігу фотосинтезу, а з іншого — в обмеженні непродуктивних втрат води рослиною. Тому продигова провідність (g_s) є одним із ключових параметрів при дослідженні особливостей фотосинтетичного газообміну листків залежно від зовнішніх і внутрішніх чинників [24].

Останнім часом серед дослідників дискутується думка, що у зниженні інтенсивності асиміляції CO₂ за стресових умов закриття продихів є вторинним ефектом відносно зменшення активності власне фотосинтетичного апарату хлоропластів [37]. Внаслідок цього гальмується швидкість поглинання вуглекислого газу клітинами мезофілу із міжклітинних порожнин всередині листка, що спричинює підвищення його концентрації. Можливо, що на початку посухи, коли в

рослин спостерігається різке збільшення вмісту в тканинах головного стресового гормону — абсцизової кислоти (АБК), яка серед іншого індукує закриття продихів [38], переважною причиною зниження інтенсивності фотосинтезу, дійсно, є обмеження надходження CO_2 всередину листка. Проте з часом відбувається адаптація фотосинтетичних процесів до стресових умов, інтенсивність асиміляції вуглекислоти підвищується порівняно з початком дії стресора, на що продихи реагують збільшенням апертури, навіть незважаючи на підвищений вміст АБК.

Це підтверджується нашими даними щодо продихової провідності листків контрольних і дослідних рослин (див. рис. 4). Видно, що наприкінці періоду посухи у дослідних рослин як вихідного типу, так і трансформованих, вона була значно вищою, ніж на її початку. Водночас, у трансформованих рослин цей показник на першу добу посухи був більш як у півтора раза вищий, ніж у рослин вихідної лінії. На сьому добу посухи ця різниця становила лише 16 %. Через тиждень після відновлення оптимального поливу провідність продихів дослідних трансформованих рослин зрівнялась з контрольними, а у рослин вихідної лінії дещо відставала, хоча і неістотно. Зауважимо, що у стійкіших до стресових впливів трансформованих рослин на початку дії посухи зниження провідності продихів щодо контролю було значно меншим, ніж у рослин вихідної лінії. Це ще раз свідчить на користь гіпотези, що продихи скоріше підлаштовуються під потребу фотосинтетичного апарату у CO_2 , ніж мінімізують його функціонування. Хоча останній момент також треба враховувати, особливо на початку дії стресора.

Про узгодженість функціонування власне фотосинтетичного і продихового апаратів свідчить досить тісна позитивна кореляція між продиховою провідністю та інтенсивністю фотосинтезу, виявлена у нашому досліді (рис. 5). Для всіх контрольних і дослідних варіантів рослин обох генотипів та строків вимірювання вона становила $r = 0,80$. Крім того, ми побудували окремі залежності для рослин вихідної лінії та її трансформантів. Виявилось, що лінії трендів, які їх апроксимують, проходять по різні боки загальної залежності, а саме: для вихідної лінії нижче, а для трансформантів — вище. Коефіцієнти кореляції становили, відповідно, $r = 0,85$ і $r = 0,72$.

Із цього випливає той факт, що за однакової продихової провідності інтенсивність фотосинтезу листків трансформованих рослин була вищою, ніж у вихідної лінії як за стресових, так і нормальних умов. В першому випадку, очевидно, це зумовлено обговореною вище захисною роллю проліну. Стосовно другого можна припустити, що шаперонні та антиоксидантні властивості проліну мають певне значення і за нормальних умов, оскільки нормальне функціонування фотосинтетичного апарату в клітинах мезофілу весь час супроводжується утворенням активних форм кисню і фотопошкодженням білків світлозбиральних комплексів, особливо на яскравому освітленні.

Генотипна різниця у співвідношенні продихової провідності та інтенсивності фотосинтезу листків рослин вихідної лінії та її трансформантів відбилася і на такому важливому фізіологічному показнику як ефективність використання води (ЕВВ) при фотосинтезі. На

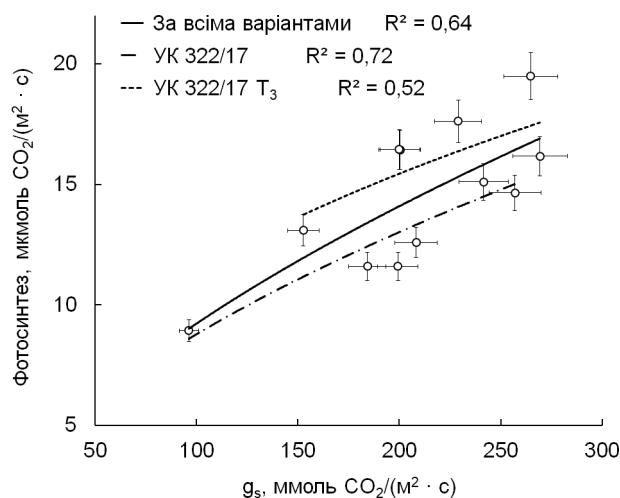


Рис. 5. Взаємозв'язок між продиговою провідністю (g_s) та інтенсивністю фотосинтезу прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T_3 із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази

