

ОГЛЯДИ

УДК [573.6.086.83:577.21]:58

Г. А. ЧЕБОТАРЬ, к. б. н., доц.
СГИ–НЦСС, Одесса,
ОНУ имени И. И. Мечникова, Одесса
e-mail: gchebotar@rambler.ru

ТРАНСГЕНОЗ В СОЗДАНИИ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

Предлагается обзор современных исследований в области создания генетически модифицированных растений, толерантных к водному дефициту, способных «избегать» засуху. Достижения в генетическом улучшении указанных свойств связаны с манипуляциями экспрессией генов: вакуолярной фосфотазы, аквапоринов, изопентенил трансферазы, фосфатидил-инозитол специфичной фосфолипазы, генов позднего эмбриогенеза (LEA), генов, ответственных за сверхэкспрессию осмолитов, молекулярных шаперонов, глутамат дегидрогеназы, митоген-активированной протеинкиназы, синтеза этилена, холин дегидрогеназы для глицин-бетаинового синтеза, а также с повышением уровня транскрипционных факторов у трансгенных растений. Известно о влиянии посттрансляционной модификации белков на засухоустойчивость. Однако из-за существования множества взаимодействующих генов усилия по повышению засухоустойчивости культур путем манипуляции одним или несколькими генами часто связаны с другими, нежелательными, плейотропными и фенотипическими изменениями. Тестирование трансгенных растений в полевых условиях происходит не так часто и только в некоторых случаях показано достоверное увеличение урожая, что свидетельствует о значительных различиях между лабораторными и полевыми испытаниями.

Рассмотрены гены, которые в настоящее время используются для повышения засухоустойчивости основных сельскохозяйственных культур методами генетической инженерии. Несмотря на активные работы в данном направлении, сложность взаимодействия генов в так называемой генной сети засухоустойчивости свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований в данном направлении.

Ключевые слова: засухоустойчивость, трансгенные растения.

Вступление. В связи с изменениями климата недостаток влаги влияет на все большие площади посевов сельскохозяйственных культур, что негативно сказывается на их качестве и урожайности. Для стабильного и

гарантированного выращивания сельскохозяйственной продукции требуется создание стрессоустойчивых сортов культурных растений, которые могут нормально расти при водном дефиците.

При изучении засухоустойчивости растений выделено три основных типа реакций [1]:

- избегание действия стресса за счет скороспелости и вынужденного покоя в течение определенной части вегетации;

- предупреждение действия стресса путем избегания водного дефицита в листьях (уменьшение расхода воды и листовой поверхности, активизация корневой системы);

- противостояние стрессу, обусловленное комплексом реакций, направленных на стабилизацию мембран, поддержание тургора и ионного баланса.

Усовершенствование методов, направленных на повышение продуктивности сельскохозяйственных культур, за последние 30 лет привело к активному развитию и использованию генетической инженерии. Сегодня наиболее эффективным методом повышения засухоустойчивости является создание трансгенных растений. Согласно данным Б. В. Моргуна и Е. Н. Тищенко [2], для создания трансгенных растений ключевым является: идентификация структурных и регуляторных генов, которые могут контролировать устойчивость растений к стрессам на разных этапах развития, и разработка эффективных методов переноса молекул рекомбинантных ДНК в клетки. На сегодняшний день основными являются агробактериально-опосредованная и биолистическая трансформация.

Основываясь на типах реакции [1], повышение засухоустойчивости растений можно условно разделить на 2 типа: создание трансгенных растений для «избегания засухи» и создание толерантных к водному дефициту растений.

Целью данной работы является обзор современных исследований в области создания генетически модифицированных растений, устойчивых к засухе.

Трансгенные растения, созданные для «избегания» засухи

Растения могут «избегать» засуху благодаря закрытию устьиц, образованию кутикулярного воска (который уменьшает потери воды), обширному укоренению, изменению глубины, места расположения и проводимости корня, а также путем уменьшения «купола» растения за счет снижения роста и опадания листьев [3]. Часто ускоренное старение листьев и их опадание в природе связаны с засухой и являются средством уменьшения общей поверхности растения. Это позволяет растениям переживать стресс, вызванный засухой, и завершать жизненный цикл, но ведет к существенным потерям урожая.

Для создания растений табака, способных избегать засуху, Rivero et al. [3] использовали ген, кодирующий рецептор протеин киназы, ассоциированный со старением листа *SARK* (senescence-associated receptor protein

kinase), експресія якого індукуюється во время позднего созревания и засухи, а активність зменшується при старінні (кодує созрівання/старіння-залежну протеїн киназу). Трансгенні рослини експресували ізопентеніл трансферазу, головний фермент біосинтезу цитокинінів (інгібіторів листового старіння), під контролем промотора асоційованого зі старінням рецептора протеїн кинази. Близько цьому після 15-денної засухи в умовах теплиці старіння трансгенних рослин не наступало, але зберігалася знижена здатність до фотосинтезу. При подальшому поливі трансгенні рослини повністю відновлювали тургор листа і максимальну здатність до фотосинтезу, в той час як контрольні рослини не могли відновитися після стресу, викликаного засухою. Також у трансгенних рослин спостерігалася більш висока здатність використовувати воду, ніж у рослин дикої форми, і вона була в 2–3 рази більше після відновлення поливу, ніж до дії засухи [3]. Однак основна увага сучасних дослідників звернена на створення толерантних до засухи рослин.

