

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.01.050>

УДК 602.6:635.21:58.03

**О.О. Овчаренко**, <https://orcid.org/0000-0003-4874-5258>

**В.А. Рудас**, <https://orcid.org/0000-0001-5643-1406>

**Н.Л. Щербак**, <https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

**О.М. Кищенко**, <https://orcid.org/0000-0003-4768-2822>

**Б.В. Моргун**, <https://orcid.org/0000-0001-7041-6894>

**М.В. Кучук**, <https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

E-mail: [ovcharenkooo77@gmail.com](mailto:ovcharenkooo77@gmail.com)

## Ефективний метод генетичної трансформації картоплі та створення *in vitro* колекції її сортів з генами, що підвищують стійкість до абіотичних і біотичних стресів

Представлена академіком НАН України В.В. Швартау

Сьогодні різноманітні сільськогосподарські види рослин зазнають впливу численних стресових факторів довкілля — засолення, посухи, екстремальних температур, дефіциту або надлишку мінеральних речовин тощо. Картопля (*Solanum tuberosum*) є важливою продовольчою, кормовою та технічною культурою в Україні й усьому світі. Поліплоїдія культурного *Solanum tuberosum* є серйозною перешкодою в його селекції. Порівняно з традиційною селекцією генетична інженерія має певні переваги у підвищенні стійкості цієї культури до стресових впливів і дає змогу швидко створювати стійкі рослини на основі наявних комерційних сортів. Стратегії сталого виробництва потребують оптимізації чинних протоколів трансформації картоплі та перенесення генів, що підвищують стійкість до стресів, є актуальними і становлять мету дослідження. Гени двох ізоформ вакуолярного  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортера з ячменю (*HvNHX2* і *HvNHX3*) сприяють підвищенню стійкості до посухи, засолення та залуження ґрунту. Короткий антисенсовий сегмент гена проліндегідрогенази (*PDH ex1*) з *Arabidopsis thaliana* завдяки частковому пригніченню гена *PDH* знижує активність цього ферменту, що зумовлює підвищення вмісту проліну і стійкості трансгенних рослин до посухи, холоду, важких металів та засолення. Ген цитохрому P450 з кори наднирників великої рогатої худоби (*CYP11A1*) підвищує врожайність і стійкість до фітопатогенних грибів. Гени екстраклітинної РНКаз

Ц и т у в а н н я: Овчаренко О.О., Рудас В.А., Щербак Н.Л., Кищенко О.М., Моргун Б.В., Кучук М.В. Ефективний метод генетичної трансформації картоплі та створення *in vitro* колекції її сортів з генами, що підвищують стійкість до абіотичних і біотичних стресів. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2026. № 1. С. 50—61. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.01.050>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2026. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

цинні (*ZRNase*) та панкреатичної РНКазы бика (*bov*) підвищують стійкість рослин до вірусних інфекцій. Комерційні сорти картоплі було трансформовано за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* з використанням векторів зі згаданими вище генами. Отримана колекція трансгенних ліній картоплі є цінним матеріалом для подальшого дослідження стресостійкості і дає змогу порівняти вплив різних чужорідних генів на основі низки комерційних сортів.

**Ключові слова:** генетична інженерія, *Agrobacterium tumefaciens*, *Solanum tuberosum*, гетерологічні гени.

**Вступ.** Підвищення стійкості сільськогосподарських рослин до різноманітних стресових факторів довкілля, зокрема до засолення, посухи, екстремальних температур, нестачі або надлишку поживних речовин, зараження фітопатогенами, є надзвичайно актуальним, оскільки ситуація погіршується у зв'язку зі змінами клімату. Картопля (*Solanum tuberosum*) — важлива харчова, технічна та кормова культура як в Україні, так і в цілому світі. Поліплоїдія сучасних сортів картоплі створює певні складнощі у разі використання традиційних методів генетики та селекції у випадках, коли потрібно перенести лише окремі гени стійкості. Методи генетичної інженерії дають змогу швидко отримати рослини, стійкі до несприятливих факторів, на основі вже наявних цінних комерційних сортів. Попри численні дослідження з генетичної трансформації картоплі отримання трансгенних рослин комерційно важливих сортів цієї культури досі не є рутинною процедурою [1—3]. Для генетичної трансформації переважно використовували сорти картоплі Atlantic, Desiree, Superior, Taedong Valley, які можна вважати модельними [4]. Отже, проблему створення трансгенних ліній на базі комерційних сортів, вирощування яких є актуальним в Україні, досі не вирішено.

