

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ТА МОРФОМЕТРІЇ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ФОРМ РОСЛИН ТЮТЮНУ ТА ЙОГО ПОКОЛІНЬ, СТІЙКИХ ДО ВОДНОГО РЕЖИМУ

Лариса БРОННІКОВА^{1,2}

Останнім часом спостерігається скорочення площ орних земель з достатньою вологозабезпеченістю, що супроводжується збільшенням засолення ґрунту та є однією з причин зниження врожайності сільськогосподарських культур. Водний дефіцит в умовах засолення може посилювати дію сольового стресу.

Водний дефіцит – є різновидом осмотичного стресу. Втрачаючи вологу, рослина суттєво обмежує свою життєдіяльність, а також призводить до повної загибелі. Розробка підходів з метою отримання рослин, які б відзначались стійкістю до посухи набуває своєї актуальності. Саме стійкість рослин до несприятливого чинника завжди є проблемним і актуальним питанням в зв'язку із глобальним потеплінням.

Нами експериментально отримано стійкі клітинні форми тютюну, а також визначався рівень L-проліну як в рослинах нащадках, та і в рослинах дикого типу.

При дослідженні проростання насіння та аналізі молодих проростків встановлено наступні особливості: при проростанні за нормальних умов *in vitro*, морфометричні показники надземної частини та кореневої системи тютюну значно відрізняються від рослин нащадків першого та другого покоління, дикого типу; молоді проростки R1 R2 відзначались пластичністю метаболізму, яка проявлялася у адаптаціях при кардинальних змінах культуральних умов *in vitro*. У контрольних рослин рівень амінокислоти переважав саме у ювенільних рослинах, а у нащадків першого та другого покоління, органоспецифічна різниця була несуттєва.

Ключові слова: клітинні лінії, тютюн, водний дефіцит, вільний L-пролін, рослини R1, R2 покоління.

¹ Кафедра фізіології та інтродукції рослин, Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, проспект Науки, 72, Дніпро, 49010, Україна

² Відділ генетичної інженерії, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

Development of biotechnological approaches for obtaining tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) R1 and R2 generations resistant to water deficit

Bronnikova L.

Recently, there has been a reduction in the area of arable land with sufficient moisture supply, which is accompanied by an increase in soil salinity and is one of the reasons for the decline in crop yields. Water deficit in saline conditions can exacerbate the effects of salt stress.

Water deficit is a type of osmotic stress. Losing moisture, the plant significantly limits its vital activity and leads to complete death. The development of approaches to produce plants that are resistant to drought is becoming increasingly important. It is the resistance of plants to unfavourable factors that has always been a problematic and urgent issue in connection with global warming.

We have experimentally obtained resistant cellular forms of tobacco and determined the level of L-proline in both progeny and wild-type plants.

In the study of seed germination and analysis of young seedlings, the following features were established: during germination under normal *in vitro* conditions, morphometric parameters of the aerial part and root system of tobacco differ significantly from those of the first and second generation descendants and wild type; young seedlings R1 R2 were characterised by metabolic plasticity, which was manifested in adaptations under radical changes in *in vitro* culture conditions. In control plants, the level of amino acid prevailed in juvenile plants, and in the descendants of the first and second generations, the organ-specific difference was insignificant.

Key words: cell lines, tobacco, water deficit, free L-proline, R1, R2 generation plants.

¹ Department of Plant Physiology and Introduction, Oles Honchar Dnipro National University, 72, Nauky Ave., Dnipro, 49010, Ukraine

² Department of Genetic Engineering, Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 31/17, Vasylkivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

Вступ

За останні 10 років в Україні зростає виробництво сільськогосподарських рослин. Незважаючи на зростаючий попит у сільськогосподарському виробництві в нашій державі, проблеми питання абіотичного стресу є актуальним. Створення нових форм рослин з покращеними якість, які б відзначались витривалістю та стійкістю негативних умов довкілля (Alonso et al, 2001; Wang et al, 2022). В цілому, зневоднення негативно впливає на організм рослини, що чинить збій метаболізму, порушенню протеїнів, також відображається на хімічний склад клітини, руйнування цитоплазматичного ретикулу та відсутність можливості надходження та накопичення органічних сполук до самої рослини (Ansani, Azadi et al, 2013; Zheng et al, 2023).