Створення толерантних до засухи рослин. Механізми толерантності рослин до засухи включають такі клітинні реакції, як виробництво стресових білків, регуляція рівня антиоксидантів, накоплення осмолітів, стабілізація субклітинних структур, таких як мембрани і білки, підтримання осмотичного і іонного гомеостазу [4]. Розробки генно-інженерних методів привели до введення в сільськогосподарські рослини генів, кодує білки, залучені до цих механізмів.

За думкою [5], найбільш обіцяючими в створенні засухоустойчивих рослин є два підходи. Один полягає в збільшенні активності протонної помпи порі вакуолярної мембрани, що веде до збільшенню засухо- і солеустойчивості у трансгенних рослин. Другий підхід полягає в збільшенні виробки цитокиніну тільки в умовах засухи [5], що також значно збільшує засухоустойчивість генетично модифікованих рослин.

Повишена **експресія гена вакуолярної фосфатази (AVP1)** арабідопсиса достовірно збільшувала засухо- і солетолерантність у трансгенного арабідопсиса [6] і томата [7] так же, як і гетерологічна експресія вакуолярної H^+ -пірофосфатази *Thellungiella halophila* у тютюну [8] і надекспресія пшеничного Na^+H^+ -антипортера і H^+ -пірофосфатази у арабідопсиса [9; 10]. Збільшення засухоустойчивості можна пояснити збільшенням полярного транспорту ауксину, завдяки чому у рослини утворюється значно більша коренева система [6; 7; 11].

Відомі спроби **позвищення засухоустойчивості рослин шляхом зміни експресії аквапоринів [12–19]**. Трансмімбранне рухання води відбувається в основному через водні канали, утворені аквапоринами [20]. Аквапорини (основні внутрішні білки),

которые локализованы либо в тонопласте (TIP)-, либо на плазматической мембране (PIP), облегчают перенос воды, глицерола, небольших молекул и газа через мембраны и, следовательно, играют важную роль в водном гомеостазе [21]. Одним из механизмов изменения активности уже существующих в мембране водных каналов при стрессах является фосфорилирование и дефосфорилирование аквапоринов для активации и дезактивации водных каналов соответственно [20]. Водный дефицит активирует экспрессию гена *RD28* у *Arabidopsis thaliana*, который кодирует аквапорин, локализованный в плазматической мембране [20]. Различные функции аквапоринов зависят от типа стресса и его жесткости. Гены, кодирующие аквапорины у *Vicia faba* *PIP1*, *Panax ginseng* *PgTIP1*, *Brassica napus* *BnPIP1* и *Brassica juncea* *BjPIP1*, увеличивают засухоустойчивость [12; 14; 15; 17; 19]. Сверхэкспрессия гена аквапорина пшеницы *TaAQP7* увеличивала засухоустойчивость трансгенного табака благодаря увеличению водоудерживающей способности, уменьшению накопления радикалов активного кислорода и повреждений мембраны, а также активизации действия антиоксидантов [22]. Однако разные изоформы аквапоринов участвуют в различных физиологических процессах, таким образом растения реагируют на засушливые условия либо за счет увеличения числа изоформ аквапоринов, что облегчает движение воды (особенно в тонопласте для поддержания клеточного тургора), либо понижая экспрессию аквапоринов, чтобы избежать чрезмерной потери воды [12; 15]. Так, растения *Arabidopsis* и табака сверхэкспрессирующие гены *PIP* арабидопсиса характеризуются повышенным притоком воды и улучшенным прорастанием под действием холодового стресса, но быстрая потеря воды в условиях засухи проявляется в отставании в росте проростков и ухудшении прорастания [23].

М. Katsuhara [24] идентифицировал 23 нуклеотидные последовательности аквапоринов ячменя. С точки зрения засухоустойчивости, по мнению авторов, наибольший интерес представляют PIP аквапорины, так как на них оказывается более направленное воздействие условий окружающей среды, чем на другие аквапорины в эндомембранах. PIP аквапорины разделены на две подгруппы: PIP1 и PIP2. В корнях белки PIP1 — аквапорины ячменя (кодируемые генами *HvPIP1s*) обнаружены в близости от ксилемы и коры. Белок *HvPIP2;2* обнаружен в эпидермисе, а именно в клетках развивающихся корневых волосков. Среди 10 *HvPIPs* экспрессия транскриптов некоторых мажорных *HvPIPs* (*HvPIP1;2*, *HvPIP2;1*, *HvPIP2;2* и *HvPIP2;3*) ослаблялась под действием сильного солевого (200 мМ NaCl) или осмотического (360 мм манит) стресса. Приведенные данные могут служить примером механизма толерантности для предотвращения обезвоживания во время сильных соле/осмотических стрессов. Во время легкого стресса при применении 100 мМ NaCl или изотонического 180 мм маннитола не обнаружено снижения уровня синтеза мРНК *HvPIPs*.