Методом генетичної інженерії можна переносити гени стійкості до стресових факторів, які були клоновані з філогенетично віддалених організмів, і у такий спосіб використовувати пул генів, недоступних за природних умов схрещування. Під час створення рослин, стійких до стресів, може бути корисним застосування не лише генів рослинного походження, але й генів, що належать тваринам, грибам або навіть прокариотам [5—10]. Наразі є велика потреба у розробленні надійної методики генетичної трансформації картоплі, створенні колекції трансгенних рослин з генами стресостійкості та їх дослідженні. Саме перенесення гетерологічних генів стресостійкості та дослідження їх функціонування відкриває можливості нових біостратегій для сталого виробництва.

**Метою** дослідження було отримати трансгенні рослини різних сортів картоплі з генами, що підвищують стійкість до біотичних і абіотичних стресових факторів.

**Матеріали і методи.** *Рослинний матеріал.* В експериментах використовували асептичні рослини картоплі сортів Слов'янка, Ласунок, Лугівська та Дезіре з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Рослини вирощували в пробірках з агаризованим живильним середовищем Мурасіге—Скуга (MS) [11] за температури 22—24 °С та 16-годинного світлового періоду. Період субкультивування рослин становив 3—4 тижні.

*Трансформація картоплі за допомогою Agrobacterium tumefaciens.* Як експланти для генетичної трансформації картоплі використано міжвузля асептичних рослин, вирощених *in vitro*. На експлантах міжвузлів асептичних рослин картоплі завдовжки 5—7 мм робили чотири—п'ять поперечних насічок і переносили на агаризоване живильне середовище MS із додаванням 2 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л БАП за температури 23 °С на розсіяне світло на 4—5 діб. Після чого проводили генетичну трансформацію шляхом кокультивації з *Agrobacterium tumefaciens*. Перелік штамів *A. tumefaciens*, векторів, цільових та селективних

**Таблиця 1. Штами агробактерії, плазмідні та гетерологічні гени, використані для трансформації картоплі**

Штам <i>A. tumefaciens</i>	Вектор	Цільовий ген	Селективний ген	Посилання
<i>AGL0</i>	<i>pBI-HvNHX2</i>	<i>HvNHX2</i>	<i>nptII</i>	12
<i>AGL0</i>	<i>pCambia-HvNHX3</i>	<i>HvNHX3</i>	<i>nptII</i>	13
<i>LBA 4404</i>	<i>pBi2E</i>	<i>PDH ex1</i>	<i>nptII</i>	7
<i>GV2260</i>	<i>pC27bov</i>	<i>bov</i>	<i>nptII</i>	14
<i>AGL0</i>	<i>pbi-RNS</i>	<i>ZRNase II</i>	<i>nptII</i>	15
<i>GV3101</i>	<i>pCB093</i>	<i>cyp11A1</i>	<i>bar</i>	6
<i>GV3101</i>	<i>pbNIS</i>	<i>desA</i>	<i>nptII</i>	16

**Таблиця 2. Праймери, використані в реакціях полімеразної ланцюгової активності для доведення наявності гетерологічних генів**

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагмента, п. н.
<i>nptII</i>	5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' 5'-CTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3'	622
<i>nptII</i>	5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3' 5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3'	840
<i>bar</i>	5'-GGAATTCATGAGCGGAGA ATTAAGGGAGT-3' 5'-CAG ATC TCG GTGACG GGC AGG AC-3'	911
<i>bar</i>	5'-GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC-3' 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3'	494
<i>HvNHX2</i>	5'-CTCATGGCWTTACCTTTCRTATATG-3' 5'-CCTCTCATSAGMCCWGGCCACCA-3'	450
<i>HvNHX3</i>	5'-GCCTCGCTGGAATCAGTA-3' 5'-GGGCTTCTCAGTGCTTATG-3'	640
<i>PDH ex1</i>	5'-AACAAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' 5'-GAGATGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3'	545
<i>bov</i>	5'-ATCATGGCTCTGAAGTCCC-3' 5'-CCTACACTGAAGCATCAAAG-3'	456
<i>ZRNase II</i>	5'-ACACTCGAGCACACAAACATGAAGA-3' 5'-GAATCTAGAAATTTAGAATGAAGGA-3'	720
<i>cyp11A1</i>	5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3'	502
<i>desA</i>	5'-GTTGACACCAACGGTAACGCC-3' 5'-CCAGTTAAAGGTGCGCTCGTAA-3'	949
<i>virD</i>	5'-ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA-3' 5'-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3'	432