Довготривале зневоднення може впливати на коливання амінокислот, а саме збільшення вільного L-проліну в рослинному організмі. Саме його синтез (нагромадження) може підтримувати водний баланс, запобігаючи руйнуванню ферментного складу, розпаду мембранних стінок (Cornic, 2000; Moumita, Bisvar, et al, 2019; Logani, Sing et al, 2022). Питання щодо вивчення посухостійкості є актуальним, оскільки на сьогодні розроблені сучасні підходи для вирішення проблем з стресостійкістю (Gahlaut et al, 2023; Paes de Melo et al, 2022; Van Montagu, 2020).

Таким чином, аналізуючи літературні джерела про вивчення активності метаболізму, які б суттєво знижували посухостійкість та активують фізіологічні та біохімічні реакції в рослині.

Методика та матеріали

Об'єктом дослідження обрано тютюн, *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун та Дюбек). У дослід залучали молоді рослини віком 60 діб розміром ~ 15,0 см. Рослини представляли собою насіннєве покоління R1 і R2 потомство регенерантів клітинних культур R0 стійких до клітинних ліній, отриманих в результаті розроблених доз іонів важких металів (ІВМ).

Пролін визначали згідно методики (Bates, 1973). Отримані результати статистично оброблені.

Результати досліджень та обговорення

Різновидністю осмотичного стресу є водний стрес, під час якого рослинний організм піддається впливу лише осмотичної складової та зазнає зневоднення. При аналізі літературних даних про вплив іонів Cd^{2+} на перебіг фізіологічних реакцій

рослин вказувались деякі з них, пов'язані з регуляцією водного статусу (Robin et al, 2021). В умовах перманентного водного стресу відбувалося незворотне зневоднення рослинних клітин. Осмотичні стреси (засолення та посуха) однаково викликають водний дефіцит, однаково можуть здійснювати специфічний вплив на метаболізм рослин. Деякі автори мають докази на користь постулату про первинну дію гідралічного сигналу (не гормонального впливу), який генерується в корінні у відповідь на сольовий стрес або ґрунтову посуху та миттєво поширюється, трансформуючись в клітинах в хімічні регуляторні сигнали й індукуючи формування ефективних захисних механізмів (Rithesh et al, 2023). Аналіз друків особливо вирізняв різнопланову роль проліну при захисті рослин від ушкоджень осмотичного стресу, а також динамічний характер змін цього показника (Liao et al, 2023). Наші попередні дослідження по багатьом позиціям узгоджуються із літературними даними (Gao et al, 2024). Однак, оскільки пролін має власну виняткову систему саморегуляції, ми встановили доцільність вимірювання та оцінювання не лише абсолютних величин вмісту цієї амінокислоти в клітинах, що культивувались за стресових умов, але й динаміки його накопичення/витрачання.

Схожість насіння R1 була на рівні $96,60 \pm 2,34$ %, у R2 на рівні $94,83 \pm 2,47$ %, тоді як насіння дикого типу – $30,21 \pm 1,10$ %. В той же час проростки R1 та R2 з'являлись раніше за кон-

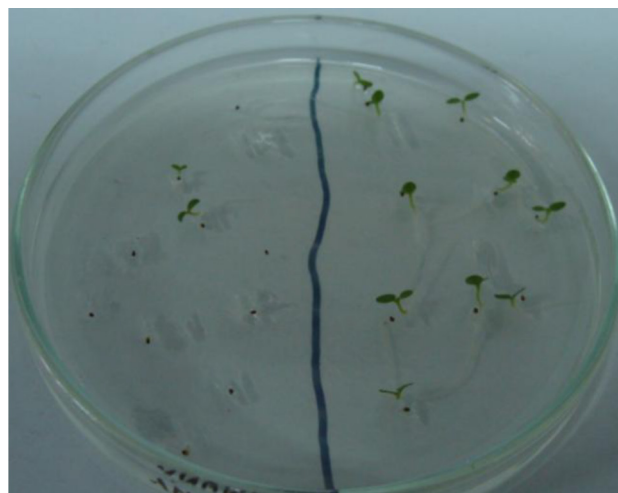


Рис. 1. Життєздатність насіння тютюну після 21-добової експозиції за нормальних умов: 1 – контроль; 2 – R1 стійких клітинних ліній

Fig. 1. Tobacco seed viability after 21 days of exposure under normal conditions 1 – control; 2 – R1 resistant cell lines

трольні та відзначались більш потужним темпом росту, що видно з рисунку 1.