Еще один многообещающий ген для создания засухоустойчивых трансгенных растений — **ген изопентенил трансферазы** (ИПТ), который участвует в биосинтезе цитокинов. При правильном подборе промоторов, которые не уменьшают продукцию цитокинина, можно добиться не только засухоустойчивости, но и более высоких урожаев в условиях нехватки влаги [3; 25]. При использовании промотора гена 12, ассоциированного со старением (*senescence associated gene 12*), сверхэкспрессия ИПТ может замедлить старение у трансгенных растений и ведет к стабильно зеленому фенотипу [26], кроме того, такие растения более засухоустойчивы [27; 28].

Возможность использования **гена фосфатидилинозитол 4-киназы** (Phosphatidylinositol (PI) 4-kinases (PI4Ks)) пшеницы для улучшения засухоустойчивости трансгенных растений подтвердили эксперименты с трансгенными растениями арабидопсиса [29]. У кукурузы сверхэкспрессия гена фосфотидил-инозитол специфичной фосфолипазы *ZmPLC1* [30] приводила к более высокому содержанию растворенных веществ в клетке и повышала скорость фотосинтеза, трансгенные растения были более продуктивными (масса зерна с колоса под действием засухи была на 14 % больше). Растения рапса, сверхэкспрессирующие *BnPtdIns-PL2* [31], показали более низкий уровень устьичной транспирации и меньшую устьичную диафрагму, а также выдерживали нарастающий водный дефицит в течение 24 дней, при таких условиях контрольные растения погибали.

Гены позднего эмбриогенеза (**LEA-гены**) широко использовались для придания растениям засухоустойчивости, например, сверхэкспрессия дегидрина пшеницы *Dhn-5* у арабидопсиса приводила к повышению скорости прорастания семян, значительному росту, задержке воды, накоплению ионов Na^+ и K^+ в листьях и повышению содержания пролина по сравнению с растениями дикого типа при стрессе, вызванном повышением засоленности среды, на которой выращивали растения, и / или засухой [9]. Дегидрины (Dhns) — один из классов LEA-белков, имеют детергентные и шапероноподобные свойства, стабилизируют мембраны, белки и компартменты клеток [32].

LEA-ген третьей группы ячменя применялся для повышения засухоустойчивости при трансформации риса [33; 34], пшеницы [35] и шелковицы *Morus indica* [36]. Известно [4], что LEA-гены третьей группы кодируют белки, содержащие характерный повторяющийся мотив из 11 аминокислот, предположительно формирующий амфипатическую α -спираль, обладающую способностью к интра- и интермолекулярным взаимодействиям. Эти белки участвуют в связывании ионов, которые концентрируются в цитоплазме при потере воды [20]. Так, введение в геном пшеницы гена *HVA1*, который кодирует LEA3 *HVA1* белок ячменя, приводило к увеличению биомассы и повышению эффективности использования воды в стрессовых условиях [35], а также к увеличению урожая [37].

Также использовали и *LEA*-гены третьей группы *Brassica napus*, которые улучшили соле- и засухоустойчивость при конститутивной экспрессии в китайской капусте [38]. Ген *TaLEA3* пшеницы использовали для повышения засухоустойчивости многолетней травы *Leymus chinensis* [39].

Два *LEA*-белка четвертой группы *BhLEA1* и *BhLEA2* (*Boea hygrometrica*) повышали засухоустойчивость трансгенного табака благодаря защите клеток путем повышения стабильности мембран и белков при обезвоживании [40]. Белки этой группы имеют специфическую структуру (консервативный N-конец, предположительно формирующий α -спираль и различные C-регионы с круговой структурой катушки [4]) и способны замещать воду в примембранной области при дегидратации, тем самым поддерживая структуру мембран [20]. Было показано, что *LEA*-ген из *Tamarix androssowii* повышал засухоустойчивость при экспрессии в трансгенных растениях табака [41].

Также одной из стратегий создания засухоустойчивых культур является **введение генов, ответственных за сверхэкспрессию осмолитов у растений**. Осмолиты (совместимые растворимые вещества) — группа низкомолекулярных, высокорастворимых соединений, как правило, нетоксичных при высоких концентрациях в клетке, например, аминокислоты (пролин), четвертичные амины (глицин-бетаин (GlyBet), полиамины и диметилсульфониопроприонат) и полиолы/сахара (такие как маннитол, галактинол и трегалоза [42]). Созданы трансгенные растения кукурузы [43] и хлопка [44] с увеличенным уровнем экспрессии глицин-бетаина путем сверхэкспрессии гена *betA*, кодирующего холин-дегидрогеназу, ключевой фермент холин-бетаин альдегидной реакции. Zhang et al. [45] трансформировали хлоропласты растений табака геном холинмонооксигеназы свеклы, что привело к накоплению у исследуемых растений глицин-бетаина в листьях, корнях и зернах и повысило толерантность растений к токсичным уровням холина, а также стрессам, вызванным засолением и засухой.