генів, які вони містили, використаних для трансформації картоплі в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, наведено у табл. 1.

Агробактерії, які були вирощені в рідкому середовищі Лурія—Бертані (LB) [17] протягом 2 діб, осаджували в стерильних центрифугальних пробірках за обертової частоти 5000 об/хв, а потім ресуспендували розчином, який містив 10 мМ  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  та 0,2 М ацетосирингону, обробляли експланти та інкубували протягом 2 діб на розсіяному світлі, після чого їх переносили на регенераційне середовище МСР (MS з 25 г/л цукрози, 1 мг/л зеатину і 2 мг/л гіберелової кислоти), яке містило 600 мг/л цефотаксиму та 100 мг/л канаміцинсульфату або 5 мг/л фосфіотрицину, залежно від використовуваної генетичної конструкції. Кожні 14 діб експланти пересаджували на свіже середовище МСР.

Стійкі пагони, що утворювалися, відсікали і переносили на безгормональне середовище MS з додаванням 100 мг/л цефотаксиму та 100 мг/л канаміцинсульфату або 5 мг/л фосфіотрицину для вкорінення.

*Аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).* Для доведення наявності перенесених генів у отриманих рослин картоплі, стійких до канаміцину, аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану з листової тканини. ДНК виділяли за методикою [18]. Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК відповідного вектора. Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 мМ Трис-НСl, рН 9,0, 1,5 мМ  $MgCl_2$ , 50 мМ КСl, 0,01 % Тритон Х-100), по 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 од. Таq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Реакцію ампліфікації проводили з використанням праймерів, наведених у табл. 2.

**Результати і обговорення.** Сорти Слов'янка, Ласунак, Луговський та Дезіре вибрано, оскільки вони є комерційно цінними і, за нашими попередніми даними, міжвузля асептичних рослин цих сортів мають достатньо високу регенераційну здатність.

Для перенесення генів у рослини за допомогою *Agrobacterium* експланти повинні містити клітини, здатні не тільки до регенерації, а й до генетичної трансформації бактеріями. Для високої ефективності трансформації насамперед необхідно використовувати експланти з високим регенераційним потенціалом. Тому для трансформації картоплі як експланти ми використовували міжвузля. Регенерація адвентивних пагонів відбувається з клітин, які глибоко розташовані і тому недоступні для агробактерій, якщо стебло інтактне. Нанесення насічок на експланти сприяє проникненню агробактерії до клітин, які придатні для отримання трансгенних пагонів, і збільшенню потенційної площі регенерації.

Важливе значення для агробактеріальної трансформації та регенерації трансгенних пагонів картоплі має стадія калусоутворення під час прекультивування експлантів на живильному середовищі перед співкультивуванням з *Agrobacterium*. За відсутності цієї стадії регенерація трансгенних пагонів практично не відбувається.

У результаті вирощування на середовищі із селективним агентом після співкультивування з *Agrobacterium* отримано стійкі до селективного агента регенеранти таких сортів: Слов'янка (частота регенерації стійких пагонів 4—28 % залежно від використаної генетичної конструкції та штаму *Agrobacterium*), Ласунак (4—20 %), Лугівська (4—32 %), Дезіре (16—20 %). За селективних умов культивування необроблених *Agrobacterium* експлантів регенерації стійких калюсів та пагонів не відбувалося, а нетрансгенні контрольні пагони гинули на середовищі із селективним агентом (рис. 1).

