



Розділ I. Ботаніка

УДК 581.1:58.02

DOI: <https://doi.org/10.29038/NCBio.23.1-1>

Дослідження характеру акумуляції розподілу вільного проліну в органах рослин за умов норми та стресу

Лариса Броннікова

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, м. Київ

Адреса для листування: Zlenko_lora@ukr.net

Отримано: 29.01.23; прийнято до друку: 10.04.23; опубліковано: 29.06.23

Резюме. Кардинальна зміна кліматичних умов обумовлюють зростаючий дефіцит сільськогосподарських рослин, а також стимулюють розвиток нових біотехнологій. Для отримання форм рослин із підвищеним рівнем стійкості до абіотичних стресів активно використовують методи генетичної інженерії, а саме різні модифікації *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. В результаті ряду біотехнологічних маніпуляцій були отримані ГМ-рослини *Triticum aestivum* L. Досліджувались рослини 7-ми добові T2 рослини пшениці озимої генотипу УК 95/17, та було проаналізовано реакції на дію короткострокових засолення та водного дефіциту, пов'язані з акумуляцією вільного проліну, а також характер відновлення після стресів. Акумуляція протекторної сполуки спрямована на збереження життєздатності культури. Відомо, що пролін за стресових умов може утворюватись як у результаті його підвищеного синтезу, так у наслідок деградації пролін-містких протеїнів клітинної оболонки. Проведені експерименти показали, що трансгенні рослини, відзначаються стійкістю до осмотичного стресу. В той же час тільки паралельне їхнє дослідження може дати більш чітку інформацію про їх характер.

Ключові слова: Пролін, засолення, водний дефіцит, відновлення, *Triticum aestivum* L., ГМ-рослини, T2 покоління.

Study of the character of the accumulation of the distribution of free proline in plant organs under normal and stress conditions

Larysa Bronnikova

Institute of Plant Physiology and Genetics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, Kyiv

Correspondence: Zlenko_lora@ukr.net

Abstract. Drastic changes in climatic conditions cause a growing shortage of agricultural plants, and also stimulate the development of *Adrobacterium* – mediated transformation are actively used to obtain forms of plants with an increased level of resistance to abiotic stresses. As a result of a series of biotechnological manipulations; GM plant *Triticum aestivum* L. was obtained. 7-day T2 plants of *Triticum aestivum* L. genotype UK-95/17 were studied and the response to the effects of short-term settlement and water deficit, related to the accumulation of free proline, as well as the nature of seed production under stress were analyzed. Accumulation of the protective effect is aimed of the culture. It is know that proline under stressful condition can be for med both as a result of its increased synthesis and as a result of the degradation of proline – containing proteins of the cell membrane. Conducted experiments showed that transgenic plants are characterized by resistance to osmotic stress. At the same time only their parallel study can provide more clear information about their character.

Key words: Proline, salinity, water deficit, recovery, *Triticum aertivum* L., GM plants, T2 generation.

ВСТУП

Виняткову роль у підтриманні активності людства відіграють злаки, серед яких значне місце посідає пшениця. Більш того, дослідники вважають, що значення пшениці майбутньому буде зростати і саме ця культура стане провідною [1, 2, 3, 18, 34]. Розповсюдження пшениці обумовлено високою поживністю зерна, із якого отримують багато харчових продуктів, а також її високою біологічною пластичністю стосовно екологічних умов. В Україні особливу увагу приділяють пшениці озимій з огляду на фенологічні особливості держави. В державі цією культурою засівають в середньому 6,5 млн га, або 40% площ посівів всіх зернових. На сьогодні, в Державному реєстрі сортів України налічується біля 260 сортів пшениці, серед яких переважає пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) [1, 2, 4, 5].

І в той же час, як у будь-якої сільськогосподарської культури, сорти пшениці озимої мають регулярно оновлюватись. При цьому нові форми мають бути кращими за попередніх за рядом господарських та загально біологічних показників. Однією із таких ключових характеристик є стійкість до абіотичних стресів.