Всі рослини мали по 2 листочки аналогічного розміру, а проростки R1 та R2 мали по 2 і більше корінців (контроль – 1 корінь). Довжина корінців суттєво переважала розміри надземної частини проростка. Товщина корінців проростків була однаковою у рослин, незалежно від генотипу та виду стресової системи.

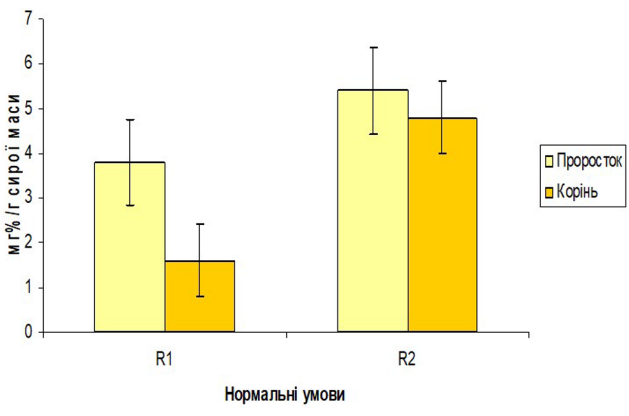


Рис. 2. Вміст вільного проліну у вегетативних тканинах 14-добових рослин тютюну
Fig. 2. Free proline content in vegetative organs of 14 dayold tobacco plants

Вміст *Pro* у вегетативних органах тютюну дикого типу за контрольних (нормальних, не стресових умов) був не значним, тоді як у ювенільних рослинах нащадків першого та другого поколінь спостерігалась не значна різниця органозалежності (Рис. 2).

Після 14-ти добового стресу спостерігали різницю між групами рослин (+H₂O та –H₂O). Дані наведено у таблиці 1.

Така різниця, імовірно, виникала внаслідок суми подій: підвищеного синтезу проліна *de novo* у надземній частині та транспорту проліна з кореневої частини. Таке припущення має сенс, оскільки відомо, що при зневодненні в першу чергу втрачають вологу листки, а однією із властивостей проліну – є його вологоутримуюча здатність (Dar et al, 2016; Fu et al, 2024; Moukhtari et al, 2020; Zhang et al, 2022). Перед визначенням кількості проліну в частинах рослини вимірювали лінійні та вагові показники: загальну довжину; окружність стебла навколо першого вузла куціння; масу надземної та кореневої частин.

На рисунку 3, а, б наведені відносні дані 1 – відношення мас проросток/корінь; 2 – відношення довжина проростка/маса проростка

Спостерігались варіації між контролем та поколіннями, як за умов нормального вологоза-

Таблиця 1. Вміст вільного проліну у вегетативних органах рослин тютюну витримували різну кількість вологи
Table 1. Free proline content in vegetative organs of tobacco plants withstanding defferent amounts of moisture

Лінія	+H ₂ O		–H ₂ O	
	Проросток	Корінь	Проросток	Корінь
Дюбек R1	2,12 ± 0,02	1,32 ± 0,31	98,78 ± 0,22	6,90 ± 0,1
Дюбек R2	3,54 ± 0,30	0,98 ± 0,03	90,44 ± 0,51	132,57 ± 0,64
Самсун R1	2,20 ± 0,06	1,11 ± 0,1	74,06 ± 0,39	59,19 ± 0,92
Самсун R2	3,50 ± 0,22	1,14 ± 0,02	76,22 ± 0,45	130,68 ± 0,70

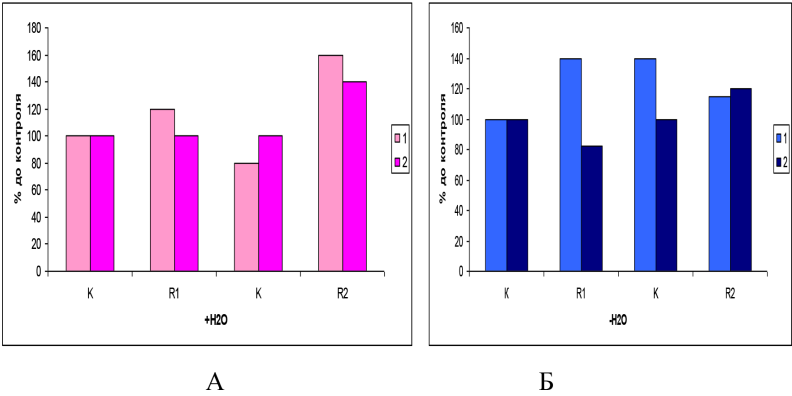


Рис. 3. Відносні морфометричні показники рослин тютюну при нормальному зволоженні (А); на 14-ту добу водного дефіциту (Б) в % до показників контролю за аналогічних умов
Fig. 3. Relative morphometric indies of tobacco plants under normal humidity (A); on 14 days of water deficit (Б) in % of control indies under similar conditions

беспечення, так і за її відсутності. Таким чином, на нашу думку, проявляються особливості онтогенезу кожного окремого експериментального варіанта.