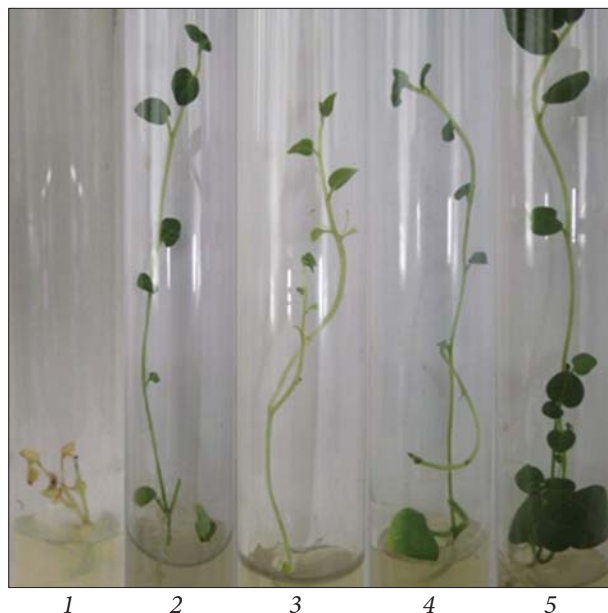
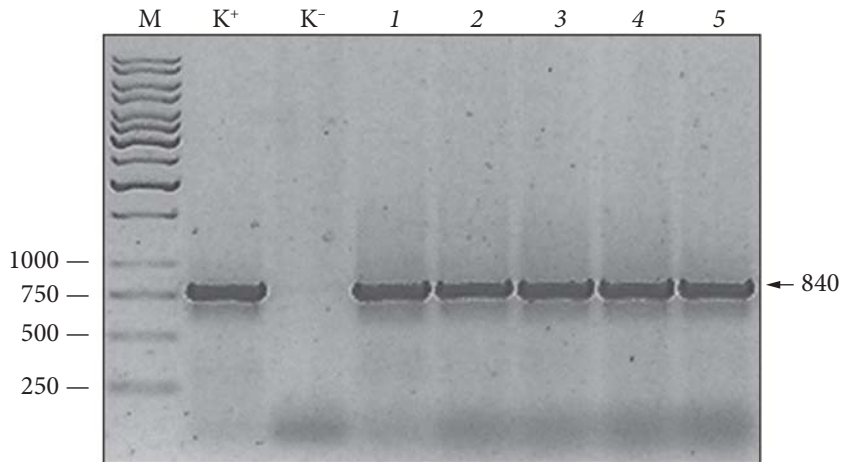


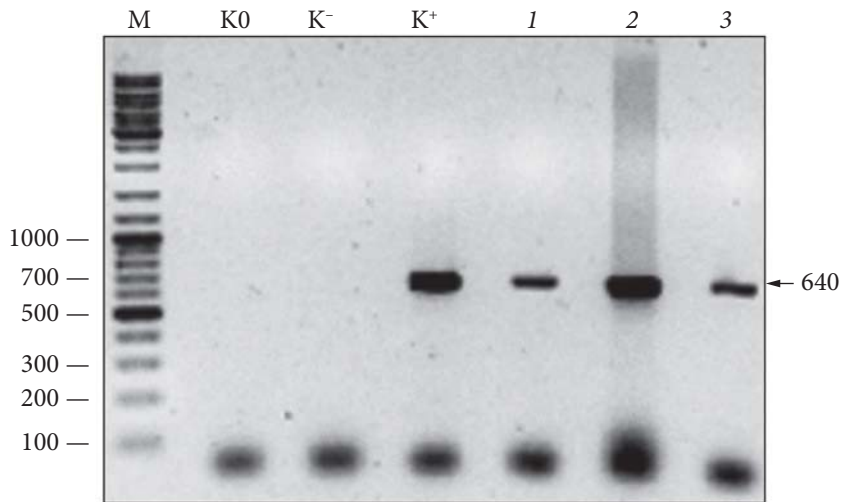
Рис. 1. Регенеранти картоплі сорту Слов'янка, трансформовані *pCambia-HvNHX3*. 1 — негативний контроль (нетрансгенна картопля в умовах селекції); 2—4 — стійкі трансгенні рослини в умовах селекції; 5 — позитивний контроль (без селективного агента)