У загальному питанні стресо-стійкість рослинних організмів є однією із найбільш масштабних та комплексних проблем. Це обумовлено чисельними взаємозв'язками генотип/середовище. При цьому взаємозв'язки повсякчас змінюються під впливом непередбачуваних чинників.

Серед абіотичних стресів найбільш поширеними є засолення та посуха. При цьому площі, котрі втрачаються, зростають, а якісне та кількісне різноманіття рослинних форм зменшується. У дикій природі спостерігається повна втрата окремих генотипів. Планетарне збільшення населення спричиняє гострий дефіцит продуктів харчування. В окремих регіонах піднімається питання гуманітарної катастрофи. Тому завдання отримання стійких до абіотичних факторів форм рослин стає першочерговим. Для України в першу чергу воно пов'язано із пшеницею озимою [1, 3, 7, 11, 18].

Для отримання нових стрес-стійких форм рослин активно застосовують біотехнологічні методи, у тому числі генетичну інженерію, однією із складових якої є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro* та *in planta*. Це новітній метод, що передбачає активне втручання в геном рослини через пряме перенесення природних (виділених із біологічних об'єктів) конкретних генів або штучно створених дизайнерських конструкцій [7, 23, 29, 34].

Отримання нової рослинної форми (мета експерименту) визначає вибір/створення трансгена. Коли мова йде про форму із підвищеним рівнем стрес-стійкості необхідно оперувати із показниками, котрі гарантовано пов'язані із фенотиповими реакціями підтримання активної життєдіяльності за стресових умов.

Стрес-стійкість рослин може підтримуватись як за рахунок реакцій клітинного рівня, так і за умов

кооперативної (узгодженої) роботи організму. При поєднанні обох типів захисту в рослині може мати місце спеціалізація метаболізму, спрямована на акумуляцію певної фізіологічно активної сполуки. Ця сполука має відповідати певним вимогам. По-перше, її кількість не повинна негативно впливати на перебіг біохімічних реакцій і порушувати ключові ланцюги метаболізму. По-друге, сполука може бути переміщена в окремі компартменти як в межах клітини, так і між органами [2, 18, 21, 26, 30].

У низці механізмів захисту рослин за дії осмотичних стресів суттєву роль відіграють сумісні низькомолекулярні протекторні сполуки. В першу чергу *L*-пролін, (*pro*). Відомо, що в загальному випадку рівень вільного *pro* саморегулюється системою синтезу/деградації/транспорту [4, 5, 6, 7, 8, 10, 17]. Геном синтезу є Δ^1 -піролін-5-карбоксилат-синтетаза, (*PSKS*); ген деградації проліндегідрогеназа, (*ПДГ*); транспортується *pro* системою власних та загальних транспортерів [7, 9, 13, 23, 35].

Встановлено, що за стресових умов *pro* акумулюється в значних кількостях. В межах клітини він є продуктом синтезу. Високий вміст *pro* в окремих органах рослин може виникати внаслідок синтезу, а також в результаті його переміщення із зони синтезу.

Також встановленим фактом є взаємозв'язок між розвитком рослинного організму та активністю одного із ферментів, що регулюють рівень вільного *pro*, а саме проліндегідрогеназою (*ПДГ*) [5, 10, 12, 22, 35].

Одним із генів, котрі мають відношення до синтезу *pro*, є ген ферменту орнітин- δ -амінотрансферази (*OAT*). Фермент каталізує перетворення α -кетоглутарат \rightarrow П5К. У літературі є відомості, що ген *OAT* може мати відношення до протистояння абіотичним стресам [5, 7, 17, 23, 34, 35].