Для повышения засухоустойчивости кукурузы использовали трансгенные технологии, где в качестве целевых вводили гены молекулярных шаперонов *CspA*, *CspB* [46], ген глутамат дегидрогеназы *GDH* [47], ген митоген-активированной протеин киназы *NPK1* [48], гены синтеза этилена *ZmACS6* [49], холин дегидрогеназы для глицин бетаинового синтеза *betA* [43].

Гены, кодирующие транскрипционные факторы, работа которых индуцируется стрессовыми условиями среды, являются возможными кандидатами для успешного создания трансгенных растений. Известны различные семейства и подсемейства этих генов (цит. по [2]): AP2/ERF (к которому относится DREB-подсемейство), NAC, MYB, MYC, bZIP, NF- κ B, Cys2His2 zinc-finger WRKY.

Трансгенные растения ячменя и пшеницы с повышенным уровнем транскрипционных факторов *TaDREB2* или *TaDREB3*, которые находи-

лись под влиянием конститутивных и индуцируемых засухой промоторов, продемонстрировали повышенную устойчивость к засухе и замораживанию [50]. Растения со сверхэкспрессией *TaDREB2* показали медленный темп роста, задержки прорастания и цветения относительно контрольных растений, однако достигли нормального размера и были темнее, чем контрольные. Растения с повышенным уровнем экспрессии *TaDREB3* показали несколько другой фенотип, для них была характерна задержка в росте, они были приблизительно на 1/3 меньше растений дикого типа в зрелом состоянии. Растения с наиболее сильным фенотипом производили в два раза больше подгонов, чем контрольные, и имели несколько укороченный колос. В то же время сверхэкспрессия *TaDREB2* или *TaDREB3* не приводила к каким-либо изменениям размера зерна, его формы и цвета, а также к снижению урожайности и всхожести. Эффективность использования воды трансгенными растениями, которые характеризовались повышенным уровнем экспрессии *TaDREB3*, была значительно выше по сравнению с контрольными растениями. Однако трансгенные растения, сверхэкспрессирующие *TaDREB2*, не показывали более эффективного использования воды [50], что свидетельствует о различных механизмах засухоустойчивости, на которые воздействуют указанные транскрипционные факторы. Это предположение подтверждается тем фактом, что некоторые засухо- и холодиндуцируемые гены, как, например, *HvDhn8*, положительно регулировались у растений с конститутивным повышением экспрессии *TaDREB3*, но уровень экспрессии этого гена оставался прежним у трансгенных растений с повышенной экспрессией *TaDREB2* [50]. Повышенная экспрессия *TaDREB2* и *TaDREB3* приводила к таковой у трансгенных растений 10 других CBF/DREB генов и большого количества генов (*LEA/COR/DHN*), реагирующих на стресс, которые, как известно, отвечают за защиту клетки от повреждений и высушивания в условиях стресса [51]. Конститутивная сверхэкспрессия *TaDREB3* у ячменя также приводила к повышению морозоустойчивости [52].

Сообщается и об использовании других транскрипционных факторов — генов, кодирующих NAC-белки (семейство транскрипционных факторов, которые вовлечены во многие клеточные процессы, включая ответы на абиотические стрессы), для повышения засухоустойчивости [53]. Трансгенные растения ячменя с гиперэкспрессией гена *HvSNAC1* под контролем конститутивного промотора показали более высокую устойчивость к засухе по сравнению с растениями дикого типа на разных этапах развития. Конститутивная сверхэкспрессия *HvSNAC1* приводила к улучшению водного статуса растения, фотосинтетической активности и уменьшению потерь воды в сравнении с растениями дикого типа. Наблюдалось достоверное увеличение продуктивности трансгенных растений, которое отразилось увеличением биологического урожая по сравнению с растениями дикого типа в суровых полевых условиях за-

сухи. В условиях нормального увлажнения такие растения не отличались от растений дикого типа.

У риса избыточная экспрессия *OsNAC9*, *OsNAC45*, *OsNAC52* и *OsNAC63* повышает толерантность к нескольким абиотическим стрессам благодаря регуляции генов, участвующих в производстве осмолитов, детоксикационной деятельности, окислительно-восстановительном гомеостазе и защите макромолекул [56; 57].

Многолетние полевые испытания в условиях засухи показали, что трансгенные линии риса с корнеспецифичной сверхэкспрессией ТФ *OsNAC6* меньше страдали от засухи, чем нетрансгенные растения [58]. Выявлено, что *OsNAC6* повышал экспрессию генов-мишеней, вовлеченных в детерминацию модификации мембран, биосинтеза никотианамина, перемещения глутатиона, накопления и гликозилирования 3'-фосфоаденозин5'-фосфосульфата, которые задействованы в сложном метаболическом пути толерантности к засухе. Кроме того, сверхэкспрессия генов *никотианамин-синтазы* — целевых для *OsNAC6*, способствовала накоплению металлхелатирующего никотианамина и, как следствие, проявлению засухоустойчивости.

У пшеницы *TaNAC29* активируется различными абиотическими стрессами, играет важную роль при старении и толерантности к высокой солености и засухе. Было показано, что *TaNAC29* участвует в АВК-опосредованном пути и активирует антиоксидантные ферменты для повышения толерантности растений [59].