Стійкі вкорінені пагони, що формували рослини, аналізували за допомогою ПЛР. Завдяки використанню специфічних праймерів ми підтвердили наявність як селективних, так і цільових генів у всіх отриманих стійких рослинах (рис. 2, 3). Ампліфікація ДНК отриманих рослин з праймерами до гена *virD* не відбувалася, що свідчить про відсутність забруднення рослинного матеріалу *Agrobacterium* і підтверджує, що ген був присутній не у вигляді плазмідної ДНК, а інтегрувався в геном рослин. У цій статті ми не наводимо всі отримані результати ПЛР, але з електрофореграмами, що демонструють продукти ампліфікації із праймерами до генів *bar*, *cup11A1*, *desA*, *PDH ex1*, *bov*, *ZRNase II*, можна ознайомитися детальніше в раніше опублікованих роботах [8, 19—21]. Нами загалом відібрано 7 незалежних трансгенних ліній різних сортів із геном *HvNHX2*, 11 ліній з геном *HvNHX3*, 9 ліній з геном *bov*, 18 ліній з геном *ZRNase II*, 8 ліній з геном *cup11A1*, 11 ліній з геном *PDH ex1* та 19 ліній з геном *desA*. Так було закладено унікальну колекцію трансгенної картоплі з генами стійкості до біотичних та абіотичних стресових факторів.

Зазначені вище гени, які клоновано з різних організмів, обумовлюють різні стратегії захисту рослин від стресових факторів. Так, *CYP11A1*, що міститься лише у хребетних тварин, каталізує перший етап стероїдогенезу, де холестерин перетворюється на прегненолон. Очищений фермент також перетворює десмоesterol та рослинні стероли, зокрема кампестерол та  $\beta$ -ситостерол, на прегненолон. Дослідження з очищеним ферментом показують, що 7-дегідрохолестерин (7ДНС), ергостерол, люмістерол 3 та вітаміни  $D_3$  та  $D_2$  також слугують субстратами для *CYP11A1*, причому 7ДНС є кращим, а вітаміни  $D_3$  та  $D_2$  — біднішими субстратами, ніж холестерин [22]. У роботах Л.О. Сахно з колегами показано позитивний вплив експресії цього гена на накопичення біомаси, швидкість проростання насіння, склад ліпідів і, як наслідок, термотолерантність у рослин ріпаку [6, 23—25]. У нашому дослідженні з перенесення гена *cup11A1* у рослини картоплі показано не лише перенесення та інтеграцію цього гетерологічного гена у рослинний геном, але і його успішну експресію завдяки методиці ЗТ-ПЛР. Прояв експресії гена *cup11A1* великої рогатої худоби



**Рис. 2.** Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до гена неоміцинфосфаттрансферази *npt II*: М — маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix;  $K^+$  — позитивний контроль (наявність гена в геномній ДНК рослини);  $K^-$  — негативний контроль (рослина дикого типу); 1—5 — ДНК стійких до селективного агента рослин, отриманих у результаті співкультивування з *Agrobacterium*



**Рис. 3.** Електрофореграма продуктів ПЛР на ген третьої ізоформи  $Na^+/H^+$ -вакуолярного антипортера (*HvNHX3*): М — маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix;  $K0$  — негативний контроль (ТЕ-буфер);  $K^-$  — негативний контроль (нетрансформована рослина сорту Ласунак);  $K^+$  — позитивний контроль (плазмідна ДНК виділена з *Agrobacterium tumefaciens*); 1—3 — трансформовані рослини сорту Ласунак

у трансгенному ріпаку такий самий, як і гетерологічна надмірна експресія гена супероксиддисмутази. Рослини, що експресують ген *sup11A1*, можуть бути стійкими до багатьох стресових умов як абіотичного, так і біотичного походження [6].

Використані гени, що кодують 2-гу і 3-тю ізоформи  $Na^+/H^+$ -вакуолярного антипортера, ізольованого з ячменю (*Hordeum vulgare*), можуть надавати стійкість до засолення. Ген 2-ї ізоформи кодує білок *HvNHX2*, який складається з 546 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 59,6 кДа [26]. Ген 3-ї ізоформи  $Na^+/H^+$ -вакуолярного антипортера

кодує продукт (HvNHX3), що складається з 540 амінокислотних залишків [27]. Білкові продукти обох генів містяться в тонопласті (мембрані вакуолі) і здійснюють переміщення іонів  $\text{Na}^+$  у вакуолю з цитоплазми, чим досягається зменшення концентрації іонів  $\text{Na}^+$  у цитоплазмі. У результаті знижується токсична дія натрію і він набуває властивості бути осмотично активною речовиною [12, 28]. Отже, експресія цих генів корисна для підвищення толерантності картоплі до підвищеного вмісту натрію в ґрунті за умов вирощування на солончаках [13].