Використовуючи інформацію про властивості вільного *pro* і його роль у підтриманні життєдіяльності рослини за стресових умов, у генно інженерних експериментах залучають різні конструкції для проведення процедури трансгенезу, спрямованої на отримання ГМ-форм. Отримані варіанти мають задовольняти наступним умовам: координація підвищеного рівня стрес-стійкості із підвищеним рівнем вільного проліну. Літературні дані вказують на досягнення у отриманні рослин із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів із використанням конструкцій, що мають стосунок до метаболізму проліну [14, 15, 24, 27, 28, 33]. Це стосується і пшениці озимої [3, 5, 30, 32]. В той же час не слід залишати поза увагою загальновідомий факт про втрату базаної ознаки у насінневих поколіннях [5, 7, 12, 29, 34].

Очевидно що, отримання біотехнологічними методами форм рослин із підвищеним рівнем стійкості до абіотичних стресів, пов'язаним із акумуляцією вільного проліну, є пріоритетним дослідженням. В той же час, дослідження трансгенних варіантів є постійною комплексною процедурою; її потрібно пов'язувати також із активністю проростання насіння за стресових умов, підтриманням життєздатності,

швидкістю відновлення після стресу, морфометрією, аналізом поколінь.

Оскільки акумуляція проліну у інтактної рослини залежить від ряду факторів, для коректності інтерпретації доцільно проводити порівняльний аналіз трансгенної рослини та клітинної культури, яку можна отримати із рослини. Реакція клітинної культури додатково може встановити специфічні та неспецифічні реакції адаптації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були молоді проростки T2 покоління пшениці озимої. Вихідна лінія УК 95/17 одержана в Інституті фізіології рослини і генетики НАН України. Зернівки T2 покоління для експерименту були отримані співробітниками відділу генетичної інженерії ІФРГ НАН України, та являли собою рандомізовану групу насіння, відібрану із сукупного загального урожаю.

Зрілі зернівки замочували у теплій воді ~ 30°C впродовж 2 годин, а потім перемішували для пророщування на напіврозведений розчин макроелементів за Мурашіге-Скугом. Пророщування тривало 7 діб. За цей період утворювались рослини із сформованими вегетативними органами. На 7-му добу молоді рослини піддавали короткочасним модельованим осмотичним стресам.

Осмотичні стреси створювали додаванням до напіврозведеного розчину макроелементів за Мурашіге-Скугом, маніту або солей морської води. Маніт, концентрація 0,5 М, моделював водний стрес; солі морської води (морська сіль), концентрація 20,0 г/л модель природного комплексного засолення.

Проростки корінцями занурювали у експериментальні розчини. Тривалість осмотичних стресів була 2 години. Контролем слугували рослини, котрі витримували у напіврозведеному розчині макросолей.

Після дії коротко часового стресу експериментальні рослини піддавали відновленню на контрольному розчині.

Через 2 години стресового впливу та через 2 години відновлення у рослинах вимірювали вміст вільного проліну. Вміст *pro* вимірювали у проростках (надземна частина), відрізаючи корінці, за стандартною методикою Бейца [8]. Аналізували T2 покоління із інтродукованою конструкцією pBi2E із цільовим геном – дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази арабідопсису (*ProDH*), що був розташований як обернений повтор. Дані статистично оброблені.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За нормальних умов були отримані проростки пшениці озимої. У загальному випадку діагностувати рівень життєздатності генотипів на ранніх етапах онтогенезу важливо для селекції пшениці озимої, оскільки в Україні під час проростання зерна періоди весняних або осінніх посух стали більш частими.

Відомо, що шкодочинний ефект засолення та водного стресу зростає пропорційно збільшенню строків дії чинників. Очевидно, що на початкових строках стресової дії візуальної різниці між формами бути не може. У нашому випадку зовнішній вигляд проростків були аналогічні у всіх варіантів. У той же час з огляду на чутливість систем, пов'язаних із регуляцією рівня *pro*, досить очікуваною подією були би зміни у цьому напрямку. На 2-гу годину стресового впливу вимірювали рівень вільного *pro*.