Однак, порівняння позицій а та б за н.у. та при підсушуванні для кожної рослини показало ідентичність відповіді варіанта R1, істотну подібність у варіанта R2, індивідуальний характер акумуляції проліна у контрольних рослин.

Якщо проаналізувати явище підвищення рівня проліну та зміни параметрів рослини за умов недостачі вологи, то не викликає сумніву факт паралельного протікання цих подій. Хоча достовірної кореляції не встановлюється. Так, тотожне зростання вмісту проліна в коренях рослин нащадків першого та другого поколінь відбувається у різних за розміром органах. В той же час в поколіннях, подібних за масою та довжиною вегетативних органах акумулюється різна кількість проліна.

На нашу думку, можливо, така неоднозначність отриманих нами даних пов'язана з недостатністю стресостійкості. Це могло бути пов'язано з некоректним визначенням строку відсутності поливу та температурних змін протягом доби.

Тому, можливо, ми відслідковуємо швидкі реакції на зміни умов культивування (Ansari, Azadi et al, 2013; Cornic, 2000; Moukhtari et al, 2020; Khoma et al, 2021). Можливо така варіабельність між рослинами спільного походження виникає в наслідок змін, які відбуваються на ранніх стадіях ембріогенезу або ще раніше (Fu et al, 2024; Wu et al, 2022).

В той же час отримані дані не дають можливості пов'язати зростання рівня проліна із збільшенням рівня посухостійкості тютюну. Запропонований нами метод, на нашу думку, є креативним та

сучасним, для впровадження дослідження проблем стійкості.

Висновки

Отже, адаптивну відповідь рослин на дефіцит води індукують стресові сигнали, що транспортуються з кореня по ксилемі, формують специфічні й неспецифічні системи реакцій, які функціонують на всіх рівнях ієрархічної організації рослинного організму.

Встановлено, що в умовах дефіциту води вплинуло на поліпшення накілчення насіння з подальшим проростанням у поколінь *Nicotiana tabacum* L. Захищеність рослини в несприятливих умовах залежить від накопичення вільного проліну у проростках насіння нащадків тютюну, що підтверджує перспективність застосування метаболічно активних речовин для адаптації рослин в умовах уповільненого надходження води. Паралельні біохімічний і морфологічний аналізи показали, що у варіанта R1 та R2 аналогічна акумуляція проліна відбувається у різних за статусом органах. Тому подальше вивчення впливу вище зазначених речовин для сільськогосподарських рослин в умовах нестачі води, є актуальним та цікавим для подальшого вивчення. При дослідженні проростання насіння та аналізі молодих проростків встановлено наступні особливості: при проростанні за нормальних умов *in vitro*, морфометричні показники надземної частини та кореневої системи форм тютюну R1 та R2 переважають показники рослин дикого типу; молоді проростки R1 R2 відзначались пластичністю метаболізму, яка проявлялася у адаптаціях при кардинальних змінах культуральних умов *in vitro*.

ANSARI, O., AZADI, M., SHARIF-ZADEN, F., YOUNESI, E. (2013) Effect of hormone priming on germination characteristics and enzyme activity of mountain Rye (*Secale montanum*) seeds under drought stress conditions. *Journal of stress physiology and Biochemistry*, 9(3), 61–71

ALONSO, R., EVIRA, S., CASTILLO, F.J., GIMENO, B. S. (2001) Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environmental*, 24(6), 905–916

BATES, L. S., WALDREN, R. P., TREARE, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant soil*, 39, 205–207

CORNIC, G. (2000) Drought stress inhibits photosynthetic by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Science*, 5(5), 187–188

DAR, M. I., IFRAN M., REHMAN F., NAUSHIN F. (2016) Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance

and plant development. *In: Osmilites and plants acclimation to changing environment onics technologies*. PP. 155–166. DOI: 10.1007/978-81-322-2616-1_9