Показано що ген *PDH ex1*, який кодує антисенсну послідовність проліндегідрогенази, впливає на метаболізм проліну, інгібуючи фермент, який каталізує деградацію проліну, що призводить до накопичення цього осмотика. Виявлено позитивний вплив експресії цього гена за модельованого на манітолі осмотичного стресу у соняшника [7]. Отримані нами рослини картоплі з цим геном мають потенціал стійкості до посухи та засолення і потребують подальшого вивчення [29].

З розширенням уявлення про роль РНКаз у захисті рослин від вірусних інфекцій було започатковано новий напрямок створення стійких трансгенних рослин, що містять гени гетерологічних РНКаз. Розпочато дослідження зі створення трансгенних ліній рослин з гетерологічними генами РНКаз, клонованими з організмів різного філогенетичного походження. Розглядаючи варіанти використання генів РНКаз, отриманих із різних видів, необхідно зазначити, що цікавим напрямом є використання власне рослинних РНКаз. Рибонуклеазу, ген якої починає експресуватися у відповідь на поранення, виявлено в *Zinnia elegans* [30]. У подальшому клонований ген, що отримав назву *ZRNase II*, показав здатність підвищувати стійкість рослин до вірусів [8, 15, 21]. Гіпотетичний механізм противірусної дії позаклітинної РНКаз цинії може полягати в пошкодженні геномної РНК вірусів на певних етапах їх проникнення в рослинну клітину та запусканні механізму апоптозу в пошкодженій клітині. Порушення цілісності тканин, коли вміст апопласта може проникати в цитоплазму пошкоджених клітин, призводить до того, що активні РНКазі спрацьовують як білки-“кілери” і перешкоджають реплікації геномної РНК вірусу, що потрапив у неї, й ускладнюють подальше системне ураження рослини [9]. З досліджених нами генів рибонуклеаз *ZRNase II* та *bov* саме РНКаз цинії надавала кращий противірусний захист трансгенним рослинам картоплі [8].

Гетерологічний ген *desA* з ціанобактерій *Synechocystis* sp. PCC6803 змінює склад ліпідів клітинної мембрани у трансформованої рослини, внаслідок чого збільшується кількість ненасичених зв'язків у ненасичених жирних кислотах [16]. У рослин картоплі з цим геном підвищується стійкість до гіперосмотичного стресу, модельованого за допомогою манітолу. Такі рослини *S. tuberosum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3*, також мають вищу стійкість до холоду завдяки збільшенню частки ненасичених жирних кислот [31].

У результаті проведених досліджень підібрано методику генетичної трансформації картоплі, придатну для використання не лише на модельних, але й на промислових сортах з метою розроблення новітніх біостратегій для сталого виробництва цієї культури в сучасних умовах під тиском абіотичних та біотичних стресів. Створено колекцію рослин картоплі з гетерологічними генами стійкості до стресів, яка може бути використана як для дослідження впливу цих генів на рослини та їх безпеку, так і в подальшому як цінне джерело цих генів для потреб селекції. Вступ у дію у 2026 р. Закону України “Про державне

регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції” [32] уможливило польові дослідження отриманої колекції картоплі з гетерологічними генами стресостійкості.

**Висновки.** Отримано низку ліній трансгенних рослин картоплі різних сортів із гетерологічними генами стійкості до абіотичних та біотичних стресових факторів. Генетичні трансформанти з деякими з цих генів досліджено *in vitro* і в умовах теплиці, де вони показали підвищену стійкість до стресорів. Отримані лінії потребують подальших польових випробувань і можуть бути використані в селекційних програмах.

