

Л. І. Броннікова✉

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,  
просп. Науки, 72, м. Дніпро, Україна, 49045

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,  
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, Україна, 03022

## СТРЕС-СТІЙКІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ФОРМ ТЮТЮНУ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ КАТІОНІВ БАРІЮ ( $Ba^{2+}$ ) І КАДМІЮ ( $Cd^{2+}$ )

Взаємодія генотип/довкілля (G/E) впродовж онтогенезу формує характер реалізації генетичної програми рослини і визначає її кінцевий результат. Всі ділянки метаболізму об'єднуються прямими і перехресними зв'язками і проявляються через диференційну експресію генів у формі динамічних фенотипових реакцій/проявів/змін у компартментах організму. За нормальних умов організм підтримує свій гомеостаз, з максимальною ефективністю засвоює трофічні та енергетичні ресурси довкілля. Погіршення зовнішніх факторів може викликати порушення, навіть розриви між системами організму, клітинами, тканинами. Система зазнає стресу. Серед абіотичних стресів найбільш шкодочинним вважається осмотичний стрес, різновидами якого є засолення та водний дефіцит. За останній час осмотичний стрес суттєво збіднює природні екологічні системи. Зникає та незворотно втрачається значна кількість природних генотипів. Знижується врожайність сільськогосподарських культур, погіршується якість інтегрального продукту. Виникає потреба в якісно нових формах рослин, стійких до стресів. Оскільки стрес-стійкість є полігенною характеристикою, то нові стійкі рослинні форми мають відзначатись комплексною стійкістю до ряду стресових чинників. Складність проблеми передбачає розробку біологічних технологій нового порядку, які поєднали б традиційні опрацьовані методології із новими креативними ідеями. Пропонується застосування методу клітинної селекції з іонами важких металів (ІВМ) для отримання рослин із підвищеним рівнем стійкості до сольового та водного стресів. Метод клітинної селекції відзначається рядом особливостей. Цей метод у своїй основі забезпечує відбір генетично змінених клітинних варіантів у масиві клітин дикого типу. Оскільки селекція здійснюється на рівні клітин, то в експерименті піддаються моніторингу тисячі об'єктів інтересу. Клітинна селекція – це методологія *in vitro*. Цей позитивний фактор дає можливість одночасного строгого контролю над факторостатними умовами із широкою варіабельністю селективних агентів. Важливою складовою клітинної селекції є екологічна безпека. Для отримання форм із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів було використано метод клітинної селекції із летальними дозами катіонів  $Ba^{2+}$  і  $Cd^{2+}$ . Катіони барію ( $Ba^{2+}$ ) були задіяні для отримання рослинних форм із підвищеним рівнем солестійкості. Раніше було встановлено, що головною патологічною ознакою засолення є незворотна втрата фізіологічно актуальних іонів  $K^+$ . Також було

---

✉ E-mail: Zlenko\_lora@ukr.net

DOI: 10.15421/442409

98

показано, що  $Ba^{2+}$  втручається в переміщення іонів  $K^+$  як всередині клітини, так і назовні. У зв'язку з цим було зроблено припущення, що стійкість до  $Ba^{2+}$  може поєднуватись із стійкістю до засолення. Різновидом осмотичного стресу є водний дефіцит. За умов зневоднення відбувається патологічна дегідратація протеїнів із повною втратою їхніх функцій. Попередженню ушкоджень сприяє клас білків дегідринів. До їхньої групи належать білки пізньої стадії ембріогенезу (LEA). З іншого боку, було встановлено, що катіони  $Cd^{2+}$  негативно впливають на LEA. Запропоновано гіпотезу, що стійкість до  $Cd^{2+}$  може координуватись із стійкістю до зневоднення. Для підтвердження гіпотези були створені селективні системи із летальними дозами йонів  $Ba^{2+}$  і  $Cd^{2+}$ . На таких селективних середовищах отримані стійкі до IBM клітинні лінії тютюну. Після ряду пасажувань  $Ba$ -стійкі клітинні варіанти перенесли на летальне для клітинних культур дикого типу засолення, створене додаванням солей морської води.  $Cd^{2+}$ -стійкі клітинні лінії пересаджували на середовище, яке містило летальні дози маніту. У подальшому відібрані стійкі варіанти вирощували паралельно на середовищах з відповідними IBM та за умов осмотичних стресів. Експериментальні форми відзначались комплексною стійкістю до всіх стресових агентів. Після підтвердження явища комплексної стійкості із стійких клонів були регенеровані рослини, а також отримані насінневі покоління. Генетичний характер осмотостійкості перевіряли за дії летальних осмотичних стресів *in vitro*. Дослідження фундаментальної проблеми стрес-стійкості обов'язково спирається на вивченні різних детермінант стійкості-генетичних, біохімічних, фізіологічних. Уже відомі маркери, котрі гарантовано вказують на зміни в протеомах, метаболомах, асоційовані із явищем стійкості. Одним із характерних проявів реакцій стійкості є зміни рівня вільного L-проліну залежно від умов вирощування. Так, при вирощуванні клітинних культур і регенерованих рослин за умов прямої дії засолення або водного стресу в стійких формах зростає рівень вільного L-проліну. Якщо стресові умови замінювали на нормальні, то цей параметр знижувався. Рівень вільного проліну – це динамічний показник. Його динамічні коливання вказують на активний метаболізм. Активні флуктуації рівня амінокислоти вказують на активну життєдіяльність експериментальних форм як на клітинному рівні, так і на рівні рослини. Порівняння із вихідними формами продемонструвало суттєві відмінності. Паралельні дослідження стійких варіантів на різних рівнях організації (клітинна культура vs рослина) дадуть наразі інформацію про координацію різних ланок метаболізму/комунікації як у межах клітини, так між органами багатоклітинного організму. Таким чином, клітинна селекція із залученням IBM може бути адекватним методом відбору рослинних форм із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів. Система стійка клітинна лінія – стійка рослина проявляється у всіх складових системи і підтримується реалізацією прямих і перехресних зв'язків на всіх рівнях організації рослинного організму. Стійкість системи за стресових умов підтримується як за умов постійного стресового навантаження, так і у випадку змін зовнішнього фону. Маркером стійкості покращеної рослинної форми найбільш виразними є динамічні показники, такі як пролін. Розвиток одноклітинної популяції (стійка клітинна культура) та багатоклітинного організму за стресових умов є результатом диференційної експресії генів.

*Ключові слова:* клітинна селекція, катіони  $Ba^{2+}$  та  $Cd^{2+}$ , осмотичний стрес, стійкість, пролін.

L. I. Bronnikova✉

*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine  
Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

**STRESS RESISTANCE OF EXPERIMENTAL TOBACCO FORMS,  
OBTAINED VIA CELL SELECTION WITH BARIUM (Ba<sup>2+</sup>)  
AND CADMIUM (Cd<sup>2+</sup>) CATIONS**

Under normal condition plant system supports cooperation among tissues and organs and actively uses trophic and energy resources. The determination of any external factor provokes a number changes within organism. Those changes are symptoms of stress situation. Stress disturbs plant parameters up to their full destruction. Among abiotic stresses the osmotic stress is the most dangerous one. It is explained by various stress – related genes and products expression. That is why the dynamics of tolerance mechanisms depends on coordinated expression of genes network. So abiotic stress tolerance is combined nature and thus comparatively difficult to obtain tolerant varieties. Several efforts are being made to improve plant stress tolerance through cell selection. Various plant forms with improved peculiar features were obtained via cell selection. In general HMI can produce vast pathological alterations in different tissues of plant organism. From the other hand, the tolerance to HMI and osmotic stress may be combined. It is known, that the principal injury of salinity pressure is connected with irreversible loss of internal K<sup>+</sup> ions. From the other hand Ba<sup>2+</sup> cations can destroy the transfer of K<sup>+</sup> streams. Plant deprivation disturbs plants protein compartments. Water plant status is connected with different types of proteins. The LEA (late embryogenesis abundant proteins) are among them. Some stress factors, especially cadmium ions Cd<sup>2+</sup>, inhibit synthesis and accumulation of LEA. So we use Cd<sup>2+</sup> in cell selection for increasing plant tolerance. There is a new trend of cell selection that provides the opportunity for obtaining variants with combined tolerance. Selective systems with lethal for cell cultures of wild type doses of Ba<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> cations were elaborated. Tobacco cell suspension cultures were planted in Petri dishes between two layers of selective media. Lethal doses of HMI resulted in elimination of wild type cells. Only single cells with genetic changes keep their viability. Ion-resistant cells grow on selective media and formed resistant cell lines. Ba-resistant lines were cultivated in presence of Ba<sup>2+</sup> cations; Cd<sup>2+</sup>-resistant variants were cultivated under Cd<sup>2+</sup> stress pressure. After several passages (single passage continued 30–35 days) under such initial conditions experimental cell variants were transferred to media with salinity or manitol. Salinity was simulated by addition of sea water salts. Manitol is organic compound for simulating water deficit. Toxic agents were added at lethal doses. Ba- and Cd-resistant cell lines maintained viability under osmotic stress pressure. So new cell cultures exhibited combined stress resistant. From cell lines with combined stress resistant tobacco plants and seed progeny were obtained. In many cases regenerants from tolerant cell cultures had not high level of stress tolerance. But regenerants of tobacco, obtained in our experiments, demonstrated active viability under osmotic stress pressure *in vitro*. This event is the argument for genetic character of feature. Plant growth and development under osmotic stress pressure depend on activation of cascades of biochemical