За нормальних умов, (н.у.) до початку досліду рівень *pro* у генотипів пшениці озимої був незначним і складав у мг% / сир. речовину у контролю, УК 95/17 і трансгенних рослин, УК 95/17-T2 відповідно $8,93 \pm 1,44$ і $12,51 \pm 2,25$. Загалом зміни рівня *pro* відбуваються при збереженні загального метаболізму та не виходять за межі норми реакції. Вони можливі за рахунок координації активності систем синтезу/деградації [7, 16, 25, 20, 33]. Відсутність протиріччя підтримується за рахунок просторового розмежування компартментів функціонування ферментів.

Зміни рівня амінокислоти через дві години зафіксовано на рис. 1.

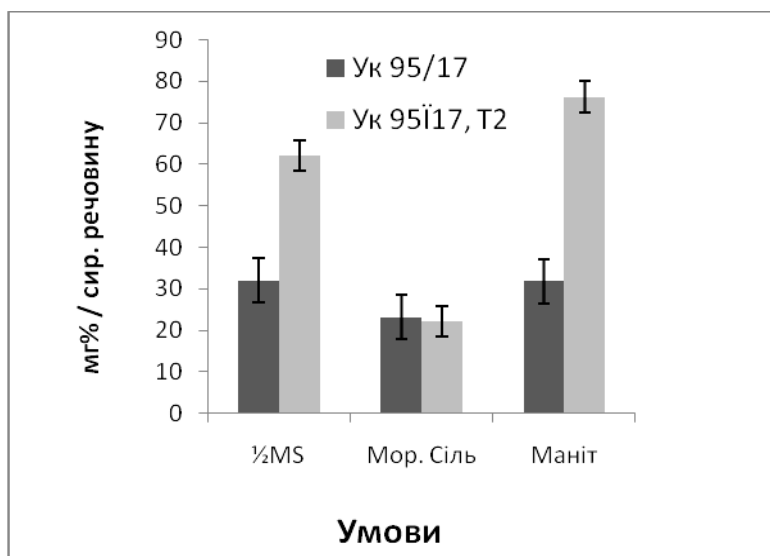


Рис. 1. Вміст вільного проліну в надземних частинах генотипів пшениці озимої через 2 години від початку дії осмотичних стресів

З діаграми видно істотне зростання вмісту вільного *pro* через дві години від початку експерименту. Цей факт проявлявся за будь-яких зовнішніх умов.

За н.у. підвищення рівня амінокислоти було суттєвіше у трансгенних форм. Цю подію із великою ймовірністю можна пояснити зменшенням у цих варіантів рівня деградації *pro*, тобто функціональністю інтродукованого трансгена. В той же час не виключений додатковий ефект підвищення активності з боку системи синтезу. Про це, на нашу думку, може свідчити аналогічний ефект, відзначений у нетрансформованих рослин.

Двохгодинний стрес викликав помітні зміни у характері акумуляції вільного *pro*. При цьому слід зазначити, що характер змін у варіантів був тотожний, залежний від типу стресового чинника, а саме: зниження вмісту *pro* на фоні засолення (іонний стрес) і зростання цього показника у присутності маніту (молекулярний осмотик).

За стресових умов рівень *pro* визначає система його синтезу. У проведеному експерименті водний розчин мікроелементів забезпечував його протікання. Крім того у даному експерименті на користь цього припущення свідчить факт аналогії вмісту амінокислоти у трансформованих та контрольних об'єктів, що мав місце під впливом засолення. Солі морської води на другу годину стресу дещо знижували активність синтезу проліну у порівнянні із параметрами норми, у рівній мірі в обох варіантів.

Дія маніту проявлялась по-різному. У контрольних варіантів вміст *pro* за абсолютною величиною співпадав із показниками не стресових рослин. У трансгенних варіантів рівень проліну підвищувався. Можливо припустити, що в першому випадку стресовий вплив на метаболізм не набрав шкодочинної сили; у другому випадку допустимий факт стимуляції. Переміщення проліну з кореневої частини, на нашу думку, менш імовірне, оскільки втрата вологи була мінімізована за рахунок застосування водного розчину. Можливо у такий спосіб проявляється опосередкована дія інтродукованої конструкції, пряма дія гена *ПДГ* за стресових умов не реалізується.