GAHLAUT, V., GAUTAM, T., WANI, A.H. (2023) Chapter 6. Abiotic stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular breeding perspectives. *QTL Mapping in crop improvement present progress and future perspectives*. P.101–117 DOI: 10.1016/B978-0-323-85243-2.00001

GAO, Y., ZHAO, C. (2024) Development and applications of metabolic models in plant multi – omics research. *HYPERLINK «https://www.frontiersin.org/journals/plant-science» Frontiers in Plant Science*, 15, 1361183 DOI: 10.3389/fpls.2024.1361183

FU, Z., CIAS, F., WIGNERON, J-P., GENTINE, P., FELDMAN, A. F., MAKOWSKI, D., VIOVY, N., KEMANIAN, A. R., GOLL, D. S., STOY, P. C., PRENTICE, I. C., YAKIR, D., LIU, L., MA, H., LI, X., HUANG, Y., YU, K., ZHU, P., LI, X., ZHU, Z., LIAN, J.,

- SMITH, W. K. (2024) Global critical soil moisture thresholds of plant water stress. *Nature Communication*, 15, 4826. DOI: 10.1038/s41467-024-49244-7
- MOUMITA, M. J., BISVAS, P., NAHAR, K., FUJITA, M. (2019) Exogenous application of gibberellic acid mitigates drought – induced damage in spring wheat. *Acta Agronomica*, 72(2), 1776. DOI: 10.5586/aa.1776
- MOUKHTARI, A., CABASSA-HOURTON, C., FARISSI, M., SAVOURE A. (2020) How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? *Frontiers Plant Science*, 11 DOI: 10.3389/fpls.2020.01127
- PAES DE MELOI, B., AVELAR CARPINETTI, P., FRAGA, O. T., FIORESI, V. S., De CAMARGOS, L. F., Da SILVA FERREIRA, M. F. (2022) Abiotic stress in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. *Plants*, 11(9), 1100. DOI: 10.3390/plants11091100
- RITHESH, L., CHANDRAN, D. R., JOHN, A. (2023). Plant's defence mechanisms against pathogens- structural defence and biochemical defence. *In: Recent trends in agriculture*. 3, PP. 227–248. DOI: 10.22271/int.book.233
- ROBIN, A. H. K., GHOSH, S., SHAHED, Md. A. (2021) PEG – induced osmotic stress alters root morphology and root hair traits in wheat genotypes. *Plants*, 10(6), 1042 DOI: 10.3390/plants10061042
- KHOMA, Y. A., NESTERENKO, O. G., KUTSO-KON, N. K., KHUDOLIEIEVA, L. V., SHEV-CHENKO, V. V., RASHYDOV, N. M. (2021) Proline content in the leaves of poplar and willow under water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3), 519–522. DOI: 10.15421/022171
- LIAO, Z., ZHO, U Z., LI, Y., ZHANG, Y. (2023). Plant metabolism and synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(3), 563–564. DOI: 10.1016/j.synbio.2023.08.005
- LOHANI, N., SING, M., BHALLA, P. (2022) Biological parts for engineering abiotic stress tolerance stress in plants. *BioDesing Research*, 9819314. DOI: 10.34133/2022/9819314
- VAN MONTAGU, M. (2020) The future of plant biotechnology in a globalized and environmentally endangered world. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), 1–11. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0040
- WANG, Z., YANG, Y., YADAV, V., ZHAO W., HE, Y, m ZHANG, X., WEI, C. (2022) Drouht – induced proline is mainly synthezed in leaves and transported to roots in watermelon under water deficit. *Horticultural Plant Journal*, 8(5), 615–626. DOI: 10.1016/j.hpj.2022.06.009
- WU, L., WANG, L., HUI, W., ZHAO, F., WANG, P., SU, C., GONG, W. (2022) Physiology of plant responses to water stress and related genes: a review. *Journal Forests*, 13(2), 324. DOI: 10.3390/f13020324
- ZHANG, H., ZHU, J., GONG, Z., ZHU, L-K. (2022) Abiotic stress responses in plants. *Nature reviews genetics*, 23, 104–119. DOI: 10.1038/s41576-021-004413-0
- ZHENG, C., BOCHMANN, H., LIU, Z., KANT, J., SCHREY, S. D., WOJCIECHOWSKI, T., POSTMA, J. A. (2023) Plant root plasticity during drought and recovery: what do we and where to do? *Frontiers Plant Science*, 14, 1084355 DOI: 10.3389/fpls.2023.1084355