

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 581.1:58.02

Сергєєва Л.Є. orcid 0000-0002-6963-1252

Броннікова Л.І. orcid 000-0002-8103-0548

ПРОЛІН У ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ, ОТРИМАНИХ ПІСЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

© Сергєєва Л.Є., Броннікова Л.І.

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
03022 Київ, Васильківська 31/17
e-mail: Zlenko_lora@ukr.net*

<https://doi.org/10.34142/2708-5848.2020.22.1.10>

Отримання форм рослин із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів за останній час пов'язують із застосуванням методів генетичної інженерії. Метою експериментів обирають зміни метаболізму, спрямовані на підвищення рівня протекторних сполук, зокрема вільного проліну. Це здійснюється шляхом впливу на гени систем синтезу/деградації сполуки. Геном, координований із деградацією проліну, є проліндегідрогеназа (*ProDH*).

Проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* генотипів пшениці озимої УК 95/17 та УК 322/17, після якої були отримані зернівки T0. Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, що містив плазмиду rVi2E із цільовим геном – дволанцюговим РНК-супресором гена ПДГ арабідопису. На момент експерименту молекулярно-генетичний аналіз зроблений не був і трансгенний статус не встановлений. Термін «rVi2E форми» лише вказує на процедуру трансформації. Досліджували проростання зернівок за умов модельованого водного стресу. Стрес створювали 0,5М розчином маніту. У присутності маніту спостерігали зниження появи числа проростків у всіх тестованих варіантів. В той же час відмічали генотипові відмінності. Так, у генотипу 95/17 схожість була вищою у вихідній формі, тоді як генотипу 322/17 була власлива зворотна тенденція.

Для дослідження солестійкості зернівки впродовж 10-ти діб пророщували на 0.5 розведеному розчині Мурасіге-Скуга із додаванням 20.0 г/л солей морської води. На 10-ту добу досліду аналізували вміст вільного проліну у листках молодих рослин. Відмічали підвищення рівня проліну у відповідь на дію сольового стресу. За ступенем прояву реакції спостерігали генотипові відмінності. Так, зростання вмісту вільного *pro* при засоленні склало 1,77 і 4,53 рази для генотипів УК 95/17 і УК 322/17, відповідно, та 0.28–1.43 рази у rVi2E форм генотипу УК 95/17 і 2,67–3,70 рази у rVi2E форм генотипу 322/17. В той же час рівні *pro* у біотехнологічних варіантів за абсолютними показниками при дії засолення поступались параметрам вихідних форм.

Характер акумуляції вільного проліну за нормальних і стресових умов не дає доказів на користь функціонування транс гена. За дії осмотичних стресів рівень вільного *pro* зростає в результаті підвищення його синтезу. Відзначені генотипові особливості можуть вказувати на опосередкований вплив на ендогенні гени. Інтродукція та функціональність застосованої конструкції на початкових етапах дослідження можуть бути встановлені при зміні умов стрес – відновлення.

Ключові слова: пшениця озима, генетична трансформація, осмотичні стреси, стійкість, пролін

За останній час кардинальна зміна/погіршення доквілля вимагають від наукового загалу створення та поширення передових біологічних технологій, спрямованих на пришвидшення процесу отримання стійких форм рослин. До новітніх біотехнологічних методів відносяться рі-

зні напрямки генетичної інженерії. Ця біологічна технологія передбачає спрямоване фізичне переміщення гена одного організму до іншого, котре створює можливість (у разі експресії інтродукованого матеріалу) додати ознаку/ознаки, які були відсутні у організма-реципієнта. У та-

кий спосіб можливе створення стрес-стійких форм через зміни метаболізму, оскільки відомо, що такі форми відзначаються певними особливостями.