Ген засухоустойчивости *HDG11*, кодирующий протеин из гомеодомена (HD)-START TF семейства, идентифицированный у арабидопсиса при конститутивной сверхэкспрессии, способствовал проявлению устойчивости к засухе у табака за счет усиления роста корней и уменьшения количества устьиц [54].

Трансгенные растения кукурузы, экспрессирующие бактериальные белки холодового шока [46] и транскрипционный фактор гена *NF-YB2* [55], активно тестировались фирмой «Монсанто» в различных географических зонах в течение нескольких лет, и можно предполагать, что в скором времени эти растения попадут на рынок.

Неудачными оказались результаты экспериментов по трансформации арабидопсиса целевым геном *AtMYB41*, которые ассоциировались с нежелательными плеiotропными эффектами, в том числе карликовостью, повышенной чувствительностью к высушиванию и повышенной проницаемостью поверхности листьев [56]. Хотя известно, что ген *AtMYB41*, кодирующий R2R3-MYB транскрипционный фактор у арабидопсиса, экспрессируется на высоком уровне в ответ на засуху, АВК и солевой стресс, а также играет определенную роль в растяжении клеток и отложении кутикулы.

Известно также о **влиянии посттрансляционных модификаций белков на засухоустойчивость**. К таковым относятся фарнезиляция, фосфорилиция и протеин поли(АТФ-рибозил)ация [57].

Фарнезиляция — посттрансляционная модификация белков, в результате которой к целевому белку добавляется фарнезильная группа. Фарнезилтрансфераза растений состоит из α - и β -субъединиц. Потеря функции β -субъединицы у мутантных растений арабидопсиса приводит к увеличению реакции на АБК [58]. Растения рапса с уменьшенной активностью фарнезилтрансферазы являются первой засухоустойчивой трансгенной масличной культурой [59; 60]. «Подавления» активности фарнезилтрансферазы удалось достичь использованием антисмысловой технологии, примененной к β -субъединице фарнезилтрансферазы [59] и техники РНК-интерференции, примененных к α -субъединице [60], в то же время супрессия обеих субъединиц фарнезилтрансферазы была зависима от наличия воды (использовали промотор RD29A, индуцируемый водным стрессом либо корне-специфичный пероксисомный гидроксипируват редуктазный промотор).

В Украине также ведутся работы по созданию засухоустойчивых культур. В Институте физиологии растений и генетики НАН Украины разрабатываются технологии метаболической инженерии для повышения уровня осмотолерантности кукурузы, пшеницы и подсолнечника с использованием двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы [2]. В качестве примера может служить работа [61], в которой проведена *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta* мягкой пшеницы сорта 'Зимоярка' с использованием штамма AGLO и двух векторных конструкций, содержащих продукты метаболизма пролина. Первая конструкция содержит бинарный вектор pBi-2E с целевым геном — двухцепочечным РНК-супрессором пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена *Arabidopsis*; вторая — pBi-OAT с целевым геном орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*. Генетически модифицированные растения пшеницы характеризовались повышенным содержанием пролина (в 3–5 раз) по сравнению с контрольными, росли на селективной среде с маннитом быстрее и сохраняли ярко-зеленую окраску.

При создании трансгенных коммерческих сортов пшеницы особенно актуальным является отсутствие маркерных последовательностей в геноме растений. Потому активно ведутся разработки векторных систем, которые позволят с помощью агробактериальной трансформации создавать «чистые» ГМ-пшеницы, содержащие только агрономически важные чужеродные гены [68]. В исследовании Wang et al. [69] 15 трансгенных коммерческих китайских сортов гексаплоидной пшеницы, свободных от маркерных последовательностей, были получены с помощью агробактериальной трансформации с эффективностью 37,7 %.

Исследователи DuPont Pioneer создали линию кукурузы, устойчивую к засухе с помощью методики CRISPR [70]. Система CRISPR/Cas9 нашла активное применение в генной инженерии благодаря способности вносить направленный разрыв в ДНК с помощью короткого программируемого 20-нуклеотидного района в направляющей молекуле РНК (single

guide RNA, sgPHK) [71]. Засухоустойчивая кукуруза — одна из нескольких CRISPR-модифицированных культур, которые в скором времени могут попасть на рынок.

Заключение. Существует большой разрыв между успехами в лабораторных экспериментах и применением таких техник к элитным сортам основных сельскохозяйственных культур в полевых условиях. Только в некоторых работах, в которых у трансгенных растений тестировали засухоустойчивость в полевых экспериментах, показано достоверное увеличение урожая [68; 69].

На сегодняшний день достижения в генетическом улучшении засухоустойчивости связаны с манипуляциями одним или несколькими генами, вовлеченными в сигнальные/регуляторные пути, или генами, которые кодируют ферменты, участвующие в этих путях (например, осмолиты/совместимые растворимые вещества, антиоксиданты, молекулярные шапероны/осмопротекторы и водные либо ионные транспортеры [42]). Однако из-за существования множества взаимодействующих генов усилия по повышению засухоустойчивости культур путем манипуляции одним или несколькими генами часто связано с другими, нежелательными, плеiotропными и фенотипическими изменениями.