ЕВВ впливають багато чинників, як-от фенотип, генотип і середовище, і дослідження цього параметра особливо актуальне за умов аридизації клімату [39]. ЕВВ може бути визначена як відношення кількості утвореної біомаси чи врожайності до кількості води, випаруваної рослинами протягом вегетаційного сезону, або, з погляду перебігу фотосинтезу на рівні листка, як відношення інтенсивності фотосинтезу до транспірації, тобто кількості асимільованого CO_2 на одиницю випаруваної води. Цей параметр називають миттєвою ЕВВ, яка відображає взаємодію продигової та внутрішньоклітинної (метаболічної) регуляції фотосинтезу. Власне показник ефективності використання води під час фотосинтезу характеризує стійкість фотосинтетичного апарату на клітинному рівні та його адаптаційну здатність [40].

Ми розраховували показник ЕВВ прапорцевих листків контрольних і дослідних рослин вихідної лінії та трансформантів (рис. 6). Виявилось, що у рослин обох генотипів різниця між контрольним і дослідним варіантами була неістотною. Водночас спостерігались певні генотипні відмінності за цим показником. Так, якщо на першу добу посухи у трансформованих рослин проявлялася лише тенденція до перевищення за ЕВВ над вихідною лінією, то на сьому добу посухи це перевищення стало помітнішим. Особливо чітко перевага трансформантів над вихідною лінією за ЕВВ проявилася в період відновлення, коли перші перевищили за цим показником останніх на 31 %.

Ця перевага була забезпечена головню за рахунок підтримання вищої інтенсивності фотосинтезу в листках трансформованих рослин як в період дії стресора, так і після її припинення стосовно як дослідних, так і контрольних рослин. Тобто в останніх ЕВВ збереглася на високому рівні завдяки зазначеному вище повільнішому старінню фотосинтетичного апарату в період репродуктивного розвитку порівняно з рослинами вихідної лінії. Можна припустити, що цьому сприяли антиоксидантні властивості проліну, оскільки відомо, що проце-

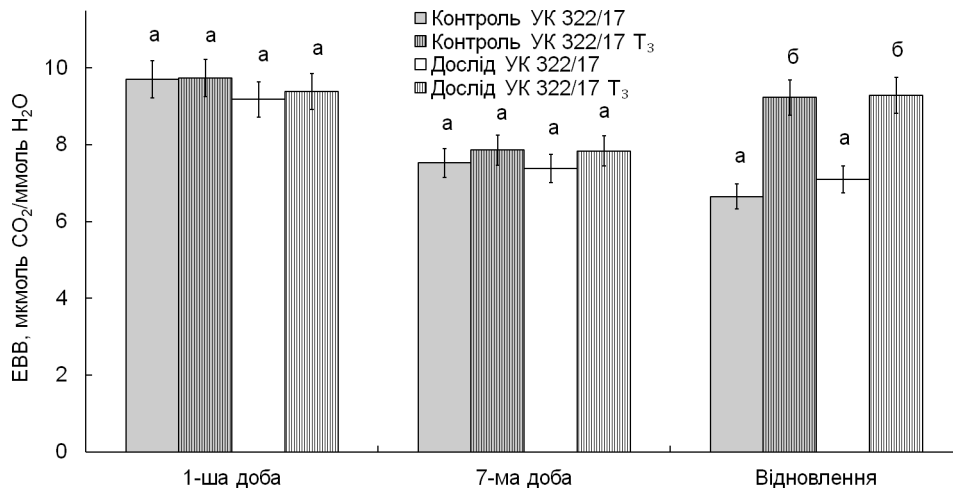


Рис. 6. Ефективність використання води (ЕВВ) за фотосинтезу прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 Т₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ)

си старіння провокуються і супроводжуються утворенням підвищених кількостей активних форм кисню [41, 42].

Слід зазначити, що отримані значення ЕВВ були миттєвими, тобто не відображають її динаміку впродовж життєвого циклу культури. ЕВВ дуже мінлива протягом дня та періоду вегетації залежно від генотипних особливостей [43]. Однак у наших дослідках газообмін листків вимірювали у контрольованих світло-температурних умовах, а зміни інтенсивності фотосинтезу та транспірації були отримані внаслідок варіювання лише умов водного режиму. Тому зазначені генотипні особливості можна вважати цілком репрезентативними.