Ідентифікація такої події особливо необхідна, якщо підвищення рівня стійкості пов'язано із акумуляцією сполук, котрі здатні здійснювати вплив на різні ланки метаболізму. Однією із таких сполук є амінокислота *L*- пролін (*pro*). Властивості цієї органічної сполуки обумовлені її молекулярною структурою, а саме: наявністю α -атому азоту у піролідіновому кільці. Унаслідок цього *pro* не виступає субстратом для ферментів амінокислотного метаболізму – декарбоксилаз, рацемаз, амінотрансфераз. Його нагромадження підпорядковуються власній системі синтезу/деградації/транспорту. Встановлено, що рівень вільного *pro* є суттєво динамічним показником. У той же час незаперечним є факт акумуляції цієї сполуки за дії різноманітних біотичних і абіотичних стресів, під час яких реалізується фізіологічна поліфункціональність дії вільного *pro*: детоксикуюча, осморегульовальна, стабілізуюча [5, 7, 20].

Таким чином, впливаючи на метаболізм *pro* з метою його акумуляції, можливо підвищити загальну стрес-стійкість генотипу.

Якщо не брати до уваги процес перерозподілу/переміщення, який може порушуватись в результаті стресу, рівень вільного проліну саморегулюється експресією/репресією генів ферментів його синтезу (Δ^1 -піролін-5-карбоксилат-синтетази, П5КС) і деградації (про-

ліндегідрогенази, ПДГ) [9, 11]. Особливий інтерес викликає ПДГ. За останній час все більше уваги приділяють даному ферменту, не тільки як координатора рівня вільного проліну але як сполуці, котра бере участь у підтримці клітинного поділу та розвитку генеративних органів [2, 8, 14].

Різновидом генетичної інженерії є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, яка може здійснюватись за умов *in vitro* та *in planta*; кожна із них має свої особливості та складності. Факт інтродукції трансгена встановлюється молекулярно-генетичним аналізом. В той же час інтродукція, як така, не гарантує його активності, а також може додатково здійснювати інший негативний вплив [10]. Позитивний результат проявляється у підвищенні частоти отримання істинних трансформантів, у яких експресується характеристика, набута в результаті трансгенезу, а також у успадкуванні та реалізації ознаки у поколіннях. З огляду на те, що кожний успішний факт трансформації є подією нечастою, відбір потенційних кандидатів доцільно розпочинати на початкових етапах після проведення процедури. Це в подальшому зменшить кількість об'єктів аналізу.

З іншого боку функціональність інтродукованої конструкції можливо аналізувати, відслідковуючи накопичення продукту – похідного цільового гена. У випадку трансгенеза, пов'язаного із метаболізмом *pro*, визначення вмісту цієї амінокислоти може показати на причини її походження.

Метою даного дослідження був аналіз вільного проліна у форм пшениці озимої (T0), отриманих після

Agrobacterium-опосередкованої трансформації *in planta*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були зернівки та 10-ти добові рослини пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.), отримані після проведення процедури *Agrobacterium*-опо-середкованої трансформації *in planta* [13]. Вихідні лінії отримані в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України.

У процедурі трансформації застосовано штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, що містив плазмиду pVi2E із цільовим геном – дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису (ПДГ), що був розташований як обернений повтор. Конструкція створена в Інституті цитології та генетики СВ РАН, Новосибірськ.

На момент експерименту факт успішної трансформації встановлений не був. Тобто, у сукупному масиві отриманих T0 варіантів могли бути присутні трансформанти та не-трансформовані рослини у різних співвідношеннях [18]. Не виключена ймовірність повної відсутності генетично-модифікованих форм. В той же час зернівки/проростки уже можуть вважатись біотехнологічними формами. Тому T0 варіанти були позначені як pVi2E об'єкти дослідження.