Таким образом, нами рассмотрены гены, используемые в настоящее время для повышения засухоустойчивости основных сельскохозяйственных культур с применением генной инженерии. Несмотря на активные и широко развернутые работы в этом направлении, сложность взаимодействия генов в так называемой генной сети засухоустойчивости говорит о необходимости проведения дальнейших углубленных исследований в области генетики данного признака и генетической инженерии.

СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК

1. Тищенко В. Н., Чекалин Н. М. Генетические основы адаптивной селекции озимой пшеницы в зоне Лесостепи. Полтава, 2005. 270 с.
2. Моргун Б. В., Тищенко Е. Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. 221 с.
3. Rivero R. M., Kojima M., Gepstein A. et al. Delayed leaf senescence induces *extreme drought tolerance in a flowering plant*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. P. 19631–19636.
4. Jewell M. C., Campbell B. C., Godwin I. D., Kole C. et al. (eds.). Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance. Transgenic Crop Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010. DOI 10.1007/978-3-642-04812-8_2.
5. Kuppu S., Chen G., Payton P., Zhang H. Developing drought tolerant crops In: Droughts: New research. Eds. Neves D. F., Sanz J. D. Nova science publishing, 2012. P. 325–331.
6. Gaxiola R. A., Li. J., Undurraga S., Dang L. M. et al. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *AVP1* H⁺-pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 11444–11449.

7. Park S., Li J., Pittman J. K. et al. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought resistant crop plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. Vol. 102. P. 18830–18835.
8. Gao F., Gao Q., Duan X. et al. Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 3259–3270.
9. Brini F., Hanin M., Lumbieras V. et al. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 2007. Vol. 26. P. 2017–2026.
10. Li B., Wei A., Song C. et al. Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize. Plant Biotechnol. J. 2008. Vol. 6. P. 146–159.
11. Pasapula V., Shen G., Kuppu S. et al. Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fiber yield in the field conditions. Plant Biotechnology Journal. 2011. Vol. 9. P. 88–99.
12. Aharon R., Shahak Y., Wininger S. et al. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. Plant Cell. 2003. Vol. 15. P. 439–447.
13. Porcel R., Gomez M., Kaldenhoff R., Ruiz-Lozano J. M. Impairment of *NtAQP1* gene expression in tobacco plants does not affect root colonisation pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. Mycorrhiza. 2005. Vol. 15. P. 417–423.
14. Yu Q., Y. Hu, J. Li et al. Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin *BnPIP1* from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. Plant Sci. 2005. Vol. 169. P. 647–656.
15. Peng L. X., Gu L. K., Zheng C. C. et al. Expression of *MaMAPK* gene in seedlings of *Malus L.* under water stress. Acta. Biochim. Biophys. Sin. 2006. Vol. 38. P. 281–286.
16. Jang J. Y., Lee S. H., Rhee J. Y. et al. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. Mol Biotechnol. 2007. Vol. 40. P. 280–292.
17. Cui X.-H., Hao F.-S., Chen H. et al. Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. J. Plant Res. 2008. Vol. 121. P. 207–214.
18. Miyazawa S.-I., Yoshimura S., Shinzaki Y. et al. Deactivation of aquaporins decreases internal conductance to CO₂ diffusion in tobacco leaves grown under long-term drought. Funct. Plant Biol. 2008. Vol. 35. P. 556–564.
19. Zhang Y., Wang Z., Chai T. et al. Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. Mol Biotechnol. 2008. Vol. 40. P. 1–13.
20. Алехина Н. Д., Балнокин Ю. В., Гавриленко В. Ф. и др. Физиология растений. Под ред. И. П. Ермакова. Москва: Академия, 2005. 640 с.
21. Bartels D., Phillips J., Chandler J. Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. In: Jenks M. A., Wood A. J. (eds) Plant Desiccation Tolerance. Blackwell, Ames, IA, 2007. P. 115–137.
22. Zhou S., Hu W., Deng X. et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *Ta-AQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. PLoS ONE. 2012. Vol. 7 (12). e52439. doi:10.1371/journal.pone.0052439.