osmotic/gene products. Free L-proline its synthesis/accumulation/degradation are good marker of organism viability both under normal or stress conditions. L-proline is a peculiar amino acid. Its synthesis/degradation is managed by own enzyme systems. So the L-proline fluctuation are the reflects of system viability. L-proline levels were estimated in plants motivated under normal or stress conditions. There were established the increasing of free proline in stress plant, both wild type and experimental forms. But there was difference between imitial and resustaret forms. The level of amino acid demonstrated rapid changes coordinated with rapid changes of environment conditions. The complexity and polygenyc nature of salt and drought tolerance are factors contributing to the difficulties in breeding of tolerant forms. The modern technological approaches are being elaborated to obtain variants, with higher tolerance. The lack of knowledge of stress associated metabolism remains, a gap in understanding; therefore efflors are currently in progress worldwide to estimate the genetic and molecular basis of complex trait. Cell cultures and their regenerated plants demonstrated common beatures. Both objects tolerance are based of differential gene expression. Under stress conditions cell lines developed temporal gene expression and andintire plants demonstrated spatial gene expression. Cell selection with HMI exhibited itself as a good approach of obtaining new forms is maintained under stable stress tolerance of experimental changes. Stress tolerance plant metabolism is a combination of cellular mechanisms activity and coordination of plants tissue organ work.

*Key words:* cell selection, Ba<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> cations, osmotic stress, tolerance, proline.

## **Вступ**

Найактуальнішою проблемою сьогодення стала оптимізація (зменшення негативних впливів на довкілля людини та повернення у практичне використання) різноманітних техногенних новоутворень, де повністю зруйновані ґрунтовий та рослинний покриви, гідрологічний режим та відбулося формування антропогенних морфоструктур [9, 40]. Зазвичай такі території мають назву антропогенні/техногенні ландшафти, промислові майданчики та ін., що негативно впливає на стан здоров'я населення нашої держави [6, 7, 39].

Швидке, місцями незворотне, погіршення довкілля ставить перед науковим загалом вимоги адекватного реагування на поточні події. Абіотичні стреси, котрі постійно були загрозою для розвитку рослинних організмів і, як результат, суттєво знижували реалізацію генетичного потенціалу, стали комплексними. Вони поєднуються між собою, а також набувають нових рис, підсилюючись внаслідок загального зростання населення і його антропогенної діяльності.

У зв'язку з цим наукова теоретична проблема стресу, чутливості/стійкості перетворюється у глобальну проблему виживання.

Будь-який біологічний об'єкт являє собою відкриту систему, котра активно взаємодіє із доступними складовими довкілля. Взаємодія генотип/довкілля (Г/Д; G/E) визначає характер реалізації генетичної програми рослинної системи і закріплюється в інтегральних показниках, таких як: фертильність, урожайність, якість кінцевого продукту. Перебіг процесу передбачає споживання/засвоєння трофічних і енергетичних ресурсів довкілля та побудову і функціонування компартментів біологічної системи [30, 31]. За нормальних умов підтримуються координація в діях структурних та функціональних складових біологічної системи, а саме іоному, потеому, метаболу, транскриптому. Їх узгоджена

діяльність координується генетичним контролем упродовж онтогенезу. Прямі та перехресні зв'язки між усіма аспектами життєдіяльності встановлюються та видозмінюються, що проявляється та візуалізується у формі фенотипових стандартних реакцій [34].

Зміна хоча б одного чинника доквілля викликає порушення гомеостазу, стає причиною змін у динаміці розвитку. Посилення зовнішнього навантаження може викликати критичні, навіть незворотні трансформування організму. Рослина перебуває у стресовому (аномальному) стані. При цьому ступінь змін у генотипів може бути однаковим, тотожним, протилежним, різноманітним. Питання стрес-чутливості та стрес-стійкості набуває комплексності, особливо з огляду на суперечливість доступних даних [10].

Установленим фактом є полігенний характер стрес-стійкості. З огляду на цей постулат починають диференціюватись реакції стресу та реакції адаптації, визначаються адекватні маркери стійкості клітинного рівня та інтактною рослини.

Серед абіотичних стресів найбільш агресивним є осмотичний. Він може проявлятися у вигляді сольового стресу або водного дефіциту. Не виключена ймовірність їхньої поєднаної дії. Активні експерименти з отримання рослинних форм із підвищеним рівнем стійкості до засолення/зневоднення ведуться чимало десятиліть. Для цього застосовують як традиційні генетичні підходи, так і альтернативні біологічні технології. На цьому напрямку отримані виразні успіхи [3, 10, 24, 26, 32]. У той же час спостерігаються і небажані результати – нульові, чи навіть негативні. У низці альтернативних методологій можна виділити клітинну селекцію. Цим методом ще в кінці минулого століття були отримані рослинні форми із поліпшеними характеристиками, у тому числі із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів [10, 30]. Однак з огляду на істотні обмеження клітинна селекція не зробила революції.

Адекватність будь-якого наукового підходу обумовлюється його регулярною модифікацією. У першу чергу це стосується просування креативних ідей. У зв'язку із вищевказаним була запропонована гіпотеза про застосування йонів важких металів (ІВМ) в клітинній селекції для виділення рослинних форм із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів [12, 13, 17, 20].

Загалом ІВМ відносяться до категорії чинників, котрі здатні спричинити широкий спектр шкодочинної дії. ІВМ діляться на дві групи, а саме: а) фізіологічно необхідні у мікрокількостях; б) фізіологічно неактуальні, токсичні в залишкових дозах. Останні, потрапляючи в живі організми, викликають експресію чисельних генів [21, 22]. До категорії ІВМ, шкодочинних у залишкових кількостях, належать катіони барію ( $Ba^{2+}$ ) і кадмію ( $Cd^{2+}$ ). Катіони  $Ba^{2+}$  характеризуються виключною токсичністю для теплокровних тварин і особливим характером взаємодії з іонами  $K^+$  у рослин. Так, було встановлено, що  $Ba^{2+}$  суттєво впливає на переміщення потоків  $K^+$ , як у межах рослини, так і з клітини в зовнішнє середовище. Аналогічно  $Ba^{2+}$  втручається в переміщення катіонів натрію  $Na^+$ . Останні події викликають аналогію із дією засолення. Так, відомо, що основною вадою сольового стресу є незворотна втрата рослинами  $K^+$  і заміщення цього компоненту на іони  $Na^+$ , шкідливі для клітин. З огляду на вказані факти була висунута ідея використання  $Ba^{2+}$  для отримання форм рослин із підвищеним рівнем солестійкості.

Серйозне порушення в рослинах викликає посуха – водний дефіцит. Для збереження внутрішньоклітинної вологи рослинні організми створили чисельні

протекторні сполуки, одним із яких є особливий клас протеїнів – дегідрини. Дегідрини, аналогічно до шаперонів, захищають білкові структури від денатурації внаслідок дегідратації. До широкої групи дегідринів належать білки LEA, білки пізньої стадії ембріогенезу (late embryogenesis abundant proteins) [18]. У той же час LEA значно ушкоджуються під дією деяких ІВМ, а саме в результаті впливу катіонів  $Cd^{2+}$ . У зв'язку з цим була запропонована гіпотеза про можливість поєднання стійкості до  $Cd^{2+}$  із стійкістю до водного стресу [12, 14, 24, 28].

