

УДК 557.21

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ТА КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ОСМОТОЛЕРАНТНОСТІ КУЛЬТУРНИХ РОСЛИН

О.М. ТИЩЕНКО¹, С.І. МИХАЛЬСЬКА¹, Б.В. МОРГУН^{1,2}

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук
України
03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

Розглянуто сучасний стан вивчення епігенетичної регуляції експресії генів культурних рослин за стресів, спричинених водним дефіцитом. Наведено результати досліджень відділу генетичної інженерії Інституту фізіології рослин і генетики НАН України щодо отримання осмотолерантних форм із використанням дволанцюгового РНК-супресора гена проліндегідрогенази та результати генетичного поліпшення рослин методом клітинної селекції.

Ключові слова: siРНК, генетична трансформація, клітинна селекція, осмотичний стрес, кукурудза, соняшник, пшениця, тютюн.

Основою сучасного сільськогосподарського виробництва є створення високопродуктивних сортів та гібридів культурних рослин із підвищеним рівнем стійкості до абіотичних стресорів, серед яких осмотичні чинять найбільш негативний вплив на їх ріст, розвиток та в кінцевому підсумку на продуктивність. Поряд із традиційними методами селекції для вирішення цих завдань останнім часом дослідники почали приділяти увагу розробці системи методів генетичної інженерії для отримання стійких до дії стресорів форм з інтеграцією в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси адаптації/стійкості. Успішному технологічному вирішенню цих проблем сприяє прогрес, досягнутий у галузі структурно-функціональної геноміки, теоретичних і практичних питань *Agrobacterium*-опосередкованої та біолістичної трансформації, фізіолого-біохімічних аспектів трансгенезу культурних рослин.

Стійкість до водного дефіциту та засолення — складні процеси, кожен з яких визначається координованою експресією низки генів. Перспективність використання генів, що відповідають за різноманітні функції, передбачає всебічне дослідження трансгенних рослин та їх насінневого покоління згідно з генетичними, фізіолого-біохімічними, морфологічними даними. При цьому істотне значення має аналіз показників урожайності/продуктивності як у вегетаційних досліджах, так і в природних умовах культивування *in vivo*, однак таких даних дуже мало.

Один з основних напрямів науково-дослідної роботи відділу генетичної інженерії Інституту фізіології рослин і генетики НАН України пов'язаний із фундаментальними й прикладними аспектами епігенетич-

ної регуляції експресії трансгенів, що реалізується на посттранскрипційному рівні (PTGS — posttranscriptional gene silencing). Співробітники відділу розробляють новітні молекулярні siRNA-технології для підвищення осмотолерантності інбредних ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, інбредних ліній соняшника (*Helianthus annuus* L.) селекції Інституту олійних культур та Одеського селекційно-генетичного інституту НААН України з використанням векторної конструкції, в якій дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази розміщений як обернений повтор (векторну конструкцію люб'язно надав д-р біол. наук О.В. Кочетов). Започатковано також роботу з отримання трансгенних рослин пшениці (селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України) з підвищеною стійкістю до осмотичних стресів.

Інтерес до PTGS зумовлений тим, що в результаті цього процесу зміни рівня експресії генів впливають на фенотип без зміни генотипу, тобто за PTGS здійснюється транскрипція, але в цитоплазмі мРНК піддаються частковій фрагментації. Таке явище може стосуватись не тільки інтродукованих трансгенів, а й гомологічних їм рослинних генів [40]. Зазначимо, що з'ясувати молекулярно-генетичні основи цього типу «мовчання» генів допомогло відкриття коротких молекул РНК, що інтерферують [35]. Вони формуються з більших за розміром попередників зі структурою паліндромів або обернених повторів, причому siRNA, що мають розмір 21—25 нуклеотидів (н), аналогічні смисловим або антисмисловим ділянкам дволанцюгових РНК (dsRNA). Ця сфера досліджень стосується не тільки siRNA, а й miRNAs — двох типів РНК специфічного розміру, які розглядають як важливі детермінанти регуляції експресії генів, у тому числі й у відповідній реакції рослин на абіотичні стреси. Біогенез малих інтерферуючих молекул РНК складний і недостатньо досліджений, основна інформація стосується модельних об'єктів — арабідопсису, тютюну [12, 20, 22].