23. Jang J. Y., Lee S. H., Rhee J. Y. et al. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses Mol. Biotechnol. 2007. Vol. 40. P. 280–292.
24. Katsuhara M. Water transport in plants: from molecules to whole plant. <http://journals.jkuat.ac.ke/index.php/jscp/article/viewFile/759/699> 2012. P. 781–785.
25. Peleg Z., Reguer M., Walia H., Blumwald E. Cytokinin mediated source-sink modifications improve drought tolerance and increases grain yield in rice under water stress. Plant Biotech. J. 2011. Vol. 9 (7). P. 747–758.
26. Gan S. S., Amasino R. M. *Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin*. Science. 1995. Vol. 270. P. 1986–1988.
27. Sýkorová B., Kurešová G., Daskalova S. et al. Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens IPT* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. J. Exp. Bot. 2004. Vol. 59. P. 377–387.
28. Zhang P., Wang W. Q., Zhang G. L. et al. Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. J. Integr. Plant Biol. 2010. Vol. 52. P. 653–669.
29. Liu P., Xu Z.-S., Lu P.-P. et al. A wheat *PI4K* gene whose product possesses threonine autophosphorylation activity confers tolerance to drought and salt in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany. 2013. Vol. 64, № 10. P. 2915–2927. doi:10.1093/jxb/ert133.
30. Wang C. R., Yang A. F., Yue G. D. et al. Enhanced expression of phospholipase C 1 (*ZmPLC1*) improves drought tolerance in transgenic maize Planta. 2008 a. Vol. 227. P. 1127–1140.
31. Georges F., Das S., Ray H. et al. Over-expression of *Brassica napus* phosphatidylinositol-phospholipase C2 in canola induces significant changes in gene expression and phytohormone distribution patterns, enhances drought tolerance and promotes early flowering and maturation. Plant Cell Environ. 2009. Vol. 32. P. 1664–1681.
32. Close T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiol. Plant. 1996. Vol. 97. P. 795–803.
33. Xu D., Duan X., Wang B. et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 249–257.
34. Rohila J. S., Jain R. K., Wu R. Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley *Hva1* cDNA. Plant Sci. 2002. Vol. 163. P. 525–532.
35. Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J. M. et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. Plant Sci. 2000. Vol. 155. P. 1–9.
36. Lal S., Gulyani V., Khurana P. Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). Transgen. Res. 2008. Vol. 17. P. 651–663.
37. Bahieldin A., Mahfouz H. T., Eissa H. F. et al. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the *HVA1* gene for drought tolerance. Physiologia Plantarum. 2005. Vol. 123. P. 421–427.

38. Park B.-J., Liu Z., Kanno A., Kameya T. Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* *LEA* gene. *Plant Sci.* 2005. Vol. 169. P. 553–558.
39. Wang L., Li X., Chen S., Liu G. Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat *TaLEA 3*. *Biotechnol. Lett.* 2008. Vol. 31. P. 1–7.
40. Liu J. H., Kitashiba H., Wang J. et al. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* 2007. Vol. 24. P. 117–126.
41. Wang Y., Jiang J., Zhao X. et al. Novel *LEA* gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science.* 2006. Vol. 171. P. 655–662.
42. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 2003. Vol. 218. P. 1–14.
43. Quan R., Shang M., Zhang H. et al. Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnol. J.* 2004. Vol. 2. P. 477–486.
44. Yan S., Lv A., Zhang K. et al. Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Mol. Breed.* 2007. Vol. 20. P. 233–248.
45. Zhang J., Tan W., Yang X. H., Zhang H. X. Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Rep.* 2008. Vol. 27. P. 1113–1124.
46. Castiglioni P., Warner D., Bensen R. J. et al. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol.* 2008. Vol. 147. P. 446–455.
47. Wu W. , Su Q., Xia X. Y. et al. The *Suaeda liaotungensis* kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica.* 2007. Vol. 159. P. 17–25.
48. Shou H., Bordallo P., Wang K. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 1013–1019.
49. Young T. E., Meeley R. B., Gallie D. R. ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant J.* 2004. Vol. 40. P. 813–825.
50. Morran S., Eliby S., Bazanova N. et al. Generation of drought-resistant transgenic cereals using transcription factors isolated from wheat grain. The 11th International Wheat Genetics Symposium. 2008. <http://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/3210> P189.pdf.
51. Morran S., Eini O., Pyvovarenko T. et al. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal.* 2011. Vol. 9, Is. 2. P. 230–249.
52. Kovalchuk N., Jia W., Eini O. et al. Optimization of *TaDREB3* gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. *Plant Biotechnology Journal.* 2013. Vol. 11, Is. 6. P. 659–670.
53. Abdallat A. M. Al., Ayad J. Y., Abu Elenein J. M. et al. Overexpression of the transcription factor *HvSNAC1* improves drought tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding.* 2014. Vol. 33, Is. 2. P. 401–414.

54. Fujita M., Fujita Y., Maruyama K. et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 2004. Vol. 39. P. 863–876.
55. Tran L. S., Nakashima K., Sakuma Y. et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis–element in the early responsive to *dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. P. 2481–2498.
56. Hu H., Dai M., Yao J. et al. Overexpressing a NAM, ATAF and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 12987–12992.
57. Redillas M. C., Jeong J. S., Kim Y. S. et al. The overexpression of *OsNAC9* alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 2012. Vol. 10. P. 792–805.
58. Lee D.-K., Chung P. J., Jeong J. S. et al. The rice *OsNAC6* transcription factor orchestrates multiple molecular mechanisms involving root structural adaptations and nicotianamine biosynthesis for drought tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 2017. doi: 10.1111/pbi.12673.
59. Huang Q, Wang Y., Li B. et al. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology.* 2015. Vol. 15. Article 268. <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-015-0644-9>
60. Yu H., Chen X., Hong Y.Y. et al. Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *Plant Cell.* 2008. Vol. 20. P. 1134–1151.
61. Nelson D. E., Repetti P. P., Adams T. R. et al. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104. P. 16450–16455.
62. Cominelli E., Sala T., Calvi D. et al. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J.* 2008. Vol. 53. P. 53–64.
63. Yang S., Vanderbeld B., Wan J., Huang Y. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Molecular Plant.* 2010. Vol. 3, № 3. P. 469–490.
64. Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D. et al. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science.* 1996. Vol. 273. P. 1239–1241.
65. Wang Y., Ying J., Kuzma M. et al. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J.* 2005. Vol. 43. P. 413–424.
66. Wang Y., Beaith M., Chalifoux M. et al. Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (α -Subunit) for yield protection against drought in canola. *Mol Plant.* 2009. Vol. 2 (1). P. 191–200. doi: 10.1093/mp/ssn088.
67. Бавол А. В., Дубровная О. В., Воронова С. С., Гончарук А. Н. Повышение устойчивости пшеницы к водному дефициту методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці: матер. міжн. конф., присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насіннєзнавства та сортівивчення (м. Одеса, 1–3 червня, 2016 р.). НААН,