Найбільш придатним для перевірки гіпотези способом було дослідження в системі *invitro*. Для цього були створені модельні системи, що являли собою культуральні середовища із летальними для клітинних культур дикого типу дозами катіонів  $Ba^{2+}$  або  $Cd^{2+}$ . На селективних середовищах були відібрані стійкі клітинні варіанти тютюну.

Отримання рослинних форм із покращеними показниками крім гарантованих селективних систем потребує адекватних маркерів оцінки об'єктів інтересу. Перевіраним маркером оцінки стрес-стійкості є рівень амінокислоти – L-проліну.

L-пролін – пірролін – 2 – карбонова кислота, *pro* ( $C_3H_7NO_2$ ) гетероциклічна сполука, котра містить атом азоту в молекулі вторинного аміну. Існує у формі двох оптичних ізомерів L– і D–форми. Біологічно актуальною є L–форма. L-пролін є неспецифічним стресовим протектором [29, 32]. Перш за все були виявлені осморегуляторна, водоутримувальна, детоксикувальна функції *pro*. Гідрофобне пірролідінове кільце *pro* взаємодіє із гідрофобними частинами білкової структури. При цьому заряджені ділянки молекули *pro* орієнтуються назовні. За рахунок цього за умов дегідратації цитоплазми та за умов високого засолення краща розчинність білка. За останні роки молекула *pro* досліджується як регуляторна одиниця, котра може підтримувати цілісність прямих і перехресних зв'язків між структурними компонентами геному.

Нова ідеологія використання катіонів  $Ba^{2+}$  і  $Cd^{2+}$  в клітинній селекції для вирішення стійких до осмотичних стресів клітинних варіантів справдилась. Однак клітинна селекція як практичний метод має низку суттєвих вад. Так, нерідко рослини, отримані із стійких клітинних варіантів, не демонстрували підвищеного рівня стійкості за стресових умов. Тобто проблема отримання бажаної характеристики експресувалась виключно на клітинному рівні. Припущень з цього питання достатньо. Одним з ключових може бути негенетичний характер стійкості. При створенні селективних систем концентрація селектувального агента була недостатня. За таких умов крім генетично змінених форм відбиралась значуща кількість фізіологічних адаптантів. Такі варіанти здатні до регенерації з більшою ефективністю. Розширений діапазон норми реакції у клітинних культур не реалізувався у багатоклітинного організму.

У нашому випадку були задіяні летальні концентрації стрес-формуєчих ІВМ. Рослини – регенеранти та насіннєві покоління витримували сильні осмотичні стреси. За стресових умов стійких до осмотичних стресів рослин підвищувався рівень вільного L-проліну.

Стрес – стійкість рослин проявляється не тільки за умов постійної дії стресу, але й при зміні зовнішніх умов. Такий характер життєдіяльності можливий у випадку диференційної експресії структурних і регуляторних генів.

Подальші дослідження динаміки життєдіяльності експериментальних рослин за нормальних і стресових умов можуть надати інформацію про координований процес комунікації як у межах клітини, так і між тканинами/органами багатоклітинної системи. У цьому випадку паралельне порівняння дослідження стійка клітинна лінія – стійка рослина допоможе встановити пріоритетність «внесків» клітинного та загального рівнів у реалізацію характеристики стійкості.

#### **Об'єкти та методи дослідження**

Об'єктом дослідження були експериментально отримані форми тютюну. Тютюн (*Nicotiana tabacum* L.) аналогічно до арабідопсису широко використовується в експериментах, особливо проблемних. Як модельний об'єкт у нашому конкретному випадку вибір тютюну має виключне значення. Тютюн це класичний глікофіт. Отже, отримання форм із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів буде найкращим аргументом на користь працездатності гіпотези.

Для клітинної селекції залучали суспензійні культури тютюну дикого типу. Процес первинної селекції здійснювали за допомогою стандартної процедури плейтингу [12, 13]. На селективних середовищах з іонами  $Ba^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  були відібрані стійкі клітинні культури. Клітинні варіанти культивували на стресових середовищах різного складу: з ІВМ, а також середовищах із засоленням та манітом.

Після ряду пасажувань здійснювали процедуру регенерації. Отримані рослини, а в подальшому насінневе потомство тестували на осмостійкість *in vitro*.

Тестування рівня стійкості експериментальних систем здійснювали за умов різних летальних стресів. Дози стресового агента визначались окремо для кожного типу чинника. Доза визначалась при аналізі генотипів в умовах широкого спектру концентрації. Летальною концентрацією вважали таку, що викликала елімінацію форм дикого типу. Елімінація фіксувалась за фактом відсутності відновлення розвитку при перенесенні в нормальні умови.

Для створення стресів залучали такі чинники: катіони  $Ba^{2+}$  і  $Cd^{2+}$  в складі розчинних солей; солі морської води (морська сіль); маніт. Солі морської води використовували для моделювання комплексного засолення. Такий вибір максимально подібний до природних умов. Маніт – це чиста сполука, котра при додаванні в культуральні середовища моделює дію зневоднення. Як базове (контрольне) середовище було обране живильне середовище Мурасіге – Скуга [36]. Для клітинних культур середовища доповнювали ауксинами та цитокінінами. Як джерело вуглеводів додавали сахарозу.

Експеримент здійснювався за підтримання оптимальних дослідних умов [10, 11]. Тривалість стандартного пасажу становила 30–35 днів. Тривалість пасажу могла збільшуватись для визначення межі стресостійкості. Категорія реактивів була не нижчою за ч.д.а. У тканинах експериментальних форм тютюну вимірювали рівень вільного проліну за різних умов. Вимірювання проводили за методикою [1]. Метод базується на утворенні зафарбованого продукту реакції взаємодії вільного L-проліну з нінгідриним реактивом при інкубації впродовж 60 хвилин при  $100^{\circ}$  в кислому середовищі. Хромофор після очищення спектрофотометрується при довжині хвилі  $\lambda = 520$  нм. Метод діє в широкому діапазоні концентрацій. Калібрувальна крива будується по кристалічному проліну. Вимірювання проводилось в умовах постійного стресового тиску або при зміні умов тестування. Первинні дані статистично оброблені.

### Результати та їх обговорення

У ході проведення багаторівневих тестувань була доведена гіпотеза можливості одержання експериментальних варіантів тютюну із підвищеним рівнем стійкості до сольового та водного стресів методом клітинної селекції з ІВМ (катиони  $Ba^{2+}$  і  $Cd^{2+}$ ). В результаті первинної селекції на середовищах були виділені стійкі клітинні лінії (СКЛ). Кожна СКЛ є вегетативним потомством окремих життєздатних генетично змінених клітин. Генетичний статус стійкості підтверджувався частотою їх появи, яка складала  $10^{-6}$  [2, 8, 16, 33, 37]. На користь факту генетичної природи стійкості також свідчили стійкість рослин різних поколінь, а також стійкість вторинного калюсу, індукованого із рослин-регенерантів.

У загальному випадку за нормальних умов (н.у.) стабільна клітинна культура проходить низку ланок розвитку [11, 41]. Порушення (переривання) будь-якої з них повертає культуру в початкову стадію. Це штучне зупинення є зовнішнім втручанням. Однак таку створену ситуацію не можна вважати стресом, оскільки припиненню нормальної життєдіяльності не передували ендогенні патологічні зміни в клітинах. За нормальних умов підтримувався характер життєдіяльності, відповідний до стадії розвитку культури.

Дія осмотичних стресів викликає інші процеси, протилежні за спрямуванням у звичайних (дикий тип) та стійких культур. За умов дії летальних стресів (як у наших експериментах) культури дикого типу гинуть; у той же час стійкі клітинні варіанти проходять весь цикл розвитку.

Стійка клітинна лінія, по суті, є віддаленим потомством відібраної при первинній селекції мутантної клітини. За застосованих нами стресових умов – це популяція подібних структурних одиниць, які практично тотожно змінюються (діляться, ростуть) у просторі й часі. За період одного стандартного пасажу стійка культура проходить всі стадії розвитку системи, кожна з яких регулюється за рахунок диференційної експресії генів. (Зміна експресії генів відбувається аналогічним чином в кожній складовій сукупній популяції. При цьому експресія варіює як у часі, відповідно до кожної стадії клітинного циклу, так і при зміні типу стресового фактора).

Обмеженням клітинної експансії для стійких клітинних ліній виступає не стресовий чинник як такий, а вичерпання ресурсів культуральної системи *in vitro* і старіння культури. При перенесенні старіючої культури на свіже живильне середовище будь-якого складу відбувається адаптація до нових умов і відновлення життєдіяльності [12, 38].