Одне з перших серед нечисленних досі досліджень, яке засвідчило регуляторну роль siRNA/miRNA, пов'язане з підвищенням толерантності арабідопсису до засолення як результат антисмислового перекривання пари генів *P5CDH* і *SRO5*, перший з яких має відношення до метаболізму проліну, тоді як функція другого не з'ясована [33]. У результаті транскрипції обох генів формувалися siRNA розміром 24 н. Після ініціального розщеплення транскриптів гена *P5CDH*, що контролювалося siRNAs (24 н), відбувалися генерування siRNA (21 н) та в подальшому гідроліз транскриптів гена *P5CDH*, унаслідок чого підвищувався рівень вільного проліну. Водночас слід підкреслити, що хоча в цьому випадку продемонстрована важлива роль siRNAs у забезпеченні осмотолерантності, зниження активності ферменту *P5CDH* може призводити до значного акумулювання P5C (токсичного проміжного метаболіту) та програмованої загибелі клітин [8, 20, 37, 39]. У зв'язку з цим при розробці молекулярних біотехнологій, на нашу думку, перспективніше використовувати векторні конструкції, які здатні забезпечити часткову супресію ендогенних генів проліндегідрогенази, що підтверджено подальшими нашими дослідженнями інбредних ліній кукурудзи і соняшника [6, 14].

Наголосимо, що, хоча й обговорюється участь вільного *L*-проліну у складних інтегральних процесах адаптації/стійкості рослин до абіотичних стресорів, роль цієї амінокислоти у формуванні стресостійкості рос-

лин не завжди очевидна [15, 36, 38, 39]. Тому під час аналізу можливостей цього напрямку генетичної інженерії для різних видів і конкретних генотипів насамперед доцільно досліджувати ефективність використання ключових генів, які контролюють або синтез, або катаболізм *L*-проліну. Крім того, важливим моментом є вибір стратегії, здатної забезпечити підвищення вмісту цієї амінокислоти до фізіологічно значущого рівня.

Взагалі процес генетичної трансформації — багатофакторна система. Незважаючи на значні досягнення генетичної інженерії, для багатьох господарсько-цінних видів культурних рослин він залишається непростим завданням. Зокрема встановлено його залежність від низки чинників — агробактеріального штаму, бінарного вектора, типу експланта, генотипу. Мають значення також умови інокуляції, кокультивування, селекції, регенерації пагонів та їх укорінення [34]. Виходячи з цього, співробітники відділу генетичної інженерії запропонували кілька оригінальних способів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* кукурудзи і соняшника вітчизняної селекції. Триває робота з генетичного поліпшення сортів пшениці.

Результати досліджень генетичної трансформації окремих видів дводольних та однодольних довели, що трудомісткі й економічно затратні процедури культивування *in vitro* можна замінити, скориставшись різними способами *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Сьогодні застосовують два основні підходи. Один із них стосується процесу запилення, інший — апікальних меристем зрілого насіння. Щодо першого підходу, то ще в роботах Моргуна та співавт. [13] із прямого перенесення ДНК-плазмід, проведених понад 30 років тому, обґрунтовано його доцільність для генетичної трансформації інтактних рослин кукурудзи. У подальшому автори праці [24] запропонували спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи *in planta* в процесі запилення.

Результати досліджень багатофакторної системи, що включала склад компонентів середовищ для інокуляції, діапазон концентрацій клітин агробактеріальної суспензії, способи її нанесення на тканини генеративних органів рослин *in planta*, оптимізовані умови інтеграції рекомбінантних молекул ДНК у геном цих культур, закріплені патентами України на корисну модель [26, 27, 29—31].