- СГІ, М-во аграр. політики та прод. України, Укр. Ін.-т експертизи сортів рослин. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2016. С. 77–78.
68. Wang G.-P., Yu X.-D., Sun Y.-W. et al. Generation of marker- and/or backbone-free transgenic wheat plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Front Plant Sci.* 2016. Vol. 7. 1324. doi: 10.3389/fpls.2016.01324.
69. Wang K. , Liu H., Du L., Ye X. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnol. J.* 2016. doi: 10.1111/pbi.12660.
70. Shi J., Gao H., Wang H. et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR/Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 2017. Vol. 15 (2). P. 207–216.
71. Смирнов А. В., Юнусова А. М., Лукьянчикова В. А., Баттулин Н. Р. Система CRISPR/Cas9 — универсальный инструмент геномной инженерии. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016. Т. 20 (4). С. 493–510.

Поступила 18.11.2017

UDC [573.6.086.83:577.21]:58

Chebotar G. O. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigations, Odessa I. I. Mechnikov National University

e-mail: gchebotar@rambler.ru

TRANSGENESIS IN CREATING OF DROUGHT-RESISTANT CROPS (REVIEW)

This paper provides an overview of current research in the field of genetically modified plants that can «avoid» drought and are tolerant to water deficit. Advances in genetic improvement of drought tolerance associated with the manipulation of gene expression: ***vacuolar phosphatase***, aquaporin, isopentenyl transferase phosphatidylinositol-specific phospholipase, ***late embryogenesis abundant gene*** (LEA), the genes responsible for ***overexpression of osmolytes***, molecular chaperones, glutamate dehydrogenase, mitogen-activated protein kinase, ethylene synthesis, ***choline dehydrogenase*** for glycine betaine synthesis, as well as increased levels of transcription factors in transgenic plants. It is known about the impact of post-translational modification of proteins on drought resistance. However, due to the existence of many interacting genes efforts to improve drought resistance of crops by manipulating one or more genes are often associated with other undesirable pleiotropic and phenotypic changes. Testing of transgenic plants in the field is not as common and only in some cases have been shown a significant increase in yield, that indicates significant differences between laboratory and field tests.

In this article were examined genes that are currently used to improve the drought resistance of major crops with the help of genetic engineering me-

thods. Despite active work in this direction complexity of genes interactions in the so-called drought resistant gene network proves the necessity for further research in this direction.

УДК [573.6.086.83:577.21]:58

Чеботар Г. О. СГІ–НЦНС, ОНУ імені І. І. Мечникова, Одеса
e-mail: gchebotar@rambler.ru

ТРАНСГЕНОЗ У СТВОРЕННІ ПОСУХОСТІЙКИХ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИН (ОГЛЯД)

Оглянуто ряд сучасних досліджень зі створення генетично модифікованих рослин, толерантних до водного дефіциту, здатних «уникати» посухи. Досягнення в генетичному поліпшенні зазначених властивостей пов'язані з маніпуляціями експресією генів: вакуолярної фосфатази, аквапоринів, ізопентеніл трансферази, фосфатидил-інозитол специфічної фосфоліпази, пізнього ембріогенезу (LEA), генів, відповідальних за над-експресію осмолітів, молекулярних шаперонів, глутамат дегідрогенази, мітоген-активованої протеїнкінази, синтезу етилену, холін дегідрогенази для гліцин-бетаїнового синтезу, а також з підвищенням рівня транскрипційних факторів у трансгенних рослин. Відомо про вплив посттрансляційної модифікації білків на посухостійкість. Однак через існування безлічі взаємодіючих генів зусилля щодо підвищення посухостійкості культур шляхом маніпуляції одним або кількома генами часто пов'язані з іншими, небажаними, плейотропними і фенотиповими змінами. Тестування трансгенних рослин у польових умовах відбувається не так часто, і тільки в деяких випадках спостерігається достовірне збільшення врожаю, що свідчить про значні відмінності між лабораторними і польовими випробуваннями.

Розглянуті гени, які використовуються для підвищення посухостійкості основних сільськогосподарських культур методами генетичної інженерії. Незважаючи на активні роботи в даному напрямку, складність взаємодії генів у так званій генній мережі посухостійкості свідчить про необхідність подальших досліджень у означеному тут напрямі.