Хоча для життєдіяльності наших культур ключовим фактором була реакція на дію летальних концентрацій стресових агентів, у той же час збільшення строку культивування (кількості пасажів) *in vitro* також впливало на структуру експериментальної популяції, а саме – ставало причиною збільшення частки поліплоїдних клітин.

Оскільки цикл розвитку стійкої культури проходив без змін, то можливо припустити такий розвиток подій.

1. *Лаг-фаза*. Упродовж цієї стадії здійснюється первинне «розпізнавання» типу стресового чинника клітиною. (Це регулярний процес, що відбувається як при основній селекції на середовищі з ІВМ, так і при подальшому культивуванні, оскільки зміни культуральних середовищ здійснюються постійно при довільному чергуванні стресових чинників).



Клітинні реакції спрямовані на активацію рецепторів первинного стресового сигналу та його трансдукції. Біомаса клітинної культури не змінюється.

2. *Фаза логарифмічного росту.* Стадія клітинного поділу відзначається максимумом мітозів. Загальна біомаса культури зростає за рахунок збільшення кількості генетично та фізіологічно подібних структурних одиниць (клітин). Нормальний перебіг мітозу можливий за умов підтримання адекватного рівня водного, трофічного та енергетичного статусів.

3. *Фаза стаціонарного росту.* Поділ клітин припиняється, клітини розтягуються, збільшується об'єм внутрішньоклітинних компартментів. На фоні постійного впливу стресору та поступового вичерпання трофічних ресурсів стійка клітинна культура підтримує життєдіяльність за рахунок максимально різноманітного (за існуючих умов) *denovo* синтезу метаболітів, у тому числі сумісних ендегенних осмолітів, та перерозподілу/компартментації йонів. Здійснюються процеси осморегуляції та встановлюється градієнт протонів. Підвищується роль вакуолі в загальному підтриманні гомеостазу.

Стійка клітинна культура зберігає життєдіяльність за будь-яких обставин: стабільні умови/зміни; норма/стрес. Очевидно, що для розвитку клітинної культури ключову роль відіграє часова експресія генів, оскільки саме в результаті чергування подій стає можливим зміна фаз клітинного циклу. Таким чином здійснюється адаптація клітинної культури до конкретного стресового чинника.

Клітинна культура, що росте і розвивається, на певному етапі починає потерпати від прогресуючого дефіциту ресурсів. Саме в цей період актуалізується факт гетерогенності клітинної популяції. Життєздатність клітин підвищується пропорційно до зростання хромосомних наборів (3n, 4n і т.д.). Таким чином здійснюється додаткова селекція стійких варіантів, опосередкована системою *invitro* як такою. Імовірно, цей процес починається в кінці фази логарифмічного росту і триває впродовж фази елонгації (стаціонарного росту). Можливо, це явище лежить в основі появи варіантів із підвищеним рівнем стійкості.

Розвиток (збільшення біомаси) стійкої клітинної популяції відбувається за рахунок незалежного функціонування окремих клітин. У разі необхідності клітинна популяція може бути поділена на декілька субпопуляцій, що саме здійснюється при порівняльних дослідженнях, або навіть на окремі клітини (в суспензії). Субпопуляції будуть аналогічним чином реалізовувати свої клітинні характеристики стійкості незалежно. Доказом цього є стандартний показник відносного приросту свіжої біомаси:  $(m_k - m_p)/m_p$ ; де  $m_p$  – маса калюсу, фіксована при переміщенні на свіже середовище;  $m_k$  – маса культури в кінці пасажу [8, 11, 42].

Гени, які забезпечують перебіг клітинного циклу, широко досліджуються [3, 8, 42, 44]. Одним із недоліків використання клітинної селекції в експериментах з отримання стійких до осмотичних стресів рослин є невідповідність між рівнями стійкості СКЛ та рослин, отриманих із них, а саме: рослини нерідко не демонстрували бажаної ознаки, не витримували стресового навантаження. А оскільки стрес-стійкість відзначається варіабельністю впродовж онтогенезу, то рослина могла потерпати від стресового пригнічення в будь-який час. Цей небажаний факт став однією із причин обмеженого застосування клітинної селекції [11, 19].

Інтактна рослина – багаторівневий організм – за стресових умов реагує на зовнішній тиск залежно від рівня стійкості. При цьому ступінь патологічних

уражень буде пропорційна тривалості та силі стресового впливу. Окремі тканини та органи будуть порушувати/припиняти свої функції із подальшою ймовірністю незворотної деградації компартментів.

Відмінність між реакціями клітинних культур і багатоклітинної рослини полягає саме в тому, що в першому випадку СКЛ реагує тотожно, незалежно від кількості її окремих компонентів, а в другому спостерігається низка різноманітних ефектів. При цьому на подолання негативних проявів буде задіяно більше трофічних та енергетичних внесків. Тому для визначення рівнів стійкості рослин доречно оцінювати систему клітинна культура – рослина в паралельному порівняльному дослідженні.

Найбільш подібні до клітинної культури – це молоді проростки. На ювенільній стадії, при відсутності диференціації між тканинами молоді проростки реагують як одне ціле.

Загалом сформоване зріле насіння, яке знаходиться в стадії спокою, достатньо стабільна система. Вона має свої рівні захисту, що забезпечують його високу стійкість. Наприклад, мітохондріальні білки пізнього ембріогенезу (LEA), гени котрих експресуються в насінні, є природними білками, здатними зворотно складатися в спіраль при висушуванні [18, 43]. Формування структури LEA білків пов'язано з окисленням деяких залишків і дезамінуванням. Показано, що LEA захищають мембрани мітохондрій при зневодненні [11, 35, 43]. Іншим природним протектором насіння є пролін; його високий пул фіксувався в насінні, яке проростало за нормальних умов, а особливо при засоленні. Таким чином стійкість насіннєвого потомства в наших дослідках оцінювалась системно.

Досліджували здатність до проростання насіння та реакцію молодих проростків R1 на дію засолення та водного стресу *invitro*. Засолення та водний стрес створювали, додаючи відповідно солі морської води (20,0 г/л) і маніт (0,5M). Такі концентрації втримувались рослинами R0. В окремо обумовлених випадках концентрації стрес-формуєчих сполук збільшували.

Проростання насіння вважають найбільш критичним етапом в життєвому циклі рослин, котрий забезпечує виживання наступних поколінь. Оскільки рослини – це прикріплені організми, то вони потребують особливої інтеграції внутрішніх і зовнішніх сигналів для формування коректної відповіді [2, 8, 21, 25, 44]. Це особливо важливо за стресових умов.

За нормальних умов насіння тютюну починало проростати на 3-тю добу; на 7-му добу кількість (%) пророслого стабілізувалася. На цей період проросток мав корінець та два листочки, і далі розпочинався ріст молоді рослини (збільшення морфометричних показників диференційованих органів, кількості листків і листової маси). Уповільнення росту відбувалось після витрачання живильного середовища. Схожість насіння R1 рослин і дикого типу була аналогічною, в межах 85,04–97,75 %. Указані вище показники вважали нормою реакції, відносно якої здійснювали подальші порівняння (рис. 1).

Проростання насіння всіх генотипів тютюну за нормальних умов відбувалось без візуальних особливостей. Різниці між ними не спостерігали.

Насіння R1, а також насіння дикого типу пророщували за умов різних модельованих осмотичних стресів. Умови випробування повністю пригнічували процес проростання всіх генотипів. З таким феноменом ми зустрічались в попередніх дослідженнях [11, 12, 13, 25]. Однак раніше ми відзначали лише зміщення строків проростання (процес починався з початком другого тижня

експозиції та був пролонгований у часі). Це стосувалося насіння R1, яке було отримано від регенерантів солестійких клітинних ліній прямої селекції, і тестувалося лише за умов засолення.



**Рис. 1.** Проростання насіння за нормальних умов

Для визначення життєздатності непророслого насіння його через 2 місяці витримували за стресових умов (солі морської води, маніт) переносили на нормальне живильне середовище для індукції проростання (табл. 1).

*Таблиця 1*

**Життєздатність насіння тютюну, перенесеного із стресових умов**

Насіння R1	Проростання насіння (% від висадженого)	
	Морська сіль → КБС	Маніт → КБС
СКЛ №3	62,23 ± 5,15	46,48 ± 3,21
СКЛ №5	46,08 ± 4,29	41,21 ± 5,61
Контроль	20,29 ± 1,30	11,01 ± 1,44

Примітка: морська сіль – 2,0 %; маніт – 0,5М.