Осмотичний стрес *in vivo* представлений двома різновидами – засоленням або водним дефіцитом, трапляється й поєднання. При створенні модельованого осмотичного стресу *in vitro* традиційно розділяють ці характеристики, оскільки во-

ни стосуються різних аспектів функціонування. Водний стрес створюють додаванням молекулярних осмотиків (маніт, сахароза, декстроза тощо); для моделювання засолення до живильних середовищ додають різні типи солей. Наші попередні дослідження [16] показали, що експериментально отримані клітинні лінії / рослини можуть в обох випадках акумулювати вільний пролін у значних кількостях. Тому у даному дослідженні вважали доцільним визначити реакції T0 рослин на обидва стресових чинника. Схожість насіння перевіряли із застосуванням маніту. Маніт є визнаним чинником, який впливає на осмотичний тиск середовища. У той же час ця сполука не піддається метаболізму; тим самим моделюється водний стрес. У такий спосіб найшвидше можливо встановити загальну післядію (пригнічення/активація/відсутність) процедури генетичної трансформації, як такої, на увесь масив отриманих варіантів. У той же час тестування за умов засолення дає змогу виявляти індивідуальні характеристики штучно створеного генотипу, що особливо необхідно при інтродукції трансгена. Для визначення ефективності схожості насіння (50 зернівок) прощували по 25 зерен у чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому водою або 0.5М розчином маніту. Сумарну кількість пророслих зернівок підраховували на 7-му добу.

Для аналізу вмісту проліну зернівки впродовж 2 годин замочували у воді $t^{\circ} \sim 30^{\circ}$, а потім переміщували в умови пророщування [19]. Зернівки розкладали в чашки Петрі на фільтрувальний папір, змочений напіврозведеним живильним середовищем Мурасіге-Скуга (0,5 КБС) [12] або цим середовищем із додаванням 20.0 г/л солей морської води (2,0 мв). На відміну від маніту, який змінює водний статус, іони, що входять до складу морської солі, переміщуються між органами, впливаючи на метаболізм. Це позначається на вмісті вільного проліна. Пролін аналізували на 10-ту добу у листках за стандартною методикою [1].

Оскільки факт інтродукції трансгена залежить від багатьох факторів, у тому числі від особливостей конкретного реципієнта, то вміст проліну аналізувався для кожного об'єкту окремо. На діаграмі наведено максимальні та мінімальні значення абсолютної величини вмісту *pro* у біотехнологічних рослин. Всього було проаналізовано 29 рВі2Е рослин; з них 12 рослин, отриманих після трансформації генотипу 95/17 і 7 рослин, отриманих після трансформації генотипу 322/17. Достовірність такого підходу була підтверджена нами раніше [18]. Для контрольних генотипів здійснена статистична обробка та визначена стандартна помилка.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Здійснювали порівняння за різних умов *in vitro* форм пшениці озимі-

мої на початкових етапах онтогенезу.

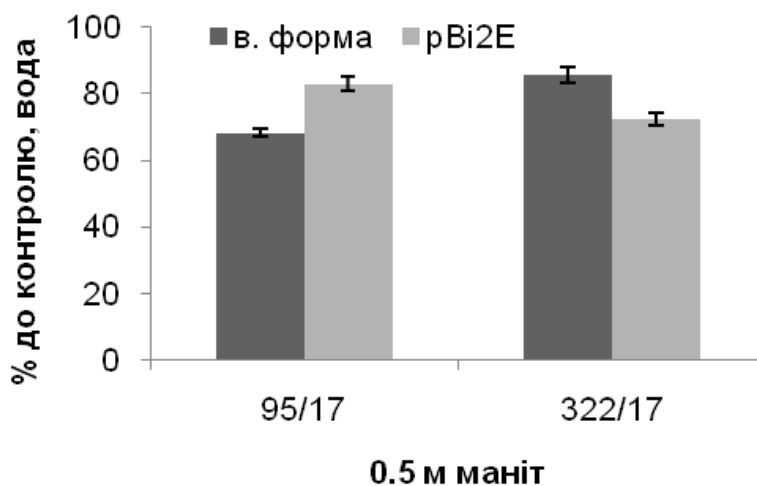


Рис. 1. Проростання зернівок пшениці озиміої (% до контролю на воді) за стресових умов; в. форма – вихідна форма, яку піддавали процедурі трансформації; рВі2Е – форма відповідного генотипу (95/117 або 322/17), отримана після трансформації