Таким чином, аналізуючи характер акумуляції вільного проліну на початкових етапах сольового та водного стресів, стає очевидним наявний факт переорганізації функціонування систем його метаболізму. Ця подія сприяє підтриманню загального метаболізму, що візуально проявляється у відсутності стресових уражень.

У загальному випадку активність життєдіяльності організму найбільш підкреслено має проявлятися при змінах довколишнього середовища [21, 12, 22, 31, 34]. Після стресової дії рослини відновлювали на напіврозведеному розчині мікроелементів за Мурашіге-Скугом. Через 2 години після початку реабілітації аналізували рівень *pro*. Дані наведені на рис. 2.

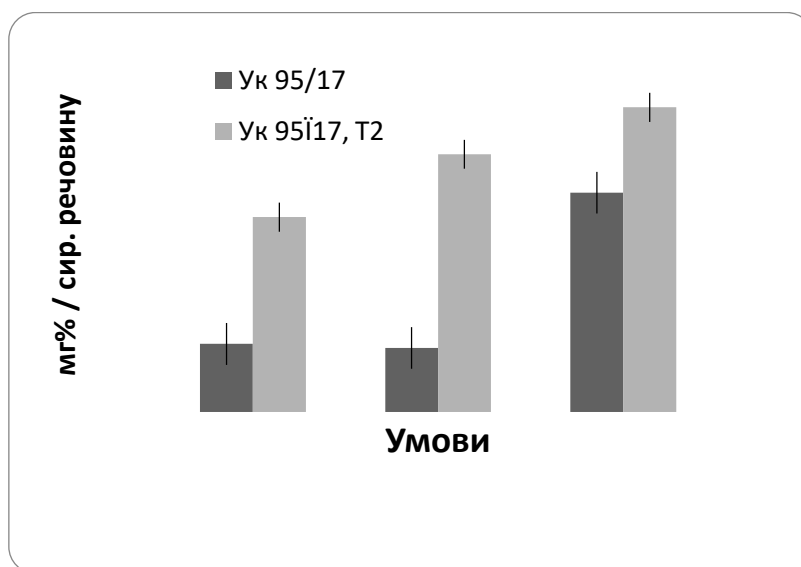


Рис. 2. Вміст вільного проліну в надземних частинах генотипів пшениці озимої через 2 години від початку відновлення після дії осмотичних стресів

За н.у. змін у акумуляції амінокислоти не відбувалось, що підтверджує стабільний перебіг метаболічних реакцій як загального спрямування, так і асоційованих із метаболізмом *pro* у всіх варіантів.

Порівняння рисунків 1 і 2 показало, що перемищення стрес → норма проявлялось різним чином у контрольних та експериментально отриманих варіантів. Так, відновлення після дії засолення не призводило до змін рівня вільного *pro* у вихідній формі але викликало його зростання у T2 рослин.

Стосовно причин можна зробити наступне припущення.

У всіх варіантів відсутність стресового навантаження відновлювало активність гену *ПДГ* паралельно із зниженням активності гену синтезу *pro*. У контрольному варіанту УК 95/17 події активації/зниження протікали із однаковою інтенсивністю, що відображалось у стабілізації рівня *pro*. У трансформованого варіанту УК 95/17-T2 активність гену *ПДГ* суттєво поступалась активності гену *П5КС* завдяки

діездатності інтродукованої конструкції. Різниця між формами, котра спостерігалась на 2-гу годину відновлення, на нашу думку, є проявом індивідуальних особливостей функціонування.

Відновлення після дії маніту мало інший характер. Порівняння рисунків 2 і 3 виявило підвищення рівня *pro* в надземній частині всіх варіантів через дві години після зняття стресового пресингу. Зростання у контрольних і T2 варіантів складало відповідно 150 % і ~ 47 %.