Вперше методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* отримано рослини інбредних ліній кукурудзи, пшениці та соняшника з цільовим геном — длРНК-супресором гена проліндегідрогенази та їх насінневі Т1—Т3 покоління. Встановлено, що генетичну трансформацію *in planta* можна успішно здійснювати з використанням різних обеззброєних штамів *A. tumefaciens* LBA4404, AGLO, GV2260, GV3101, де об'єктивним показником її ефективності є якість насіння біотехнологічних рослин.

При розробці молекулярних біотехнологій, пов'язаних з інженерією генами метаболізму *L*-проліну, принциповим є визначення ефективності функціонування гена проліндегідрогенази в умовах стресу. Для аналізу відповідної реакції трансгенних рослин (Т3) на стрес, створений водним дефіцитом, а також для поглиблення уявлення про значення генів *ProDH* в загальній системі генетичної регуляції процесів адаптації/стійкості кукурудзи й соняшника застосовували летальні дози стресорів. Такий підхід дає змогу встановити залежність, пов'язану з рівнем

експресії гена проліндегідрогенази та стресостійкістю рослин, дати відповідь на питання про доцільність часткової супресії ендогенних генів проліндегідрогенази для підвищення осмотолерантності рослин. Крім того, в разі застосування таких досліджень можна відразу відбирати варіанти, стійкі до водного дефіциту [6, 11]. Виявлено, що в трансгенних рослинах кукурудзи й соняшника, які витримували стресове навантаження і продовжували розвиватися, збільшувався вміст вільного *L*-проліну. Слід наголосити, що баланс синтезу й катаболізму вільного *L*-проліну є одним із головних елементів процесів, що забезпечують стійкість рослин до осмотичних стресів. Відомо, що в стресових умовах рівень експресії гена проліндегідрогенази значно знижується і підвищується тільки в період відновлення після закінчення дії стресового чинника. Однак ефективність виживання залежить не тільки від стабілізації процесів життєдіяльності, а й від швидкості активування захисних механізмів. Імовірно, що за наявності часткової супресії генів окремої ланки метаболізму характер функціонування організму також має змінюватись. У зв'язку з цим актуальним є дослідження вмісту вільного *L*-проліну як на початковому етапі стресового впливу, що створює передумови виявлення «швидких» реакцій з боку рослин, так й в ході їх подальшого росту та розвитку.

Згідно з результатами наших досліджень, вже на початкових етапах летальні дози осмотичних стресорів по-різному впливали на рівень вільного *L*-проліну в тканинах рослин кукурудзи й соняшника. В трансгенних рослинах швидкими темпами відбувалось його накопичення, можливо, унаслідок часткової супресії гена проліндегідрогенази. Вільний *L*-пролін діє як неспецифічний стресовий протектор, що створює переваги для подальшої життєдіяльності рослини за критичних умов [18, 19].

Важливо зазначити, що в проаналізованих нами рослинах, у геном яких було інтегровано длРНК-супресор гена проліндегідрогенази, накопичення *L*-проліну активно відбувалось у відповідь на зневоднення. Так, у результаті дослідження вмісту вільного *L*-проліну в пагонах 14-добових проростків, які пророщували й культивували в умовах стресу з додаванням у середовище 0,5 М маніту, встановлено підвищення в 2—4 рази рівня *L*-проліну в трансгенних рослинах порівняно з контрольними. Це свідчить на користь участі *L*-проліну у відповідній реакції рослин на стрес, створений дефіцитом води.