Перша стадія – проростання; фіксувалось проростання зернівок як вихідних, так і отриманих після про-

цедури трансформації форм. Діаграма на рисунку 1 ілюструє зниження появи числа проростків у всіх тесто-

ваних варіантів при витримуванні за дії розчину маніту впродовж 7-ми діб. За цей період закінчується проростання.

Стосовно схожості спостерігались генотипові відмінності, а також різниця між вихідними та рВі2Е формами. У вихідних генотипів за дії водного стресу зійшло $\sim 72.8\%$ і 81.9% зернівок генотипів УК 95/17 і УК 322/17, відповідно. Для рВі2Е форм схожість була: $\sim 81.3\%$ для генотипу УК 95/17 та 74.6% для генотипу 322/17.

В той же час суттєвої візуальної морфологічної варіабельності не відзначали. З огляду на останнє у листках визначали вміст вільного *pro*.

Діаграма на рисунку 2 відображає вплив середовища на акумуля-

цію *pro*. На відміну від маніту солі впливають не тільки на водний але й на іонний статус рослини. Діаграма також демонструє генотипову варіабельність та різницю в акумуляції *pro* між вихідними та рВі2Е формами. Так, зростання вмісту вільного *pro* при засоленні склало 1.77 і 4.53 рази для вихідних форм генотипів УК 95/17 і УК 322/17, відповідно. Збільшення цього показника відносно норми було у межах 0.28–1.43 рази у рВі2Е форм генотипу УК 95/17 та 2.67–3.70 рази у рВі2Е форм генотипу 322/17.

В той же час рівні *pro* у біотехнологічних варіантів за абсолютними показниками при дії засолення поступались параметрам вихідних форм.

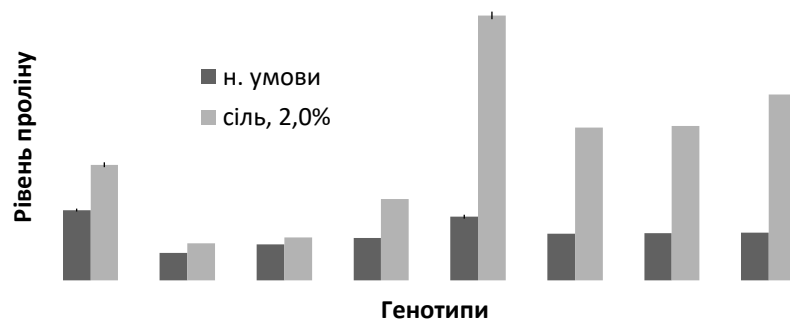


Рис. 2. Вміст вільного проліну (мг% / сир. речовину) в листках 10-ти добових рослин пшениці озимої за різних умов культивування *in vitro*; УК 95/17, УК 322/17 вихідні форми, які піддавали процедурі трансформації; рВі2Е 1,2,3 – форми відповідних генотипів, отримані після трансформації

Оскільки досліджувались проростки на початкових стадіях вегетації, ми вважаємо можливим при подальшому обговоренні не врахо-

увати подію перерозподілу проліну як несуттєву у питанні, що розглядається.

ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що стрес-стійкість рослин може суттєво змінюватись

впродовж вегетації. З огляду на це доцільно аналізувати цю характери-

стику в динаміці з перших строків онтогенезу. Відзначалось, що ефективність проростання може достовірно свідчити на користь активності осмотичного тиску (рис. 1). Це не винятковий факт. Він властивий навіть для природно стійких генотипів [2, 21], а також для штучно отриманих стійких рослин [11, 16, 18].