Відомо, що за високої концентрації ендегенний пролін може діяти також як регуляторна/сигнальна молекула, здатна змінювати рівні транскриптів генів, пов'язаних зі стресом, зокрема антиоксидантних ферментів [44]. Показано, що екзогенна обробка проліном підвищувала активність антиоксидантних ферментів, зокрема СОД, АПО, каталази та пероксидази за дії іонного та окиснювального стресів у деяких видів рослин [15, 17]. Водночас пролін може діяти і як негативний регулятор експресії генів антиоксидантних ферментів, оскільки зменшення його кількості також призводило до активації їхньої експресії в рослин арабідопсису [45].

Тому, при обговоренні антиоксидантного захисту фотосинтетичного апарату трансформованих рослин за стресових умов, не можна оминати питання про динаміку активності головних антиоксидантних ферментів хлоропластів — СОД і АПО. Виявлено, що активність СОД хлоропластів прапорцевих листків контрольних рослин обох генотипів істотно не різнилася (рис. 7). На першу добу посухи цей показник виявив лише тенденцію до підвищення, але різниця з контрольними рослинами була неістотною. На сьому добу посухи спостерігалось значне підвищення активності СОД хлоропластів дослідних

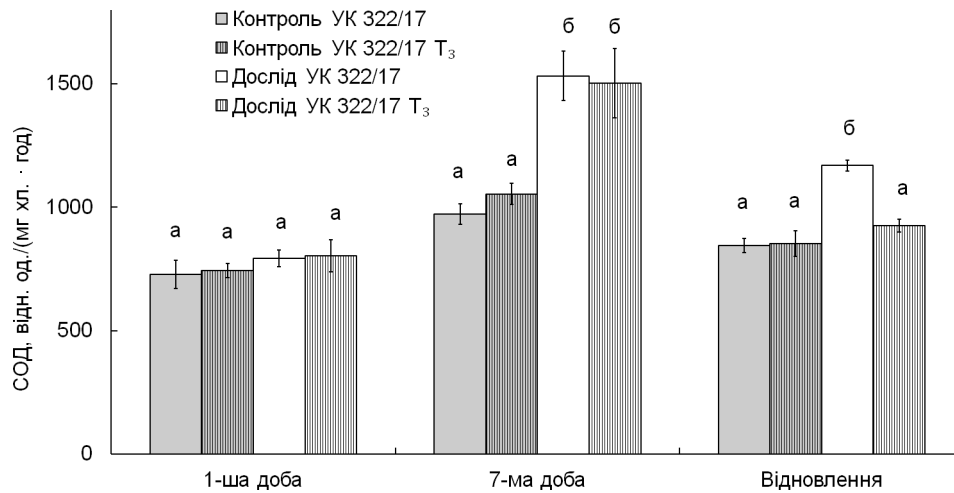


Рис. 7. Активність супероксиддисмутази (СОД) у хлоропластах прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ)

рослин порівняно з контрольними без істотної генотипної різниці. Через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту в посудинах з дослідними рослинами цей показник у трансформантів знизився практично до контрольних значень. У рослин вихідної лінії він також зменшився порівняно із сьомою добою посухи, але все ж таки істотно перевищував контроль.

Динаміка активності АПО хлоропластів загалом була подібна до такої СОД (рис. 8). Це пояснюється тим, що дані ферменти працю-