Залежність життєздатності трансформантів від рівня *L*-проліну спостерігалась і при адаптації рослин до умов наджорсткого стресу, модельованого з використанням 0,8 М маніту. В трансгенних рослинах рівень проліну був у 16—20 разів вищий, ніж у контрольних, які вирощували за нормальних чи стресових умов. У насінні трансгенних рослин кукурудзи й соняшника, яке пророщували в умовах сульфатно-хлоридного засолення (полив 2—2,5 %-м розчином солей морської води) рівень *L*-проліну також був істотно вищим. Його вміст в індивідуальних трансгенних рослинах варіював, але в переважній більшості значно перевищував контрольні значення [5, 10, 11, 21]. Отже, згідно з отриманими нами результатами, рівень *L*-проліну в поколінні трансформантів на стресовому фоні був істотно вищим за контрольний. Це означає, що він є одним із чинників, які беруть участь у підтриманні життєздатності рослин за стресових умов. Рівень вільного *L*-проліну в трансгенних рослинах зростав не тільки за дії осмотичних стресорів, а і за нормальних умов

вегетативного досліджу і майже втричі перевищував цей показник у контрольних (нетрансгенних) рослинах вихідної інбредної лінії [11].

Об'єктивним показником ефективності запропонованої технології є дослідження рівня експресії генів метаболізму *L*-проліну. Аналіз експресії гена *ProDH* у трансгенних рослинах кукурудзи й сояшника на рівні як активності ферменту проліндегідрогенази, так і вмісту вільного *L*-проліну, підтвердив ефективність його часткової супресії для підвищення рівня толерантності згаданих культур до стресів, спричинених водним дефіцитом. Встановлено, що часткова супресія гена *ProDH* призводить до зниження активності цього ферменту. Так, у трансгенних рослинах кукурудзи покоління ТЗ активність проліндегідрогенази була значно нижчою (у середньому в 3—4 рази), ніж у контрольних рослин, тоді як її активність у трансгенних рослинах ТЗ покоління сояшника в середньому була нижчою в 6 разів порівняно з контрольними рослинами за тих самих умов культивування. Це підтверджує перспективність часткової супресії генів катаболізму *L*-проліну в інбредних лініях кукурудзи й сояшника шляхом інтерференції РНК для створення ліній, стійких до осмотичних стресів.

Запропоновано також оригінальні способи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації інбредних ліній кукурудзи, пшениці й сояшника *in vitro*. Аналізом ефективності використання низки поживних середовищ для індукції пагоноутворення з різних типів експлантатів встановлено, що реалізація морфогенетичного потенціалу можлива непрямым або прямим органогенезом і в кожному конкретному випадку залежить від генотипу. Наші дослідження, пов'язані з оптимізацією поживних середовищ та умов культивування, були спрямовані на подолання генотипної залежності регенераційної здатності за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Для підвищення регенераційної здатності й компетентності до агробактеріальної інфекції ми застосовували запропонований нами раніше для сояшника, а потім підтверджений і на кукурудзі спосіб обробки експлантатів ультразвуком і культивування за наявності тіосульфату натрію. Ми встановили, що тіосульфат натрію не тільки сприяє підвищенню частоти регенерації сояшника, а й за сумісної обробки з ультразвуком збільшує частоту його трансформації. Доведено також, що за добавляння тіосульфату натрію підвищувалась частота регенерації кукурудзи шляхом непрямого органогенезу. Співробітники відділу генетичної інженерії вперше довели синергізм дії тіосульфату натрію та ультразвуку на частоту генетичної трансформації й реалізацію морфогенетичного потенціалу рослин [4, 7, 21, 31]. Ми вважаємо, що швидше за все це пов'язано зі стимулюванням тіосульфатом натрію проліферації епідермальних чи субепідермальних клітин гіпокотилу, здатних до диференціації, можливо внаслідок змін електрохімічного потенціалу. Встановлено також, що істотному підвищенню частоти інтродукції та інтеграції Т-ДНК у клітини рослин за генетичної трансформації сприяє проведення селекції на стійкість до канаміцинсульфату після початку індукції регенерації пагонів [21]. Теоретично обґрунтовано участь ендogenous *L*-проліну в процесах індукції органогенезу, росту і диференціації клітин рослин. На прикладі сояшника експериментально доведено участь вільного *L*-проліну в реалізації морфогенетичного потенціалу культурних рослин [17, 30].