Порівняння реакцій у межах генотипу виявило різні спрямування. Так, у генотипу УК 95/17 рВі2Е кількість пророслих зернівок за дії маніту перевищувало вихідну форму, тоді як у генотипу УК 322/17 спостерігалась зворотна тенденція. У нашому випадку зміни у кількості проростків ми швидше відносимо на рахунок прояву індивідуальних реакцій, оскільки вони підтверджуються при порівнянні вихідних форм із отриманими після трансформації.

З'явилися публікації, які описують вплив мікроРНК (miRNA) на проростання насіння за дії осмотичних стресів. Так, miRNA160, яка регулює ауксин-реагуючий фактор ARF10 (Auxin-Responsive factor 10), збільшувала активність АБК-споріднених генів у насінні стійкого miR160 мутанта [6]. Експресія miR418 підсилювалась засоленням та при дегідратації. Проростання насіння із над експресією miR417 при засоленні хлоридом натрію було повільніше у порівнянні із диким типом [6].

У нашому випадку для генетичної трансформації була застосована конструкція, яка діяла аналогічно природним miRNA. В той же час молекулярного аналізу не було проведено. Вважати причиною змін у

життєдіяльності [3]. Уже на стадії проростання в нашому досліді було відмічено зменшення кількості проростків *in vitro* за умов зниженого кількості пророслих зернівок активність трансгену нема достатніх підстав. В той же час ми не вважаємо отриманий факт результатом післядії маніпуляції, як такої.

Аналіз характеру акумуляції вільного проліну дає можливість оцінити реакції окремих рослин на дію засолення (рис. 2). Підвищення рівня вільного *pro* у проростках вихідних форм при засоленні є очікуваною подією, наслідком активації їхніх систем синтезу. Різницю за абсолютною величиною (УК 95/17 < УК 322/17), на наш погляд, можна пояснити генотиповими особливостями адаптації, оскільки за нормальних умов вміст амінокислоти був аналогічним.

Суттєвіші генотипові відмінності спостерігались при аналізі рослин, отриманих після трансформації. За нормальних умов рівень вільного *pro* був меншим ніж у вихідних форм.

Ця тенденція зберігалась за дії засолення. При цьому абсолютні показники у генотипу УК 95/17 рВі2Е також поступались величинам, відміченим у генотипу УК 322/17 рВі2Е.

За дії засолення вміст вільного *pro* у біотехнологічних проростків зростав відносно показників норми залежно від генотипу. Оскільки в обох випадках застосовували одну конструкцію та витримували один протокол трансформації, то фіксований результат свідчить про ефект

ендогенних генів, а не транс генів. Крім того, за стресових умов рівень вільного *pro* визначається ступенем його синтезу, що також виключає участь ПДГ.

З іншого боку менші рівні проліна у біотехнологічних рослин можуть свідчити на користь його меншої потреби. У цьому разі ймовірно припущення участі інших протекторних сполук, а саме сахарози. Було встановлено, що швидка індукція одного із генів проліндегідрогенази здійснюється за участю транскрипційного фактору *bZIP11*, котрий активується сахарозою [4, 15]. У той же час сахароза, як така, безпосередньо пригнічує експресію гена *ProDH2*, тоді як присутність *pro* та NaCl його індуюють [5]. Раніше нами аналізувалось співвідношення пролін/вуглеводи у калюсі, який був ініційований із T1 рослин кукурудзи. Було встановлено, що в культурі під дією засолення співвідношення моноцукри/сахароза несуттєво зросло, тоді як акумуляція проліна перевищувала норму в 2.8 рази [17]. У даному випадку ми не можемо виключити подію участі сахарози. Якщо це мало місце, то таким чином (опосередковано) міг здійснюватися вплив трансгена. Однак прямої відповіді дати неможливо з причини відсутності підтвердження транс генного статусу дослідних рослин. В той же час суттєво менший вміст *pro*

у рВі2Е-рослин достовірно вказує на нижчий рівень синтезу ймовірно внаслідок більшої стрес-стійкості.