Процес проростання у генотипів R1 активізувався на 2-гу добу, а на 3-тю добу спостерігали масове проростання. У дикого типу активація проходила на 5-ту-7-му добу. Тобто насіння R1 характеризувалось підвищеною активністю проростання після зняття стресового тиску. Ця подія є безперечно адаптаційною реакцією стійкого генотипу, спрямованою на підтримання експансії виду.

Подальше витримування насіння за умов таких модельованих стресів призводило до різко прогресуючого припинення проростання насіння контролю.

Таким чином, з даних таблиці зрозуміло, що життєздатність (його підтримання) у насіння R1 була суттєво вища за дикий тип. Затримання схожості насіння у різних генотипів тютюну, що спостерігалось при засоленні або водному стресі, було викликано протилежними обставинами.

Для R1 покоління – це була захисна реакція, спрямована на максимальне збереження рослин. Відсутність проростання насіння дикого типу було наслідком прогресуючого стресового ураження. Аналогічні події ми

спостерігали раніше [19, 21, 41]. Якщо концентрація стресової сполуки та час її дії збільшувались, то негативний ефект також зростав.

Оскільки затримка проростання насіння за дії осмотичних стресів була властива всім генотипам, то можна трактувати цей феномен як неспецифічну протекторну реакцію [11, 15, 44].

У літературі вказується на специфічну дію різних осмотичних стресів. Тому досліджували реакції генотипів на різні осмотичні стреси. Для активації проростання насіння 24 години витримували на контрольному середовищі. Після активації насіння переносили в стресові умови, де його культивували впродовж 8 діб. Насіння не проростало. Насіння, пригнічене стресом, повертали в нормальні умови і через 14 діб вимірювали довжину надземної частини та коренів.

Усі рослини мали 2 листочки, аналогічні за розміром; проростки R1 мали по 2 і більше корінців (дикий тип – один корінь).

Варіант № 3 отримано з Ва-СКЛ; варіант № 5 отримано з Cd-СКЛ (рис. 2).

Спостерігались генотипові особливості морфометричних показників у проростків R1 покоління. Так, у варіанта № 3 надземна та коренева частини проростків на стресове витримування реагували аналогічним чином. Тобто формування диференційно працюючих органів не зазнавало післядії типу стресового агента. Навпаки, варіант № 5 формував функціональні тканини, координуючи їх із типом попереднього стресового чинника. Можливо припустити, що у варіанта, отриманого із Cd-СКЛ, після перенесення в нормальні умови протилежні ростові процеси актуалізуються в різній мірі. У цьому проявляються, на нашу думку, генетичні зміни, які забезпечували захист до типу стресора.

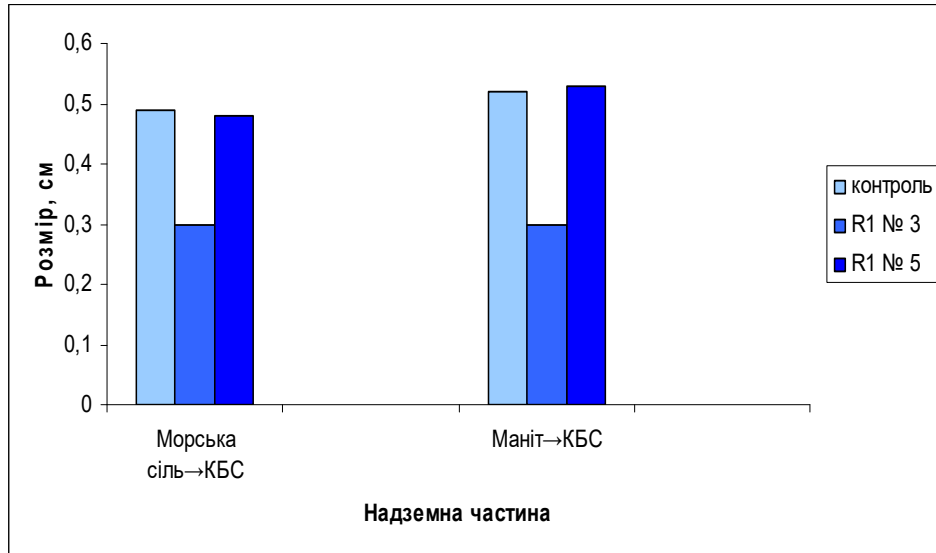
Шкодочинність абіотичних стресів *in vivo* поглиблюється різкими змінами показників: градієнт температури день/ніч; варіювання йонного складу та йонної сили зовнішніх розчинів, адитивна дія декількох чинників тощо. Успішність функціонування організму за таких умов можлива у випадку високої пластичності рослини, швидкої здатності до адаптації.

За нормальних умов пророщували насіння тютюну R1 і дикого типу. Семидобові сформовані проростки переносили в умови модельованих осмотичних стресів, які створювали додаванням 20,0 г/л солей морської води або 0,5М маніту, і культивували впродовж 14 діб. Після такого субкультивування відділяли надземну частину і змінювали умови вирощування: КБС ← 0,5М маніт → 0,8М маніт; б) КБС ← 2,0 % мор. сіль → 2,5 % мор. сіль. Тобто досліджували перебудови за різних змін: стрес I → н.у., або стрес II → стрес I.

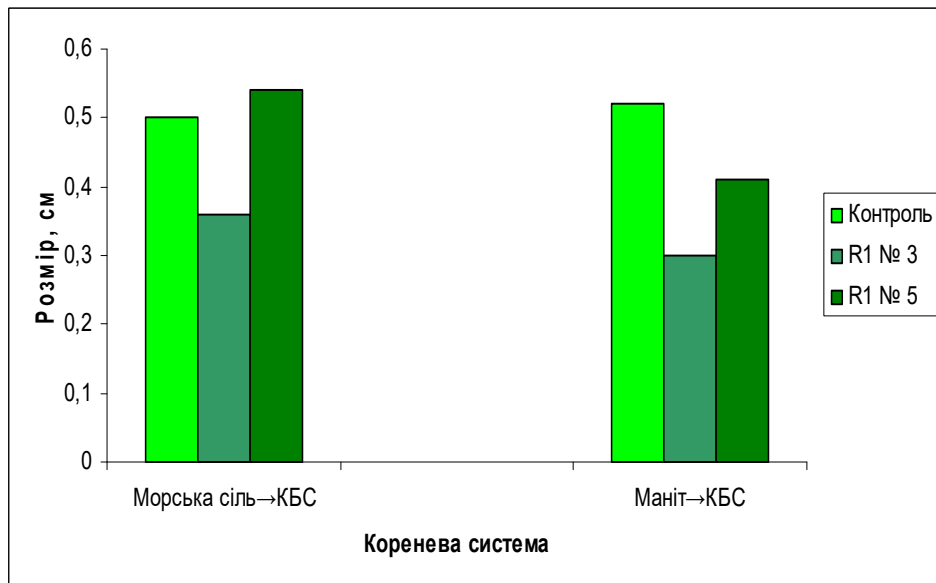
За нових умов рослини культивували 7 діб. За цей час починали проявлятися відмінності між рослинами. Якщо проростки R1 переміщували у нормальні умови, вони відновлювали ризогенез. Проростки дикого типу, котрі культивували на стандартному живильному середовищі Мурасиге-Скуга (КБС), не укорінювались. З такою подією ми зустрічались раніше. Тоді рослини дикого типу після повернення в нормальні умови навіть виділяли метаболіти.

У випадку посилення стресового тиску спостерігали негативні зміни в надземній частині рослин контролю: знебарвлення (середовище з манітом) та поява некротичних ділянок, підсихання (середовище із сіллю). Цілком очевидно, що різка зміна умов вирощування стала більшим ушкоджуючим фактором, ніж стабільне стресове навантаження.

Після 15 діб витримування за посилених стресових умов *invitro* проростки R1 СКЛ переносили в нормальні умови. Всі рослини після періоду адаптації починали розвиватись і в кінці пасажу візуально не відрізнялись від рослин, які постійно культивували в нормальних умовах.