Це неочікуваний факт. Функціональність інтродукованої конструкції, на що вказувалось при аналізі *pro* при відновленні після засолення, мала би створювати зворотний ефект. Тому можливо припустити, що акумуляція проліну у надземній частині за дії молекулярного осмотика відбувалась за рахунок його синтезу в цих органах та додаткового переміщення із кореневої частини, де амінокислота синтезувалась. Такий сукупний ефект пришвидшував нагромадження необхідної кількості сумісного осмоліту. Оскільки ця подія відмічалась у всіх варіантів, можна вважати її неспецифічною адаптивною реакцією на водний стрес.

Сольовий і водний стреси є різновидами осмотичного стресу. В той же час обидва відзначаються своїми особливостями з огляду на механізм їхньої шкодочинної дії. Водний стрес (посуха) викликає істотне зневоднення рослинного організму та комплекс спряжених із цим патологічних перетворень різних компартментів. Сольовий стрес здійснює пошкоджуючий вплив за рахунок іонної структури молекул солей. Різноманіття типів засолень, поєднання декількох видів солей можуть вносити додаткові складові у механізм токсичної дії.

В обох випадках агресивна сила осмотичних стресів визначається тривалістю їхнього впливу, впродовж якого негативні зміни зростають та можуть стати незворотними. Хоча стійкість до осмотичних стресів може проявлятися у різний спосіб у рослинах комбінуються різні стратегії стійкості.

Із вищезазначеного виникає припущення, що адаптація до осмотичних стресів обмежена та залежить від низки факторів. По-перше, це характер генотипу, котрий визначає чутливість/стійкість організму. По-друге, варіабельність адаптації у відповідь на зовнішні зміни. По-третє, доступність ресурсів для підтримання життєдіяльності за стресових умов. По-четверте, здатність до швидкого відновлення.

В ході експерименту тестуванню за коротко-строкових стресових умов піддавали T2 молоді рослини пшениці озимої. Хоча візуалізація дії осмотичних стресів проявляється з часом, зміни з боку системи метаболізму проліну вже відбувались. При цьому спостерігали різний характер адаптацій до засолення та водного стресу. Поряд із цим спостерігали різний характер відновлення. Це в певній мірі було опосередковано конструкцією трансформції.

ВИСНОВКИ

Отримані результати аналізу характеру акумуляції вільного проліну дозволяють зробити наступні висновки.

1. Дія сольового та водного стресів на систему метаболізму проліну відзначається на початкових етапах дії стресових чинників.

2. Адаптація до засолення та водного стресу проходить у різний спосіб.

3. Рівень вільного проліну за стресових умов в рослинах пшениці озимої підтримується за рахунок підвищеного його синтезу.