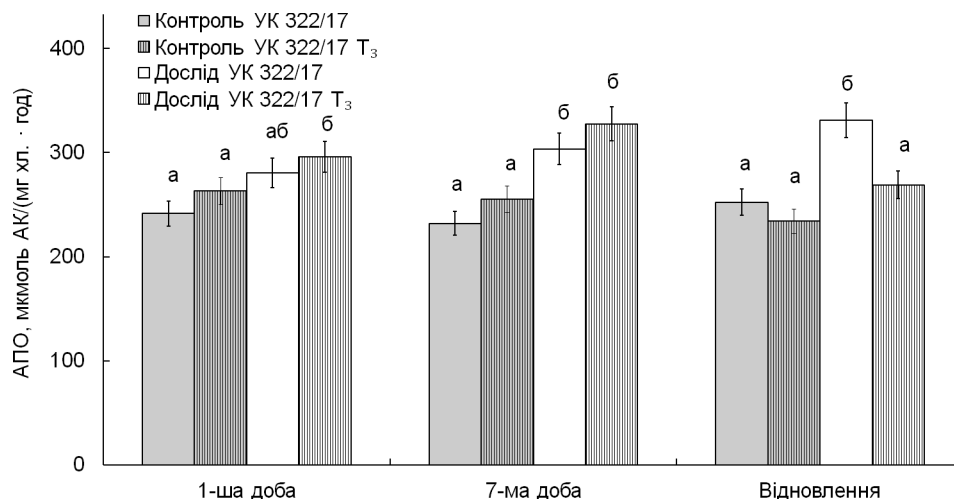


Рис. 8. Активність аскорбатпероксидази (АПО) у хлоропластах прапорцевих листків рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів УК 322/17 T₃ із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази на першу і сьому доби ґрунтової посухи (30 % ПВ) та через тиждень після відновлення оптимальної вологості ґрунту (70 % ПВ) (АК — аскорбінова кислота)

ють у зв'язці. Відомо, що при функціонуванні електронтранспортного ланцюга хлоропластів частина електронів може переноситися на молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикалу [42]. Останній є дуже небезпечною АФК, детоксикація якої здійснюється СОД. Внаслідок реакції, що каталізується цим ферментом, утворюється H_2O_2 , який відновлюється АПО до води.

Різниця між контрольними рослинами обох генотипів за активністю АПО була неістотною впродовж періоду спостережень. На першу добу посухи спостерігалася деяке підвищення активності АПО порівняно з контрольними рослинами. На сьому добу дії стресора різниця з контролем збільшилася, при цьому дослідні рослини трансформантів виявили тенденцію до перевищення цього показника у рослин вихідної лінії. Нарешті, в період відновлення активність АПО хлоропластів листків трансформантів знизилася практично до контрольного рівня, а дослідних рослин вихідної лінії істотно його перевищувала (див. рис. 8).

Загалом підвищення активності антиоксидантних ферментів за стресових умов є нормальною реакцією, оскільки посилюється утворення АФК, які необхідно елімінувати [46]. Звертає на себе увагу те, що за практично однакових рівнів активності антиоксидантних ферментів у рослин досліджених генотипів за умов посухи, у відновний період в листках трансформантів вона поверталася до контрольного рівня швидше, ніж у рослин вихідної лінії. З цього окреслюється принаймні два висновки. По-перше, підвищення вмісту проліну в рослинах трансформантів не конфліктувало з роботою інших захисних механізмів за стресових умов, а по-друге, воно сприяло кращій гомеостатичній регуляції антиоксидантних систем після припинення дії стресора. Можна припустити, що антиоксидантна і шаперонна дія підвищеного порівняно зі звичайним рівня проліну впродовж посухи прискорювала нормалізацію активності антиоксидантних ферментів до рівня, характерного для контрольних рослин, після її припинення. У рослин вихідної лінії посуха спричинила серйозніші метаболічні й структурні пошкодження (про що непрямо свідчить істотно нижча інтенсивність асиміляції CO_2 (див. рис. 3)), для репарації яких необхідно було підтримувати підвищену активність антиоксидантних ферментів і у відновний період.

Отже, за всіма дослідженими фізіологічними показниками, які характеризують ступінь посухотолерантності рослин пшениці, трансформанти лінії УК 322/17 із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази показали кращі результати, ніж вихідний генотип. Семидобова посуха в критичний для пшениці період колосіння—цвітіння негативно вплинула на продуктивність рослин, але цілком логічно, що ступінь цього впливу у трансформантів виявився істотно меншим, ніж у вихідної лінії (таблиця). Особливо наочно це демонструють розрахунки відносного зниження показників дослідних рослин порівняно з контрольними.

Загалом контрольні рослини УК 322/17 T_3 проявляли тенденцію до перевищення вихідної лінії за більшістю показників продуктивності, хоча воно було неістотним. Проте ця тенденція привертає увагу, оскільки у нашому вегетаційному досліді були контрольовані тіль-

Елементи продуктивності контрольних (70 % ПВ) і підданих семидобовій посузі (30 % ПВ, дослід) в період колосіння—цвітіння рослин озимої пшениці вихідної лінії УК 322/17 та її трансформантів РНК-супресором гена проліндегідрогенази ($\bar{x} \pm SE$, $n = 20$)