а



б

**Рис. 2.** Розмір надземної (а) та коренів (б) рослин тютюну в процесі проростання на 14-ту добу

Проте найбільш адекватним показником ефективності адаптації у молодих рослин є вміст вільного проліну. У літературі відмічено, що в насінні, яке проростає, та молодих рослинках підтримується значний рівень цієї

амінокислоти [4, 5, 23, 27, 37]. Імовірно, це є протекторним еволюційним пристосуванням для виживання за несприятливих умов: більша частина тканин проростків – це меристема, котра активно ділиться і є найбільш стрес-вразливою. Як регуляторна молекула L-пролін може координуватись із тотипотентністю окремих клітин [2, 3, 29, 35].

У наших експериментах молоді проростки за нормальних умов акумулювали вільний пролін із збільшенням віку проростка (табл. 2).

Таблиця 2

**Уміст вільного проліну в проростках тютюну різного віку,  
культивованих за нормальних умов *in vitro***

Генотипи тютюну	Пролін мг % / г сирі маси		
	14-доб. проростки	30-доб. проростки	45-доб. проростки
R1 № 5	42,63 ± 3,24	59,64 ± 6,54	98,83 ± 7,18
Контроль	49,71 ± 1,45	70,83 ± 3,23	108,13 ± 5,08

За нормальних умов спостерігалась абсолютна тотожність за вказаним показником між генотипами, які суттєво відрізнялись рівнем стійкості до осмотичних стресів. Отже, перебіг реакцій синтезу/деградації *pro* у них також аналогічний; зростання рівня проліну ймовірно було реакцією на зменшення трофічних ресурсів живильного середовища. При культивуванні за різних умов було зафіксовано різницю між стійкими формами та диким типом (рис. 3).

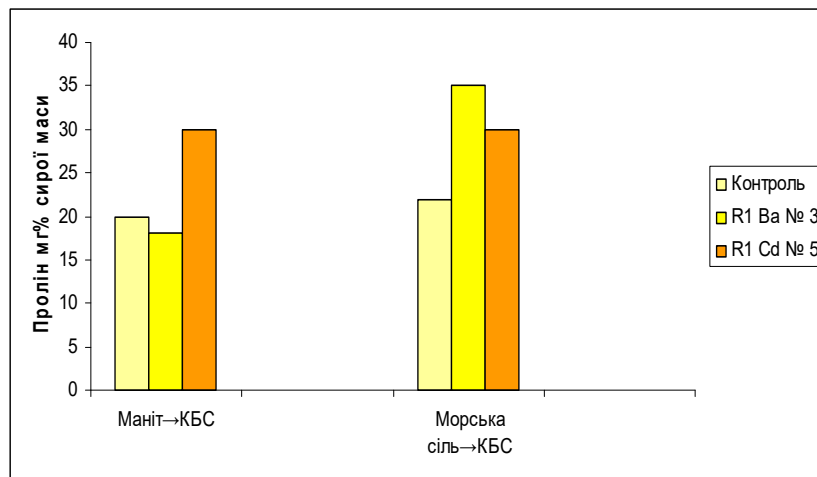
Порівняння абсолютних величин рівня вільного проліну, наведених на рис. 3, *a* та *b*, підкреслює осмопротекторну роль проліну. Відносно невисокий рівень проліну у стійких генотипів при відновленні (варіант стрес → норма) може свідчити на користь переважання процесу катаболізму амінокислоти.

Шиленков А. В. та ін. (2008) досліджували вміст проліну в насінні гречки при його проростанні та за різних зовнішніх впливів [15]. Дія імпульсного тиску (ІТ) 11 мПа викликала збільшення рівня вільного проліну в 1,5–4,0 рази. При цьому продуктивність рослин зростала на 12 %. Вплив ІТ силою 29 мПа спричиняв гальмування росту, порушення метаболізму проліну, викликав загибель 28 % насіння. Зниження температури до 0 °С за 24 години пригнічувало схожість і продуктивність. Падіння температури до -4 °С призводило до загибелі 90 % насіння, незважаючи на 2,5-разове зростання рівня проліну.

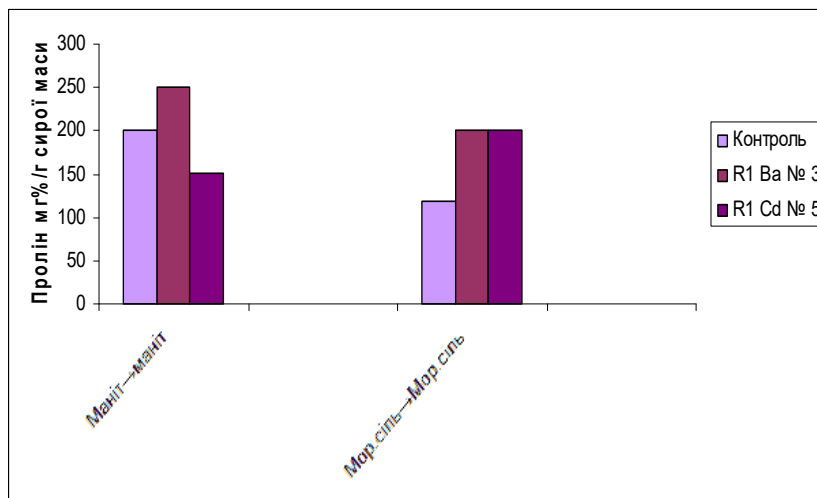
У нашому випадку відмічено високий вміст проліну у всіх досліджуваних генотипів. При цьому рівень проліну в проростках при засоленні нижчий за цей показник, виміряний у рослин, котрі піддавали впливу молекулярного осмотика. Однак пул вільного проліну у рослин R1 і контролю різний за походженням. У першому випадку акумуляція амінокислоти здійснювалась за рахунок його синтезу. Не виключена також можливість збільшення пролінового пулу в надземній частині також за рахунок транспорту цієї амінокислоти з кореневої системи. Відомо, що відносна експресія рівня транспортерів проліну у васкулярних і кортикальних клітинах коренів вища, ніж у листках.

У той же час у рослин дикого типу вміст проліну зростає, можливо, внаслідок деградації пролін-містких протеїнів, яка відбувалась при стресовому ураженні.

У рослин варіанта стрес → норма вміст вільного проліну був нижчим за показники, наведені в табл. 2. Це може свідчити про обмеженість процесу синтезу проліну, яку спричинив попередній стрес. На це додатково вказує відсутність різниці між варіантами маніт → КБС та морська сіль → КБС. Навпаки, коливання вмісту проліну при відновленні у стійких генотипів ілюструють динамізм обмінних процесів відновлення.



а



б

**Рис. 3.** Уміст вільного проліну в проростках тютюну при зміні умов культивування *invitro*: а – при перенесенні в нормальні умови; б – при збільшенні стресового навантаження

У природних умовах під вплив різноманітних стресів рослинний організм може потрапити в будь-яку стадію свого розвитку. У той же час стійкість/чутливість рослини в онтогенезі варіює.

Багатоклітинний організм на всіх стадіях свого онтогенезу може нормально функціонувати лише за умови підтримання кооперативної дії своїх

диференційованих органів і тканин. За стресових умов інтегральні показники життєдіяльності (продуктивність, харчова цінність) особливо залежать від функціональної та структурної стабільності органів рослини. Оскільки тканини цілісного організму відрізняються своєю анатомією, морфологією, фізіологією, природно, що процеси стресової адаптації будуть відповідати кожній окремій тканині.

Загалом всі тканини рослини згідно з їхніми функціями можна поділити на два типи – диференційовані та меристематичні. У стійких генотипів за стресових умов спеціалізовані тканини підтримують свій функціональний статус, меристематичні – зберігають здатність до проліферації, збільшуючи загальні лінійні розміри та поповнюючи клітинний пул диференційованих тканин.

Схематично такий процес розвитку наших експериментально отриманих стійких рослин за стресових умов представлено на рис. 4.

Дії стресу піддається генотип – відбувається взаємодія G/E. Умовно (спрощено) організм може бути поділений на три рівня: рослина (1-й рівень); тканини (2-й рівень); клітини (3-й рівень). Сприймає стресовий сигнал цілісний організм. Далі сигнал поширюється органами (корінь, стебло, листки). У цій трансдукції не виключена участь транспортерів на великі відстані, а роль сигнальних молекул можуть виконувати нітрати, NO, пролін. При цьому енергетичні та функціональні навантаження найбільші в початковий період, коли відбувається запуск ряду біохімічних систем, котрі беруть участь у структурній перебудові клітини. Швидкість реакції клітини залежить від функції, яку вона виконує. Далі, на нашу думку, процес здійснюється наступним чином: реагують окремі клітини → структурно-функціонально модифікуються тканини → адаптується рослина. Процес росту та розвитку організму не припиняється. Результативність реакцій-відповідей живої системи проявляється на інтегральних показниках.