4. Актуальність інтродукованої конструкції проявляється під час реабілітації після стресу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ковбасенко, Р.В.; Дмитрієв, О.П.; Поляковський, С.О. Особливості селекції рослин на механізм стійкості проти посухи. *Фактори еволюції експериментальних організмів*. 2022, 31, с.55-58. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v.31.1484>
2. Кірізій, Д.А.; Стасик О.О. Вплив посухи і високої температури на фізіолого-біохімічні процеси та продуктивність рослин. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022, 54(2), с.95-122. <https://doi.org/10.15407/frg2022.02/095-122>
3. Михальська, С.І.; Комісаренко, А.Г. Актуальні напрямки сучасних біотехнологій пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022, 54(3), с.187-213. <https://doi.org/frg2022.04/279>
4. Gahlaut, V.; Gautam, T.; Wani, S.H. Abiotic stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular breeding perspectives. *QTL mapping in crop improvement. Present progress and future perspectives*. 2023, p.101-117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85243-2.00001>
5. Дубровна, О.В.; Прядкіна, Г.О.; Михальська, С.І.; Комісаренко, А.Г. Фізіолого – біохімічні характеристики трансгенних рослин озимої пшениці з надекспресією гена організму – Δ – амінотрансферази. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023, 55(1), с.58-73. <https://doi.org/frg2020.01.058>
6. Aadel, A.; Udupa, S.; Abdelwaka, R.; Gaboun, F.; Diria, G.; Douira, A.; Iraqi, D. *Agrobacterium* – mediated genetic transformation of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using immature embryos. - *Romanian agricultural research J.* 2021, 38, pp.1-10. <https://doi.org/2067-5720RAR2021-22>
7. Михальська, С.І.; Комісаренко, А.Г.; Курчій, В.М.; Тищенко, О.М. Генетична трансформація in planta пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018, 22, с.293-298.
8. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourm. *Изв. АН Молдавской ССР*, 1981, №4 С.55-60.
9. Kaur, D.; Grewal, S.K.; Kaur, J.; Singh, S. Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biol. Plant*. 2017, 61(2), p.359-366. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0695-2>
10. Gujjar, R.S., Pathak, A.D.; Karkute, S.G., Supaibulwatana, K. Multifunctional proline rich proteins and their role in regulating alular proline content in plants under stress. *Biologica plantarum*. 2019, 63, p. 448-454 <https://doi.org/10.32615/bp.2019.078>
11. Chum, S.C.; Paramasivan, M.; Chandrasekaran, M. Probusline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular Mycorrhizal symbiotic plants. *Front. Microbiology*. 2018, 9(2525), pp.1-13. <https://doi.org/10.2289/fmicb.2018.0255>
12. Михальська, С.І.; Комісаренко, А.Г.; Курчій, В.М. Гени метаболізму проліну в біотехнології підвищення осмостійкості пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2021, 28, с. 94-99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
13. Zhang, X.; Gong X.; Li, D.; Yue, H.; Qin, Y.; Liu, Z.; Li, M.; Ma, F. Genome – wide identification of genes in apple genome and the role of MdPRP6 in response to heat stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 5942, p.1-17 <https://doi.org/10.3390/ijms22115942>
14. Szabados, L.; Savoure, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2010, 15, p.89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
15. Delauney, A.J.; Verma, D.P. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*. 1993, 4, p.215-223.