Започатковано напрям досліджень фізіолого-біохімічних змін, пов'язаних із вуглеводним обміном трансгенних рослин. Вперше на прикладі кукурудзи доведено, що в компетентних до *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації клітинах, здатних до реалізації морфогенетичного потенціалу, активуються ферменти метаболізму сахарози й біосинтезу білка, а також змінюється ферментно-вуглеводний комплекс у процесі трансгенезу *in vitro* та *in planta*. Разом із цим зміни, пов'язані з експресією генів запасних білків, не відбуваються. Рекомендовано використовувати аналіз ферментів метаболізму сахарози у селекційно-генетичних програмах як маркерів добору трансгенних варіантів із поліпшеними фізіолого-генетичними показниками. Запропоновано гіпотезу щодо зв'язку між активуванням VIR-регуляторної системи процесингу й перенесенням рекомбінантних молекул ДНК та диференціації трансформованих клітин за участю сахарози і гексоз [9, 23].

Доведено, що генетичну трансформацію можна успішно здійснювати за використання інших обеззброєних штамів *A. tumefaciens*. Агробактеріальну трансформацію кукурудзи й соняшника проводили також із застосуванням штаму CV 3101 із конструкцією PI SN 5290, що містила ген стійкості до гербіциду фосфінотрицину. Селекцію на наявність гена в трансгенних рослинах виконували із використанням комерційного препарату баста в токсичній для звичайних рослин концентрації. Встановлено, що після генетичної трансформації стійкими до селективної концентрації гербіциду виявились близько 2,5 % рослин. Ефективність інтродукції рекомбінантних ДНК у геном досліджуваних рослин оцінювали за результатами ПЛР-аналізу, відсутність домішок *A. tumefaciens* у клітинах рослин контролювали за геном вірулентності. Результати молекулярного аналізу підтвердили можливість перенесення в клітини та інтродукції в геном досліджуваних культур рекомбінантних молекул ДНК за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vivo*.

Одним із фізіолого-біохімічних показників, що визначає ефективність трансгенезу, є фотосинтез. Слід зазначити, що в низці досліджень трансгенних рослин із використанням генів транскрипційних факторів і структурних генів виявлено зміни параметрів фотосинтезу. В наших дослідженнях осмотолерантні трансгенні рослини соняшнику мали ліпші показники ФС II, які відображають функціональний стан фотосинтетичного апарату й рослини в цілому, а також підвищений вміст хлорофілу та каротиноїдів [5].

Експериментально доведено можливість генетичної трансформації м'якої пшениці з використанням векторних конструкцій, що містять гени метаболізму *L*-проліну. Частота генетичної трансформації з повною інтеграцією дволанцюгового РНК-супресора гена проліндегідрогенази становила 1,53 %, за використання векторної конструкції РВі-ОАТ із геном орнітинамінотрансферази — 5,43 %. Розроблено експрес-метод визначення стійкості рослин пшениці до антибіотика канаміцину [1—3].

Цитогенетичним аналізом рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації клітин калюсних культур, встановлено значно вищий рівень каріотипної мінливості трансгенних форм порівняно з нетрансгенними. Хромосомна мінливість трансгенних рослин виявлялась анеуплоїдією та структурними змінами хромосом. За числом хромосом відрізнялись рослини, регенеровані з однієї й тієї самої калюсної лінії. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу трансформованих рослин пшениці за використання IRAP-ПЛР і прай-

мера до LTR послідовностей ретротранспозону SIRE 1 трьох рослин виявлено нові відносно високомолекулярні амплікони, що засвідчує транспозицію цього МГЕ й може бути зумовлено геномним стресом, спричиненим інтеграцією чужорідної ДНК, або стресом, безпосередньо пов'язаним із процесом генетичної трансформації [1].