Генотип	Варіант	Маса наземної частини, г	Маса зерна, г	Кількість зерен, шт.	Маса 1000 зерен, г	K_{total}	Продуктивна куцистість, шт.
УК 322/17	Контроль	7,69±0,65	3,76±0,35	108,0±10,4	35,4±1,3	0,49±0,01	2,61±0,34
	Дослід	6,06±0,45 [#]	2,65±0,22 ^{**}	77,4±8,1 ^{**}	37,4±3,3	0,44±0,02	1,89±0,20 [*]
	% контролю	78,8	70,5	71,7	105,6	89,8	72,4
УК 322/17 T ₃	Контроль	8,29±0,50	4,04±0,23	124,5±8,6	33,3±1,2	0,49±0,01	2,27±0,19
	Дослід	7,40±0,49 [#]	3,42±0,26 ^{**}	90,5±6,5 ^{**}	38,3±1,9 [*]	0,46±0,01 [*]	1,90±0,14 [*]
	% контролю	89,3	84,7	72,7	115,0	93,9	83,7

Примітка: ^{*} різниця дослідних рослин з контрольними істотна за $p < 0,05$; [#] різниця між генотипами істотна за $p < 0,05$.

ки мінеральне живлення і вологість ґрунту, а такі важливі чинники продукційного процесу як освітленість, вологість повітря і, особливо, температура були природними, і не завжди оптимальними. Можна припустити, що краща стресотолерантність трансформованих рослин сприяла прояву зазначеної тенденції і в контролі.

Як зазначалось, всі показники продуктивності дослідних рослин були меншими за контроль, окрім маси 1000 зерен. Це пояснюється різким зменшенням їх кількості за впливу посухи, не в останню чергу внаслідок зниження продуктивної куцистості (див. таблицю). Тому в період наливання зерна, коли посухи вже не було, а фотосинтетичний апарат відновив свою потужність, зменшення кількості зерен на рослині сприяло їх кращому забезпеченню асимілятами, а отже — і збільшенню маси окремих зернин. В кінцевому підсумку, маса зерна з трансформованих рослин, підданих семидобовій посузі в період колосіння—цвітіння, була на 29 % вищою, ніж у дослідних рослин вихідної лінії.

Таким чином, встановлено, що посуха істотно впливає на фізіологічні показники прапорцевих листків пшениці: в них посилюється водний дефіцит, зменшується вміст хлорофілів, знижується інтенсивність асиміляції CO₂ та продихова провідність, підвищується активність антиоксидантних ферментів хлоропластів. Водночас дослідні рослини трансформантів із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази демонстрували кращі відповіді на дію та післядію стресора за всіма дослідженими показниками. Так, водний дефіцит і вміст хлорофілів в їхніх листках за посухи практично не змінювались. За майже однакових показників інтенсивності

фотосинтезу контрольних рослин вихідної і трансформованої лінії, які росли весь час за оптимальної вологості ґрунту, зниження цього показника під впливом посухи було в останніх меншим, ніж у перших. В результаті інтенсивність асиміляції CO_2 прапорцевими листками дослідних трансформованих рослин як за умов посухи, так і в період відновлення була істотно вищою, ніж у дослідних рослин вихідної лінії.

У трансформованих рослин на початку дії посухи зниження провідності продохів щодо контролю було значно меншим, ніж у рослин вихідної лінії. При цьому за однакової продохової провідності інтенсивність фотосинтезу в листках трансформантів була вищою, ніж у вихідної лінії. Відповідно, перші мали перевагу над другими за ефективністю використання води при фотосинтезі як за умов посухи, так і в період відновлення оптимальної вологості ґрунту.

За практично однакових рівнів активності антиоксидантних ферментів хлоропластів (СОД і АПО) у рослин обох досліджених генотипів за стресових умов, у відновний період в листках трансформантів вона поверталася до контрольного рівня швидше, ніж у рослин вихідної лінії. Отже, підвищення вмісту проліну в рослинах трансформантів сприяло кращій гомеостатичній регуляції антиоксидантних систем після припинення дії стресора. Очевидно, комплексна дія проліну як осмотично активної речовини, так і антиоксиданту, відіграє позитивну роль у підтриманні функціонування структурних і ферментних систем клітин мезофілу загалом, та їх хлоропластів зокрема, за умов недостатнього вологозабезпечення.

Семидобова посуха в критичний для пшениці період колосіння—цвітіння негативно вплинула на продуктивність рослин обох генотипів, але внаслідок зазначених вище переваг фотосинтетичного апарату листків у рослин трансформантів ступінь цього впливу проявився істотно менше, ніж у вихідної лінії. Маса зерна з рослини у перших була майже на третину вища, ніж у других.