16. Kavi Kishor, P.B.; Sangam, S.; Amrutha, R.N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 2005, 88, p.424-428.
17. Patnaik, D.; Vishnudasan, D.; Khurana, P. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. - *Current Science Association*. 2006, 91(3), pp. 307 – 317.
18. Rajasheker, G.; Nagaraju, M.; Varghese, R.P.; Jalaja, N.; Somanaboina, A.K.; Singam, P.; Sreenivasulu, N.; Kavi Kishor, P.B. Identification and analysis of prolin –rich proteins and hybrid family genes from *Sorghum bicolor* and their expression. *Front. Plant Sci.* 2022, 13(952732), p.1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.952732>
19. Alvarez, M.E.; Savouré, A.; Szabados, L. Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science*. 2022, 27(1), p.39-55. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.009>
20. Ahmed, M.; Hassan, ul F.; Qadir, G.; Shaheed, F.A. Aslam, M.A. Response of proline accumulation in bread wheed (*Triticum aestivum* L.) under rainfed condition. *Journal of Agricultural Meteorology*. 2017, p.1-9. <https://doi.org/10.2480/agrmet.D-14-00047>
21. Rady, M.M.; Mohamed, G.F. Improving salt tolerancre in *Triticum aestivum* L. plants irrigated with saline water by exogenously applied proline or potassium. *Advances in Plants and Agriculture Research*. 2018, 8(2), pp.193-199. <https://doi.org/1015406/apar.2018.08.00312>
22. Qayyum, A.; Razzaq, A.; Bibi, Y.; Khan, S.U.; Abbasi, K.S.; Sher, A.; Mehmood, A.; Ahmed, W.; Mahmood, I.; Manaf, A.; Khan, A.; Farid, A.; Janks, M.A. Water stress effects on biochemical traits and antiozidant activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) under *in vitro* conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica. Soil and Plant Science*. 2018, 68(4), p. 283 – 290. <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1395064>
23. Kanval, M.; Gogoi, N.; Jones, B.; Bariana, H.; Bansal, U.; Ahmad, N. Pollen: a potential explant for genetic transformation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 2022, 12(2009), p.1-14. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092009>
24. Hayta, S.; Smedley, M.A.; Clarhe, M.; Forner, M.; Harwood, W.A. An efficient *Agrobacterium* – mediated transformation protocol for hexaploid and tetraploid wheat. – *Curr.Protocols*. 2021, 58(1), pp.1-16 <https://doi.org/10.1002/cpz1.58>
25. Brandt, K.M.; Gunn, H.; Moretti, N.; Zemetra, R.S. A streamlined protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplast isolation and transformation with CRISPR-Cas ribonucleoprotein complexes. *Front. Plant Sci.* 2020, 11(769), pp.1-14.
26. Patel, P.; Patil, T.; Maiti, S.; Paul, D.; Amaresa, N. Serecning of osmotic stress – tolerance bacteria for plant growth promoting in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Grinjan (*Solanum melongema* L.) under drought condition. – *Letters in applied microbiology*. 2022, 75(15), pp.1286 – 1292 <https://doi.org/10.1111/lam.13797>
27. Supartata, P.; Shimizu, T.; Nogawa, N.; Shiori, H.; Nakazima, T.; Haramoto, N.; Nozue, M.; Kojima, M. Development of simple and effient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bios.Bioeng*. 2006, 102(13), pp.162-170.
28. Дубровная О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium* – опосередкованої трасформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2018, 50(1), с.187 – 216. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>
29. Hwang, H.H.; Yu M.; Lai E.M. *Agrobacterium* – mediated plant transformation: biology and application. *American Society of Plant Biologist*. 2017, 20, p.1-30.
30. Wani, S.H.; Tripathi, P.; Zaid, A.; Challa, G.S.; Kumar, A.; Kumar, V.; Upadhogay, J.; Joshi, R.; Bhatt, M. Transcriptonal regulatiob of osmotic stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 2018, 97(6), pp. 469-487. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0761-6>
31. Hayta, S.; Smedley, M.A.; Demir, S.U.; Blundell, R.; Hinchliffe, A.; Atkinson, N.; Harwood, W.A. An efficient and reproducible huthod for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant method*. 2019, 15(121), pp.1-15.
32. Kiryushkin, A.S.; Iliina, E.L.; Guseva, E.D.; Pawlowski, K.; Demchenko, K.N. Hairy CRIPR: genome editing in plants using hairy root transformation. *Plants*. 2022, 11(51), pp.1-39. <https://doi.org/103390/plants11010051>
33. Zhang, X.; Gong, X.; Yu, H.; Su, X.; Chen, S.; Huang, J.; Lei, Z.; Li, M.; Ma, F. The prolin – rich MdPRP6 confers toleramce to salt stress in transgenic apple (*Malus domestica*). *Scientia Hortianturae*. 2023, V.308, 27, pp.1-19. <https://doi.org/10/1017/j.scienta.2022.111581>
34. Duarte – Delgado, D.; Daolshani, S.; Schoof, H.; Oyiga, B.C.; Schneider, M.; Mathew, B.; Leon, J.; Ballora, A. Transcriptome profiling at osmotic and ionic phases of salt stress response in bread wheat uncovers trait – specific candidate gene. *BMC Plant Biology*. 2020, 20(428), p.1-18. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02616-9>
35. Zhong, Y.; Ma, H.; Zhou, T.; Zhu, Z.; Zhong, Y.; Wang, C. ThASR3 confers salt and osmotic stress tolerance in transgenic *Tamarix* and *Arabidopsis*. – *BMC Plant Biology*. 2022, 22(586), pp.1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03942-w>