Реалізується реакція взаємодії в окремих органах (рівень 1). Спочатку стресовий сигнал сприймають диференційовані тканини, а за ними меристематичні (рівень 2). У відповідь на нього в клітинах тканини модифікується метаболізм відповідно до створеної ситуації (рівень 3). При цьому модифікації відповідають збереженню функціонального напрямлення тканини. Далі процес спрямовується у зворотному напрямку по всьому організму, що супроводжується подальшими адаптаціями, характерними для конкретної тканини (органу). При цьому підтримувалась кооперативна дія всіх органів, оскільки спостерігали процес морфогенезу на рівні інтактноі рослини.

Про активне функціонування диференційованих клітин може свідчити динаміка накопичення/використання вільного проліну, на яку також звертали увагу раніше.

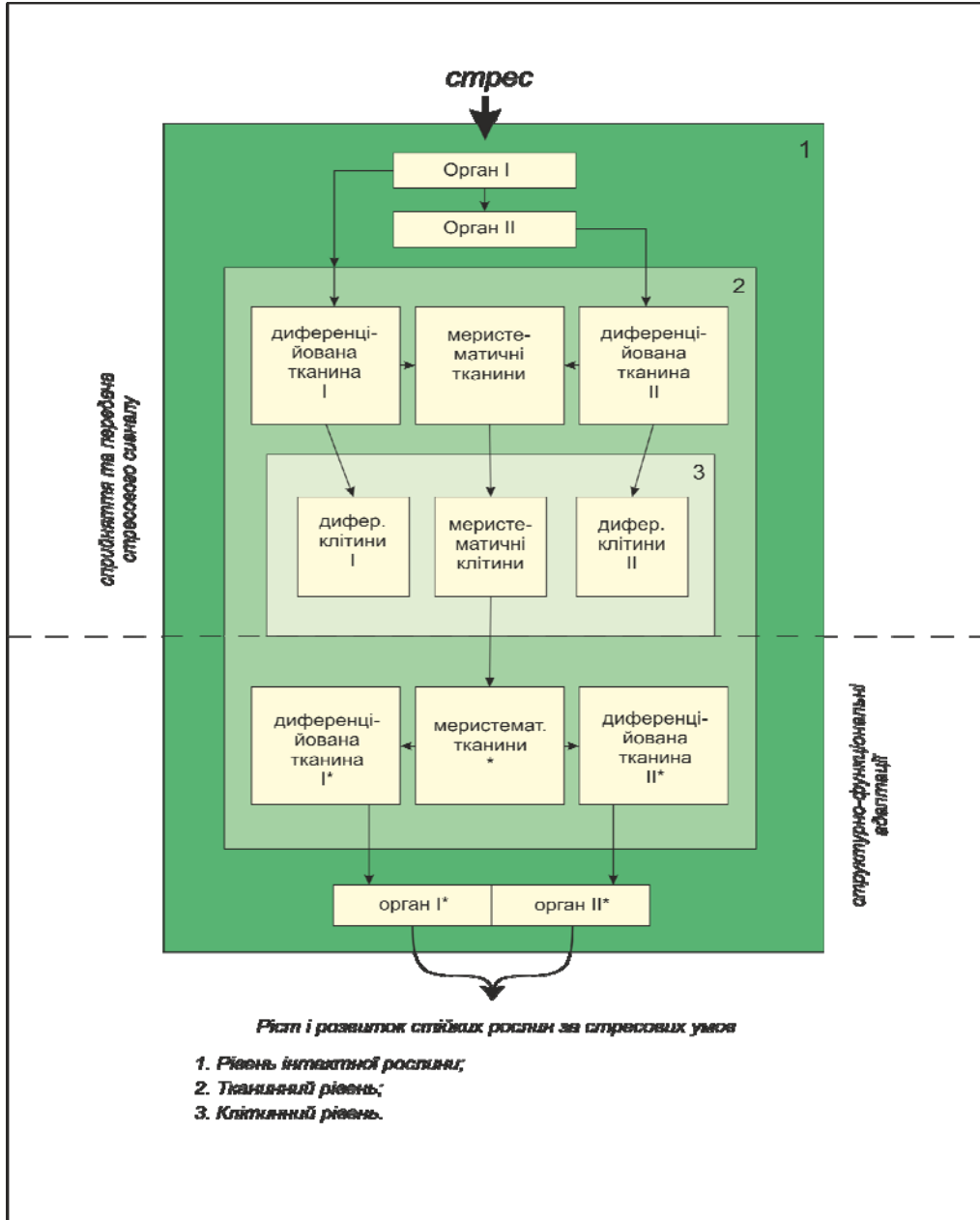
Таким чином, зрозуміло, що на рівні цілісної рослини (стійкого генотипу) паралельно реалізуються і «клітинні», і загальні механізми стійкості. В основі «клітинної» стійкості задіяні ті самі генетичні детермінанти, котрі забезпечували стійкість клітинної культури при стресі.

Отже, на рівні цілісної рослини (аналогічно клітинній культурі) можна спостерігати результат диференційної експресії певних генів. У той же час спостерігається і відмінність.

Якщо стійкість клітинної культури забезпечувалася часовою експресією генів, то в рослини переважним фактором стійкості була просторова, пов'язана



із типом тканини, експресія генів. Така диференційна експресія підтримувала життєдіяльність всіх органів і тканин стійких рослин за стресових умов.



**Рис. 4.** Схема функціонування стійкості рослини за стресових умов

Реакції на абіотичні стреси, а особливо реакції стійкості, включають комплекс варіабельних механізмів толерантності, котрі інтегрують чисельні гени. Ці гени кодують протеїни, а також протеїни із невідомими на даний час функціями. Посттранскрипційний та посттрансляційний контролю стрес-індукованої експресії генів установлені як такі, що відіграють головну роль у

регуляції «стресової» поведінки генотипів рослин. Процеси фосфорилування/дефосфорилування також важливі у реакціях на стрес. Контроль над стрес-модульованою експресією генів на рівні деградації протеїнів також встановлено.

### Висновки

Таким чином, клітинна селекція із залученням ІВМ може бути адекватним методом відбору рослинних форм із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів. Система стійка клітинна лінія – стійка рослина проявляється у всіх складових системи і підтримується реалізацією прямих і перехресних зв'язків на всіх рівнях організації рослинного організму. Стійкість системи за стресових умов підтримується як за умов постійного стресового навантаження, так і у випадку змін зовнішнього фону. Маркером стійкості покращеної рослинної форми найбільш виразними є динамічні показники, такі як пролін. Розвиток одноклітинної популяції (стійка клітинна культура) та багатоклітинного організму за стресових умов є результатом диференційної експресії генів.

### Бібліографічні посилання

1. [Андрющенко В. К., Саянова В. В., Жученко А. А. и др.](#) Модификация метода определения пролина для выделения засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tomn.* Известия академии наук Молдавской ССР. Серия биологических и химических наук. 1981. 4. С. 55–60.
2. [Герасимова С. В., Колодяжная Я. С., Титов С. Е., Романова А. В., Ковель В. С. и др.](#) Трансформанты табака, экспрессирующие ДНК, орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*. Генетика. 2010. 46. 7. С. 1000–1003.
3. [Дубровна О. В., Прядкіна Г. О., Михальська С. І., Комісаренко А. Г.](#) Фізіолого-біохімічні характеристики трансгенних рослин озимої пшениці з надекспресією гена орнітин – Δ – амінотрансферази. Фізіологія рослин і генетика. 2023. 55. 1. С. 58–73.
4. [Колупаев Ю. Е., Вайнер А. А., Ястреб Т. О.](#) Пролін: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 2014. 2. 32. С. 6–22.
5. [Колупаев Е. Ю., Кокорев О. И.](#) Участие полиаминов в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза растений. Вісник Харківського національного університету. Серія Біологія. 2019. 1. 46. С. 6–22.
6. [Лихолат Ю. В.](#) Еколого-фізіологічні основи формування дернових покривів в умовах степової зони України (стійкість, динаміка, техногенез): Автореф. дис... д-ра біол. наук: 03.00.16 / Чернівецький національний ун-т ім. Юрія Федьковича. Чернівці, 2003. 40 с.
7. [Лихолат Ю. В., Григорюк І. П.](#) Використання дерноутворюючих трав для діагностики рівня забруднення навколишнього середовища важкими металами. Доповіді Національної академії наук України. К., 2005. № 8. С. 196–200.
8. [Моргун Б. В., Тищенко Е. Н.](#) Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. Монография. 2014. 221 с.
9. [Савосько В., Лихолат Ю., Домшина К., Лихолат Т.](#) Екологічна та геологічна зумовленість поширення дерев і чагарників на девастованих землях Криворіжжя. Journal of Geology, Geography and Geocology. 2018. 27, 1. С. 116–130.