REFERENCES

1. Farooq, M., Wahid, A., Zahra, N., Hafeez, M.B. & Siddique, K.H.M. (2024). Recent advances in plant drought tolerance. *J. Plant Growth Regul.*, 43, pp. 3337-3369. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11351-6>
2. Neupane, D., Adhikari, P., Bhattarai, D., Rana, B., Ahmed, Z., Sharma, U. & Adhikari, D. (2022). Does climate change affect the yield of the top three cereals and food security in the world? *Earth*, 3, pp. 45-71. <https://doi.org/10.3390/earth3010004>
3. Bapela, T., Shimelis, H., Tsilo, T. & Mathew, I. (2022). Genetic improvement of wheat for drought tolerance: Progress, challenges and opportunities. *Plants*, 11, 1331. <https://doi.org/10.3390/plants11101331>
4. Kiriziy, D., Kedruk, A. & Stasik, O. (2024). Effects of drought, high temperature and their combinations on the photosynthetic apparatus and plant productivity. In *Reg. Adapt. Res. Plants*, pp. 1-33. New York: Nova Sci. Publishers. <https://doi.org/10.52305/TXQB2084>
5. Pequeno, D.N.L., Hernandez-Ochoa, I.M., Reynolds, M., Sonder, K., MoleroMilan, A., Robertson, R.D., Lopes, M.S., Xiong, W., Kropff, M. & Asseng, S. (2021). Climate impact and adaptation to heat and drought stress of regional and global wheat production. *Environ. Res. Lett.*, 16, 054070. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abd970>
6. Senapati, N., Stratonovitch, P., Paul, M.J. & Semenov, M.A. (2019). Drought tolerance during reproductive development is important for increasing wheat yield potential under

- climate change in Europe. *J. Exp. Bot.*, 70, No. 9, pp. 2549-2560. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery226>
7. Sadras, V.O. & Richards, R.A. (2014). Improvement of crop yield in dry environments: benchmarks, levels of organization and the role of nitrogen. *J. Exp. Bot.*, 65, No. 8, pp. 1981-1995. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru061>
 8. Wasaya, A., Manzoor, S., Yasir, T.A., Sarwar, N., Mubeen, K., Ismail, I.A., Raza, A., Rehman, A., Hossain, A. & EL Sabagh, A. (2021). Evaluation of fourteen bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes by observing gas exchange parameters, relative water and chlorophyll content, and yield attributes under drought stress. *Sustainability*, 13, No. 9, 4799. <https://doi.org/10.3390/su13094799>
 9. Morgun, V.V., Dubrovna, O.V. & Morgun, B.V. (2016). The modern biotechnologies of producing wheat plants resistant to stresses. *Fiziol. rast. genet.*, 48, No. 3, pp. 196-213 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2016.03.196>
 10. El-Mouhamady, A., El-Hawary, M. & Habouh, M. (2023). Transgenic wheat for drought stress tolerance: a review. *Middle East J. Agricult. Res.*, 12, No. 1, pp. 77-94. <https://doi.org/10.36632/mejar/2023.12.1.7>
 11. Khan, S., Anwar, S., Yu, S., Sun, M., Yang, Z. & Gao, Z. (2019). Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 3350. <https://doi.org/10.3390/ijms20133350>
 12. Adel, S. & Carels, N. (2023). Plant tolerance to drought stress with emphasis on wheat. *Plants*, 12, 2170. <https://doi.org/10.3390/plants12112170>
 13. Alsamman, A.M., Bousba, R., Baum, M., Hamwieh, A. & Fouad, N. (2021). Comprehensive analysis of the gene expression profile of wheat at the crossroads of heat, drought and combined stress. *Highlight. BioSci.*, 4. <https://doi.org/10.36462/H.BioSci.202104>
 14. Jogawat, A. (2019). Osmolytes and their role in abiotic stress tolerance in plants. In *Mol. Plant Abiotic Stress: Biol. Biotechnol.*, pp. 91-104. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch5>
 15. Hossain, M.A., Hoque, M.A., Burritt, D.J. & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In Ahmad, P. (Ed.). *Oxidative Damage to Plants*. (pp. 477-521), *Antioxidant Networks and Signaling*; Academic Press is an Imprint of Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
 16. Kolupaev, Yu.E., Vainer, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of the content in plants under stress conditions. *Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol.*, Iss. 2, pp. 6-22.
 17. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Andleeb, Z., Vaishali, S., Mukesh, Y. & Upadhyay, R. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5, No. 12, 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
 18. Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X. & Khan, M.A.R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: Understanding the physiological mechanisms. *Plant Biol.*, 24 (2), pp. 227-239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
 19. Dubrovna, O.V., Mikhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2022). Using of proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytol. Genet.*, 56 (4), pp. 361-378. <https://doi.org/10.3103/S009545272204003X>
 20. Dubrovna, O.V., Priadkina, G.O., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2022). Drought-tolerance of transgenic winter wheat with partial suppression of the proline dehydrogenase gene. *Reg. Mechan. Bio.*, 13 (4), pp. 385-392. <https://doi.org/10.15421/022251>
 21. Dubrovna, O.V., Stasik, O.O., Priadkina, G.O., Zborivska, O.V. & Sokolovska-Sergienko, O.G. (2020). Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricult. Sci. Pract.*, 7, No. 2, pp. 24-34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
 22. Slyvka, L.V. & Dubrovna, O.V. (2021). Genetic transformation of promising genotypes of winter soft wheat by the in planta method. *Fakty Eksp. Evol. Orhanizm.*, 28, pp. 106-111 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1384>