Серед низки біотехнологічних методів для отримання генетично змінених варіантів застосовують і клітинну селекцію. У відділі генетичної інженерії теоретично передбачено й експериментально доведено ефективність використання летальних доз іонів важких металів для отримання рослин із комплексною стійкістю до водного дефіциту та засолення. Виходячи з того, що катіони Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} викликають ураження рослин, аналогічні спричинюваним осмотичними стресами, було створено модельні системи *in vitro* з летальними дозами цих катіонів. Відібрані за таких умов клітинні лінії тютюну, сої, соняшника і пшениці характеризувались комплексною стійкістю до водного дефіциту й різних типів засолення (частота їх утворення становила 10^{-6} , що вказує на появу генетично змінених форм). Відомо також, що стресова інактивація нітратредуктази оксіаніонами WO_4^{2-} і VO_3^- призводить до загибелі рослин. Із використанням летальних доз цих аніонів отримано стійкі рослинні форми тютюну і сої, які за стресових умов вирощування зберігають здатність до засвоєння нітратів [16, 25].

Ще один напрям діяльності відділу пов'язаний із розробкою комплексу біотехнологічних прийомів для отримання рослин м'якої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів. Вперше розроблено ефективну біотехнологію пришвидшеного отримання нових форм пшениці з підвищеною стійкістю до офіобольозної кореневої гнилі й водного дефіциту, яка вдосконалює біотехнологічні прийоми розширення генетичного потенціалу пшениці й придатна для використання в селекції на комплексну стійкість до стресових чинників довкілля.

На клітинному рівні встановлено, що резистентність до одного стресового чинника може зумовлювати підвищення стійкості до іншого. У стійких до водного дефіциту рослин-регенерантів пшениці на хромосомах 3А й 3В виявлено специфічні алелі гена *Dreb1*, що дає змогу диференціювати стійкі та нестійкі форми [32]. Методом IRAP-аналізу в отриманих клітинних ліній і рослин-регенерантів досліджено поліморфізм ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону *Cassandra*, виявлено їх відмінності від вихідних форм за генетичною структурою.

Результати науково-дослідної роботи працівників відділу за останні роки опубліковано у 4 монографіях, понад 200 статтях у вітчизняних і закордонних виданнях, представлено на міжнародних і вітчизняних конференціях. Науковий пріоритет підтвердили 14 патентів, 6 авторських свідоцтв. Співробітники відділу захистили 2 докторські і 5 кандидатських дисертацій. За цикл робіт «Реалізація продуктивного потенціалу культурних рослин за дії стресових факторів» А.В. Бавол та співавтори у 2010 р. були нагороджені премією Президента України для молодих вчених. У 2010—2013 рр. А.В. Бавол отримував стипендію Президії НАН України для молодих вчених, а в 2013—2014 рр. — стипендію Президента України для молодих вчених.

Співробітники відділу підтримують міжнародні зв'язки з науковими установами Білорусі, Молдови та інших країн.