10. **Сергеева Л. Е., Михальская С. И., Комисаренко А. Г.** Современные биотехнологии повышения устойчивости растений к осмотическим стрессам. Монография. Киев. 2019. 164 с.
11. **Сергеева Л. Е., Михальська С. І., Комісаренко А. Г., Броннікова Л. І., Тищенко О. М.** Патент на корисну модель № 63611. Спосіб оцінки морфогенетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендogenousного проліну. 2011. Бюлетень 21.
12. **Сергеева Л. Е.** Изменения культур клеток под действием стресса. Монография. Киев. 2001. 100 с.
13. **Сидоров В.** Биотехнология растений. Клеточная селекция. Монография. Киев. 1990. 280 с.
14. **Тищенко Е. Н., Дубровная О. В.** Эпигенетическая регуляция. Метелирование ДНК генов. Монография. Киев. 2004. 236 с.
15. **Шиленков А. В., Мазей Н. Г., Нефедьева Е. Э. Хрянин В. Н.** Содержание пролина в прорастающих семенах гречихи и их качество при действии импульсивного давления и пониженных температур. Сельскохозяйственная биология. Серия Биология растений. 2008. 5. С. 70–77.
16. **Ahmed S., Roy S. K., Woo S. H., Sonawane D., Shohael A. M.** [Effect of salinity on the morphological, physiological and biochemical properties of lettuce \(\*Lactuca sativa\* L.\) in Bangladesh. Open Agriculture. 2022. 4. P. 361–373.](#)
17. **Angulo-Bezaran P. I., Puente-Rivera J., Cruz-Ortega R.** [Metal and metalloid toxicity in plants: an overview on molecular aspects. Planta. 2021. 10\(4\). 635.](#)
18. **Aziz M. A., Sabeem M., Mullath S. K., Brini F., Masmodi K.** [Plant group II LEA proteins: intrinsically disordered structure for multiple function in response to environmental stress. Biomolecules. 2021. 11, 1662, 27 p.](#)
19. **Asare M. O., Szakova J., Tlustoš P.** [The fate of secondary metabolites in plants growing on Cd-, As-, and Pb-contaminated soil – a comprehensive review. Environmental science and pollution research. 2023. 30. P. 11378–11398.](#)
20. **Bapat V. A., KaviKishor P. B., Jalaja N., Jain S. M., Penna S.** [Plant cell cultures: biofactories for the production of bioactive compounds. Agronomy. 2023. 13\(3\), 857.](#)
21. **Bull T., Michelmore R.** [Molecular determinants of \*in vitro\* plant regeneration: prospect for enhanced manipulation of Lettuce \(\*Lactuca sativa\* L.\). Front. Plant Sci. 2022. 13. P. 1–32.](#)
22. **Carcia Grajeda B. A., Solo Acosta S. G., Guevara H. P., Diaz-Garcia M. E., Enriquez A. C., Campos-Gaxida J. J.** [Selective and colorimetric of Ba<sup>2+</sup> ion aqueous solution using 11 – mercaptoundeling gold nanoparticles. 2017. RSC Advances. 7, 31611. P. 1–8.](#)
23. **Chen C., Cui X., Zhang P., Wang Z., Zhang J.** [Expression of pyrroline – 5 – carboxylate reductase \(P5CR\) gene from the wild grapevine \*Vitis eshanensis\* promotes drought resistance in transgenic \*Arabidopsis\*. Plant Physiology and Biochemistry. 2021. 168. P. 188–201.](#)
24. **Colin I., Ruhnnow F., Zhu L.-K., Zhao Y., Person S.** [The cell biology of primary cell walls during salt stress. The plant cell. 2023. 35\(1\). P. 201–207.](#)
25. **Dragwidge J. M., Ford B. A., Ashnest J. R., Gendall A.** [Two endosomal NIX – type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter are involved in auxin – mediated development in \*Arabidopsis thaliana\*. Plant Cell Physiology. 2018. 59\(8\). P. 1660–1669.](#)

26. [Fu Z., Ciaris F., Feldman A. F., Gentine P., Makowski D., Colin Prentice I., Story P. C. Critical soil moisture thresholds of plants water stress in terrestrial ecosystem. Science advance J. 2022. 8\(44\). 1–31.](#)
27. [Ghosh U. K., Iglam M. N., Cao X., Khan M. A. R. Proline a multifaced signaling molecule in plant respances to abiotic stress: inderlling the physiological mechanisms. Plant Biology. 2022. 24. 2. P. 227–239.](#)
28. [Haider F. U., Ligun C., Coulter J. A., Cheema S. A., Wu J., Farooq M. Cadmium toxicity in plants: impacts and remediation. Ecotoxicology and environmental safety. 2021. 211\(15\). 111887.](#)
29. [Hosseinifard M., Srefanian S., Javid M. G., Waztyla E., Garnezarska M. Contribution of exogenous prolie to aniotic stresses tolerance in plants: a review. Int. J. Mol. Sci. 2022. 23\(9\), 5186.](#)
30. [He M., He C.-O., Ding N.-Z. Abiotic stresses: general defeaces for engineering multistress tolerance. Front. Plant Sci., 2018. 9.](#)
31. [Imran O. M., Falak N., Hussan A., Man B.-G., Yun B.-W. Abiotic stress biotechnological tools in stress respontnce. J. Agronomy. 2021. 11\(8\). 15–79.](#)
32. [Mansour M. M., Ali E. F. Evaluation of proline functions in saline conditions. Phytochemistry. 2017. 140. P. 52–68.](#)
33. [Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. Ann.Rev. Plant Physiol. 1984. 35. 519–542.](#)
34. [Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Andleeb Z., et al. Regulation of L – proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role inplants during variable environment conditions. Halion. 2019. 5. 12. 02952.](#)
35. [Niron Y., Barlas N., Salin B., Türet M. Comparative transcriptome, metabolom and ionomeanalysis of two comprasting common bean genotypes in Saline conolition. Flant. Plant Sci. 2022. 11.](#)
36. [Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962. 15. 473–497.](#)
37. [Norouzi O., Hesami M., Pepe M., Duta A., Jones A. M. P. In vitro plant culture as the fifth generation of bioenergy. Scientific Reports. 2022. 12. 5038–5054.](#)
38. [Ribaritz A., Abdulaev A., Tashpulalol A. et al. Two tobaccoproline dehydrogenases are differentionally regulated and play a role in early plant development. Plant. 2007. 225. 1313–1324.](#)
39. [Savosko V., Bielyk Y., Lykholat Y., Heilmeier H., Grygoryuk I., Khromykh N., Lykholat T. The total content of macronutrients and heavy metals in the soil on devastated lands at Kryvyi Rih Iron Mining & Metallurgical District \(Ukraine\). Journal of Geology, Geography and Geocology. 2021. 30, 1. 153–164.](#)
40. [Savosko V., Komarova I., Lykholat Y., Yevtushenko E., Lykholat T. Predictive model of heavy metals inputs to soil at Kryvyi Rih District and its use in the training for specialists in the field of Biology. Journal of Physics Conference Series 2021. 1840: 012011.](#)
41. [Sharma S., Vershlues P. E. Mechanisms independent of abscisic acid \(ABA\) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. Plant Cell Envir. 2010. 3. 1. P. 1838–1851.](#)
42. [Verslues P. E., Bray E. A. LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation adjustment in \*Arabidopsis\*. Plant Physiol. 2004. 134. P. 2831–2842.](#)

43. [Wu L., Wang L., Hui W., Zhao F., Wang P., Su C., Gong W.](#) Physiology of plant responses to water stress and related genes: a review. *Journal Forests*. 2022. 13(2), 324.
44. [Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Zhang W., et al.](#) Over – expression of an *Arabidopsis*  $\delta$  – OAT gene enhances salt and drouht tolerance in transgenic rice Chinese. *Science Bulletin*. 2003. 48. 23. P. 2594–2600.

*Надійшла до редколегії 18.09.2024 р.*