23. Dubrovna, O.V. & Priadkina, G.O. (2023). The effect of free proline accumulation on the content of photosynthetic pigments in transgenic wheat plants. *Fakty Eksp. Evol. Orhanizm.*, 33. pp. 118-122 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v33.1578>
24. Busch, F.A., Ainsworth, E.A., Amtmann, A., Cavanagh, A.P., Driever, S.M., Ferguson, J.N., Kromdijk, J., Lawson, T., Leakey, A.D.B., Matthews, J.S.A., Meacham-Hensold, K., Vath, R.L., Violet-Chabrand, S., Walker, B.J. & Papanatsiou, M. (2024). A guide to photosynthetic gas exchange measurements: Fundamental principles, best practice and potential pitfalls. *Plant, Cell & Env.*, 47 (9), pp. 3344-3364. <https://doi.org/10.1111/pce.14815>
25. Shmatko, I.G., Grigoryuk, I.A., Shvedova, O.E. & Petrenko, N.I. (1985). Determination of the physiological reaction of cereals to deterioration of water availability and temperature increase. IPPG, Kiev [in Russian].
26. Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol.*, 144, pp. 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
27. Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59, No. 2, pp. 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
28. Chen, G.-X. & Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their and molecular properties. *Plant Cell Physiol.*, 30, No. 7, pp. 987-998. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077844>
29. Kolupaev, Y.E., Yastreb, T.O., Ryabchun, N.I., Kokorev, A. I., Kolomatska, V.P. & Dmitriev, A.P. (2023). Redox homeostasis of cereals during acclimation to drought. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, 35, pp. 133-168. <https://doi.org/10.1007/s40626-023-00271-7>
30. 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/10.1089ars.2012.5074>
31. Qamar, A., Mysore, K. & Senthil-Kumar, M. (2015). Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front. Plant Sci.*, 6, 503. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00503>
32. Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V. & Kabashnikova, L.F. (2019). Antioxidative system of plants: Cellular compartmentation, protective and signaling functions, mechanisms of regulation. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 55 (5), pp. 441-459. <https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
33. Arora, D., Jain, P., Singh, N., Kaur, H. & Bhatla, S.C. (2016). Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Res.*, 50 (3), pp. 291-303. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1118473>
34. Kiriziy, D.A. & Sheheda, I.M. (2019). Nitrogen distribution in the source-sink system of plants and its role in the production process. *Plant Physiology and Genetics*, 51, No. 2, pp. 114-132 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2019.02.114>
35. Stasik, O.O., Kiriziy, D.A., Sokolovska-Sergiienko, O.G. & Bondarenko, O.Yu. (2020). Influence of drought on the photosynthetic apparatus activity, senescence rate, and productivity in wheat plants. *Plant Physiol. Genet.*, 52, No. 5, pp. 371-387. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.371>
36. Kiriziy, D.A., Kedruk, A.S., Sokolovska-Sergiienko, O.G., Dubrovna, O.V. & Stasik, O.O. (2021). Responses of photosynthetic apparatus of genetically modified wheat plants containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene to drought and high temperature. *Plant Physiol. Genet.*, 53, No. 6, pp. 532-549. <https://doi.org/10.15407/frg2021.06.532>
37. Pornsiriwong, W., Estavillo, G.M., Chan, K.X., Tee, E.E., Ganguly, D., Crisp, P.A., Phua, S.Y., Zhao, C., Qiu, J., Park, J., Yong, M.T., Nisar, N., Yadav, A.K., Schwessinger, B., Rathjen, J., Cazzonelli, C.I., Wilson, P.B., Gilliam, M., Chen, Z.-H. & Pogson, B.J. (2017). A chloroplast retrograde signal, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphate, acts as a secondary messenger in abscisic acid signaling in stomatal closure and germination. *eLife*, 6, e23361. <https://doi.org/10.7554/eLife.23361>
38. Lawson, T. & Matthews, J. (2020). Guard cell metabolism and stomatal function. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 71, pp. 273-302. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100251>