У загальному випадку стрес-стійкість рослинного організму проявляється не лише за дії стресового чинника але й впродовж відновлювального періоду, саме під час якого активується ПДГ [14]. У нашому випадку аналіз динаміки змін вмісту проліну вказує на активність його деградації тобто наявність ферменту ПДГ [18].

Як стає зрозумілим із проаналізованих результатів уже на початкових стадіях проростання навіть за відсутності прямого свідчення про інтеграцію та функціональність перенесеного гена біотехнологічні варіанти відрізнялись рядом рис, котрі вказують на їхній «особливий» метаболізм.

Характер акумуляції вільного проліну за нормальних і стресових умов не дає доказів на користь функціонування транс гена. За дії осмотичних стресів рівень вільного *pro* зростає в результаті підвищення його синтезу. Відзначені генотипові особливості можуть вказувати на опосередкований вплив на ендогенні гени. Інтродукція та функціональність застосованої конструкції на початкових етапах дослідження можуть бути встановлені при зміні умов стрес – відновлення.

Література

1. Andriushchenko V.K., Sayanova V.V., Zhuchenko A.A., Diyachenko N.I., Chilikina L.A., Drozdov V.V., Korochkina S.K., Cherep G.I., Medvedev V.V., Niutin Yu.I. (1981) Modifikatsiya metoda opredeleniya prolina dla vyyavleniya zasukhoustoichiviyh form roda *Lycopersicon Tourn.* Izvestiya. Akad. Nauk Moldavskoi SSR 4:55–60 (in Russ.).
2. Daszkowska-Golec A. (2011) Arabidopsis seeds germination under abiotic stress as a concept of action phytohormones. J. Integr. Biol. 15.: 763–773.
3. Grodzinskii A.M., Grodzinskii D.M. (1973). Kratkii spravochnik po fiziologii rastenii. Kiev. Naukova dumka.
4. Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks V.V.W.B., Smeekens S. (2008). The sucrose regu-

- lated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of Asparagine synthetase1 and Proline dehydrogenase2. *Plant J.*, 53,(6): 935–949.
5. Hasegawa P.M., Bressan P.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity *Annu. Rev. Plant Physiol.* 51. 463-499.
 6. Jung K.J., Kang H. (2007) Expression and functional analyses of microRNAs-417 in *Arabidopsis thaliana* under stress condition *Plant Phys. Biochem.* 45.: 805–811
 7. Kaur G.; Asthir B. (2015), Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59 (4): 609–619. Doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3
 8. Kaur D., Grewal S.K., Kaur J., Singh S. (2017) Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biol. Plant.* 61(2): 359–366. Doi.org/10.1007/s10535-016-0695-2
 9. Kiyosue T., Yoshiba Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1996.) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase an enzyme involved in proline metabolism, up regulated by proline but down regulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 8:1323–1335.
 10. Lobov V.P., Tomilin M.V., Veselov A.I. (2010) Geneticheski modifitsirovannye rastenija: dostizhenia, perspektivy i ogranichenia. *Vest. Nizhegorodskogo Univers. Ser. Obshchaya biologija* 2(2). 423–29. (in Russ).
 11. Liu J., Zhu J.-K. (1997). Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114.: 591–596.
 12. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15.: 473–497.
 13. Mykhalska S.I., Komisarenko A.H., Kurchii V.M., Tishchenko O.M. (2018) Agrobacterium-mediated in planta transformation of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Faktyory eksperymentalnoi evolutsii organismiv.* 22: 293–298. (in Ukr.).
 14. Ribarits A., Abdulaev A., Tashpulatov A., Richter A., Heberle-Bors E., Touraev A. (2015) Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* 225(5): 1313–1324. Doi 10.1007/s00425-006-0429-3.
 15. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) A novel subgroup of bZIP11 proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Phys.* 45(4): 309–317.
 16. Sergeeva L.E. (2013) Cell selection with heavy metal ions for obtaining plant genotypes with combined resistance to abiotic stresses. *Kiev. Logos.*
 17. Sergeeva L.E., Kurchii V.M., Matveeva A.Yu., Tishchenko E.N. (2016) Proline and sucrose in maize calli cultures under simulating osmotic stresses. *Plant phys. and genetics* 48(2):140-145.
 18. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Komisarenko A.H. (2019) Modern biotechnologies towards increase plant osmotic stresses tolerance. *Kiev. Condor*
 19. Sergeeva L., Khomenko L., Bronnikova L. (2019) There is the wheat biotechnology. Free proline levels during early stages of fall wheat genotypes seeds growth as the evaluation marker heat tolerance. *Nauk. Visnyk Skhidnoeuropeiskogo Nats. Universytetu im. Lesi Ukrainky. Biologichni nauky* 9(388): 13–16. Doi.org/10.29038/261704723-2019-388-4-17-27 (in Ukr).
 20. Szabados L., Savoure A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: .89–97.
 21. Weitbrecht K., Müller K., Leubner-Metzger G. (2011). First of the mark: early seed germination. *J. Exp. Bot.* 10: 1093–1096.