1. *Бавол А.В.* Розробка біотехнології отримання рослин пшениці, стійких до стресових чинників // Вісн. НАН України. — 2015. — № 6. — С. 61—67.
2. *Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В.* Підвищення частоти регенерації калюсних культур пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2014. — 12, № 2. — С. 159—165.
3. *Воронова С.С., Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровная О.В.* Генетическая трансформация мягкой пшеницы с использованием векторных конструкций, содержащих гены метаболизма пролина // Там само. — 2015. — 13, № 1. — С. 28—33.
4. *Комисаренко А.Г., Малина А.Е., Михальская С.И. и др.* Влияние ультразвука на индукцию регенерации инбредных линий подсолнечника // Фактори експерим. еволюції організмів. — 2008. — 5. — С. 278—282.
5. *Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Курчий В.М. и др.* Физиолого-биохимическая характеристика трансгенных растений подсолнечника и кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Физиология растений и генетика. — 2015. — 47, № 2. — С. 160—166.
6. *Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Курчий В.М., Сергеева Л.Є.* Аналіз трансгенних рослин кукурудзи та соняшника з підвищенням рівнем стійкості до водного стресу // Фактори експерим. еволюції організмів. — 2015. — 17. — С. 189—192.
7. *Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Малина А.Э., Тищенко Е.Н.* Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации in vitro инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — 7, № 1. — С. 31—37.
8. *Кузнецов В.В., Шевякова Н.И.* Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. — 1999. — 46, № 2. — С. 321—336.
9. *Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н.* Активность сахарозосинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8. — С. 18—24.
10. *Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е. и др.* Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных in planta с использованием *LV4404*, несущего рВі2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Изв. Самар. науч. центра РАН. — 2013. — 15, № 3 (5). — С. 1662—1665.
11. *Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю. и др.* Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных трансгенных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Физиология растений и генетика. — 2014. — 46, № 6. — С. 482—489.
12. *Моргун Б.В., Тищенко Е.Н.* Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. — Киев: Логос, 2014. — 219 с.
13. *Моргун В.В., Кордюм В.А., Ларченко Е.А., Ткаченко Л.В.* Передача наследственных признаков с помощью экзогенной ДНК у кукурузы // Молекул. биология. — 1980. — № 26. — С. 9—12.
14. *Моргун В.В., Тищенко Е.Н., Михальская С.И. и др.* Разработка технологии коротких интерферирующих siРНК для повышения осмотолерантности трансгенных растений кукурузы и пшеницы // Материалы II Междунар. науч. конф. «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». — Минск, 2015. — С. 105.
15. *Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В.* Участие пролина в системе антиоксидантной защиты шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. — 2008. — 55. — С. 721—730.
16. *Сергеева Л.Е.* Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. — Киев: Логос, 2013. — 211 с.
17. *Сергеева Л.Е., Комисаренко А.Г., Бронникова Л.И. и др.* Содержание свободного пролина в тканях подсолнечника при реализации морфогенетического потенциала in vitro // Биотехнология. — 2013. — 6, № 1. — С. 113—118.
18. *Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Курчий В.М., Тищенко Е.Н.* Изменения в содержании свободного пролина в побегах и корнях проростков кукурузы на начальной стадии действия летальных осмотических стрессов // Фактори експерим. еволюції організмів. — 2014. — 15. — С. 133—136.
19. *Сергеева Л.Є., Михальська С.І., Курчий В.М., Тищенко О.М.* Вміст вільного проліну в проростках кукурудзи як показник швидких реакцій на дію летальних осмотичних стресів in vitro // Физиология растений и генетика. — 2015. — 47, № 6. — С. 491—496.
20. *Тищенко Е.Н.* Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма *L*-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология растений и генетика. — 2013. — 45, № 6. — С. 488—500.

21. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И. и др. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма *LBA4404*, несущего плазмиду pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Цитология и генетика. — 2014. — **48**, № 4. — С. 19—30.
22. Тищенко Е.Н., Моргун Б.В. Генетическая инженерия по повышению осмотолерантности культурных злаковых растений с использованием генов транскрипционных факторов DREB/ABF // Физиология растений и генетика. — 2015. — **47**, № 5. — С. 371—392.
23. Тищенко Е.Н., Сакало В.Д., Матвеева А.Ю. и др. Метаболизм сахарозы на ранних этапах онтогенеза кукурузы (*Zea mays* L.), трансформированной *in planta* обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* // Биотехнология. — 2011. — **4**, № 3. — С. 64—73.
24. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А. и др. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // Генетика. — 2006. — **42**, № 8. — С. 1083—1088.
25. Патент на корисну модель № 33961. Спосіб відбору клітинних ліній рослин із змінним типом нітратредуктази та характером засвоєння нітратів / Л.Є. Сергєєва, С.І. Михальська, О.М. Тищенко. — Опубл. 25.07.08.
26. Патент на корисну модель № 97229. Спосіб відбору трансгенних рослин із підвищеним рівнем стійкості до водного стресу / Л.Є. Сергєєва, А.Г. Комісаренко, С.І. Михальська, О.М. Тищенко. — Опубл. 10.03.15.
27. Патент на корисну модель № 86108. Спосіб застосування *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* для отримання трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.) / А.Г. Комісаренко, С.І. Михальська, О.М. Тищенко. — Опубл. 10.12.13.
28. Патент на корисну модель № 77323. Спосіб отримання рослин регенерантів із сегментів вузлової зони пагонів методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи / С.І. Михальська, О.М. Тищенко, Н.І. Адаменко та ін. — Опубл. 11.02.13.
29. Патент на корисну модель № 77331. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* / О.Ю. Матвеева, О.М. Тищенко, Б.В. Моргун. — Опубл. 11.02.13.
30. Патент на корисну модель № 64611. Спосіб оцінки морфогенетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендогенного проліну / Л.Є. Сергєєва, С.І. Михальська, А.Г. Комісаренко та ін. — Опубл. 10.11.11.
31. Патент на корисну модель № 40142. Спосіб підвищення морфогенетичного потенціалу *in vitro* генотипів соняшника з низькою регенераційною здатністю. — Опубл. 25.03.09.
32. Патент на корисну модель № 81752. Спосіб підвищення регенераційної здатності калюсних культур м'якої пшениці, стійких до метаболітів *Gaeumannomyces Graminis* Var. *Triticis* та водного дефіциту / О.В. Дубровна, А.В. Бавол, М.О. Зінченко. — Опубл. 10.07.13.
33. Borsani O., Zhu J., Verslues E.P. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis* // Cell. — 2005. — **123**. — P. 1279—1291.
34. Cheng M., Lowe B.A., Spenser T.M. et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species // In vitro Cell Dev. Biol. Plant. — 2004. — **40**, N 1. — P. 31—35.
35. Hamilton A., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // Science. — 1999. — **286**. — P. 950—952.
36. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate proline accumulation // Planta. — 2005. — **222**, N 1. — P. 70—79.
37. Pospisilova J., Haisel D., Vankova R. Responses of transgenic tobacco plants with increased proline content to drought and/or heat stress // AJPS. — 2011. — **2**, N 3. — P. 318—324.
38. Servet C., Ghelis T., Richard L. et al. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis // Front Biosci. — 2012. — **1**, N 17. — P. 607—620.
39. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2009. — **15**, N 2. — P. 89—97.
40. Wolffe A.P., Matzke M.A. Epigenetics: regulation through repression // Science. — 1999. — **286**. — P. 481—486.

Отримано 03.03.2016

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ОСМОТОЛЕРАНТНОСТИ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

Е.Н. Тищенко¹, С.И. Михальская¹, Б.В. Моргун^{1,2}

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Рассмотрено современное состояние изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов культурных растений при стрессах, вызванных водным дефицитом. Представлены результаты исследований отдела генетической инженерии Института физиологии растений и генетики НАН Украины по получению осмотолерантных форм с использованием двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы и результаты генетического улучшения растений методом клеточной селекции.

GENETIC ENGINEERING AND CELL SELECTION FOR ENHANCING OF CROPS
OSMOTOLERANCE

O.M. Tishchenko¹, S.I. Mykhalska¹, B.V. Morgun^{1,2}

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine

Epigenetic aspects of plant gene expression regulation under osmotic stress are discussed. The results of investigations in Department of Genetic Engineering of Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine for obtaining plant forms via using dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene, and of cell selection for obtaining genetically modified plant forms are presented.

Key words: sunflower, tobacco, corn, wheat, transgenic plant, cell selection, osmotolerance.