39. Condon, A.G. (2020). Drying times: plant traits to improve crop water use efficiency and yield. *J. Exp. Bot.*, 71, No. 7, pp. 2239-2252. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa002>
40. Bertolino, L.T., Caine, R.S. & Gray, J.E. (2019). Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Front. Plant Sci.*, 10, 225. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225>
41. Isgandarova, T.Y., Rustamova, S.M., Aliyeva, D.R., Rzayev, F.H., Gasimov, E.K. & Huseynova, I.M. (2024). Antioxidant and ultrastructural alterations in wheat during drought-induced leaf senescence. *Agronomy*, 14, 2924. <https://doi.org/10.3390/agronomy14122924>
42. Krieger-Liszka, A., Krupinska, K. & Shimakawa, G. (2019). The impact of photosynthesis on initiation of leaf senescence. *Physiol. Plant.*, 166, pp. 148-164. <https://doi.org/10.1111/ppl.12921>
43. Lopez, M.A., Xavier, A. & Rainey, K.M. (2019). Phenotypic variation and genetic architecture for photosynthesis and water use efficiency in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Front. Plant Sci.*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00680>
44. Carvalho, K., Campos, M.K., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P. & Vieira, L.G.E. (2013). The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.*, 40(4), pp. 3269-3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
45. Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. & Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.*, 53 (1), pp. 11-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03318.x>
46. Kolupaev, Y.E., Karpets, Y.V., Yastreba, T.O., Shemet, S.A. & Bhardwaj, R. (2020). Antioxidant system and plant cross-adaptation against metal excess and other environmental stressors. In: Landi, M., Shemet, S.A., Fedenko, V.S., (Eds.). *Metal toxicity in higher plants*. (pp. 21-66). New York: Nova Science Publishers.

Received 23.12.2024

EFFECT OF DROUGHT ON THE LEAF PHOTOASSIMILATION ACTIVITY AND PRODUCTIVITY OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT PLANTS WITH PARTIAL SUPPRESSION OF THE PROLINE DEHYDROGENASE GENE

D.A. Kiriziy, O.O. Stasik, O.V. Dubrovna, O.G. Sokolovska-Sergiienko, A.S. Holoboroda

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

Under the conditions of a pot experiment, the effects of drought on water deficit, chlorophyll content, chloroplast antioxidant enzymes activity, CO₂ assimilation, and stomatal conductance in flag leaves, as well as the grain yield of transgenic plants of the winter bread wheat line UK 322/17 (T₃), containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, were studied comparing with the original genotype. Drought was imposed on plants of both genotypes by reducing soil moisture to a level of 30 % FC, which was maintained for seven days during the earing—flowering period, and then returned to the control level. Soil moisture for the control plants was maintained at an optimal level of 60—70 % FC. Physiological and biochemical indices were measured on the first day of soil moisture reduction to 30 % FC, on the seventh day at this moisture level, and one week after the restoration of the optimal moisture level. It was found that the drought-treated transgenic plants exhibited better responses to the stressor and its after-effect across all the studied indices compared to the plants of the original genotype. Specifically, the water deficit and chlorophyll content in the leaves of the transgenic plants during drought hardly changed. The net CO₂ assimilation rate in the flag leaves of the treated transgenic plants both under drought conditions and during the recovery period was significantly higher than in the treated plants of original line. It was found that with the same stomatal conductivity, the photo-

synthetic rate in the leaves of the transformants was higher than in the original line plants. Accordingly, the former had an advantage over the latter in the water use efficiency at photosynthesis both under drought conditions and during the period after optimal soil moisture restoration. Although the levels of chloroplast superoxide dismutase and ascorbate peroxidase activities were similar in both genotypes under stress conditions, during the restoration period, the activities in the transgenic plants returned to control levels faster than in the original line plants. A seven-day drought during the critical for wheat earing-flowering period negatively affected the plant productivity of both genotypes, but due to the above-mentioned advantages of the photosynthetic apparatus in the transgenic plants, the degree of this effect for them was significantly less than in the original line. The weight of grain per plant in the transgenic plants was almost one-third higher than in the original line.

Key words: *Triticum aestivum* L., drought, transgenic plants, proline, photosynthesis, productivity.

ORCID

Д.А. КІРІЗІЙ — D.A. Kiriziy <https://orcid.org/0000-0001-6079-893X>

О.О. СТАСИК — O.O. Stasik <https://orcid.org/0000-0001-5023-2529>

О.В. ДУБРОВНА — O.V. Dubrovna <https://orcid.org/0000-0002-4884-7572>

О.Г. СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО — O.G. Sokolovska-Sergiienko
<https://orcid.org/0000-0001-6967-8221>

А.С. ГОЛОБОРОДА — A.S. Holoboroda <https://orcid.org/0009-0005-9481-2687>