UDC 581.1:58.02

PROLINE IN WINTER WHEAT SHOOTS, OBTAINED AFTER GENETIC TRANSFORMATION

L.Ye. Sergiyeva, L.I. Bronnikova

Gene engineering is one of the most appropriate methods for obtaining plants with higher tolerance to osmotic stresses. Osmotic stress stimulates the synthesis of compatible solutions that protect plants. The free proline was suggested as one of the possible means for overcoming osmotic stress. Its degradation after stress can provide nitrogen, carbon energy. The enzyme connected with proline degradation is proline dehydrogenase, (ProDH). ProDH serves important functions of stress reactions and the development of plants.

Agrobacterium-mediated winter wheat transformation in planta using the strain LBA4404 was performed. The primary forms, genotypes UK 95/17 and UK 322/17, were selected in the Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine. The seeds were gathered and considered to be T0 generation, but till the experiment insertions of the transgene were not verified by PCR. The seeds were germinated on filter paper soaked with a 0.5M solution of mannitol. Germination frequencies were scored after a week of incubation. Mannitol affected seed germination in all tested types. At the same time genotype differences were observed. Under stress condition, the ger-

mination level of 95/17 initial form exceeded this parameter of T0 variants. At the same time, the 322/17 genotype demonstrated the opposite tendency.

To study the salt resistance of the seeds, they were germinated in 0.5 diluted Murashige-Skuga solution with the addition of 20.0 g / l of seawater salts for 10 days. Free proline levels were estimated in the leaves of 10-day shoots. The winter wheat genotypes demonstrated peculiar characteristics. Salinity provoked the growth of free proline levels. For initial forms of UK95/17 and UK322/17, the proline levels were 1.77 and 4.53 times higher than normal parameters. At the same time under salinity the proline levels in T0 shoots of genotype 95/17 were 0.28–1.43 times and in T0 shoots of genotype 322/17 were 2.67–3.70 times of control marks. However, the proline numerical data of T0 forms of both genotypes were lower than the stress figures of their initial forms.

Under osmotic stresses, the increase of proline is usually due to the growth of its synthesis. The events of transgene insertions were not verified by PCR. So we have no open data about transgene activity. But the peculiar features that we observed can be indicators of the indirect influence of transgene. The plant proline level even under normal conditions is not a constant feature but it changes during the vegetation. Proline is not only a compatible osmolyte but regulates the gene expression. In our opinion, the effectiveness of such a construction for obtaining plant forms with higher stress tolerance can be estimated during changes in stress/restoration conditions.

Key words: winter wheat, gene transformation, osmotic stresses, tolerance, proline.