Робота виконана за державної фінансової підтримки за бюджетними темами: III-1-20 “Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах”, III-5-22 “Механізми стресової адаптації та створення стійких ліній рослин методами генетичної інженерії”, III-5-25 “Біотехнології для підвищення стресостійкості рослинних систем та їх використання для фіторемерації”, відомчої теми НАН України (держреєстрація № 0123U100462), III-1-25 “Фізіолого-генетична та епігенетична складові функціонування гетерологічних генів в біотехнологічних рослинних системах”, 12-30 — II-1-25 “Біотехнологічні рослини для боротьби з інфекційними бактеріальними захворюваннями та фітодеструкції речовин-забруднювачів мілітарного походження”.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Vinterhalter D., Zdravković-Korać S., Mitić N., Dragičević I., Cingel A., Raspor M., Ninković S. Protocols for *Agrobacterium*-mediated transformation of potato. *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotechnol.* 2008. 2, Spec. Iss. 1: PotatoI. P. 1—15. URL: [https://www.researchgate.net/publication/328732619\\_Protocols\\_for\\_Agrobacterium\\_mediated\\_transformation\\_of\\_potato](https://www.researchgate.net/publication/328732619_Protocols_for_Agrobacterium_mediated_transformation_of_potato). (Дата звернення 24.11.2025).
2. del Mar Martínez-Prada M., Curtin S.J., Gutiérrez-González J.J. Potato improvement through genetic engineering. *GM Crops Food.* 2021. 12, № 1. P. 479—496. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1993688>
3. Rather G.A., Ayzenshtat D., Teper-Bamnlker P., Kumar M., Forotan Z., Eshel D., Bocobza S. Advances in protoplast transfection promote efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tetraploid potato. *Planta.* 2022. 256, № 1. 14. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03933-z>
4. Kikuchi A., Huynh H.D., Endo T., Watanabe K. Review of recent transgenic studies on abiotic stress tolerance and future molecular breeding in potato. *Breed. Sci.* 2015. 65, № 1. P. 85—102. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.85>
5. Sakhno L.O., Gerasymenko I.M., Komarnitsskii I.K., Sheludko Yu.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Creation of glyphosate-resistant *Brassica napus* L. plants expressing DesC desaturase of cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Biopolym. Cell.* 2012. 28, № 6. P. 449—455. <https://doi.org/10.7124/bc.000135>
6. Sakhno L.O., Slyvets M.S., Kuchuk M.V. *cyp11A1* Canola plants under short time heat stress conditions. *Cytol. Genet.* 2014. 48. P. 279—284. <https://doi.org/10.3103/S0095452714050090>
7. Tishchenko O.M., Komisarenko A.G., Mykhalska S.I. Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using *LBA4404* strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytol. Genet.* 2014. 48, № 4. P. 218—226. <https://doi.org/10.3103/S0095452714040094>
8. Potrokhov A., Sosnovska D., Ovcharenko O., Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk. J. Biol.* 2021. 45, № 1. P. 79—87. <https://doi.org/10.3906/biy-2007-87>
9. Potrokhov A.O., Ovcharenko O.O. Strategies for engineering of virus-resistant plants: focus on RNases. *Cytol. Genet.* 2024. 58. P. 99—114. <https://doi.org/10.3103/S0095452724020099>
10. Ovcharenko O., Zhlobak N., Rudas V., Kuchuk M. Plant systems as platforms for the production of interferon alpha and its application. *Cytol. Genet.* 2025. 59. P. 622—633. <https://doi.org/10.3103/S0095452725060088>

11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. **15**, № 3. P. 473—497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
12. Bayat F., Shiran B., Belyaev D.V. Overexpression of *HvNHX2*, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from barley, improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Crop Sci.* 2011. **5**, № 4. P. 428—432. URL: [https://www.cropj.com/bayat\\_5\\_4\\_2011\\_428\\_432.pdf](https://www.cropj.com/bayat_5_4_2011_428_432.pdf). (Дата звернення 22.11.2025).
13. Krivosheeva A.B., Varlamova T.V., Yurieva N.O., Sobol'kova G.I., Kholodova V.P., Belyaev D.V. Potato transformation with the *HvNHX3* gene and the improvement of transformant salt tolerance. *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. **61**. P. 792—800. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060119>
14. Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L., Scherban A.B., Shumny V.K., Polyakova A.M., Lapshina L.A., Kochetov A.V., Malinovsky V.I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Rep.* 2007. **26**, № 7. P. 1121—1126. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0298-z>
15. Trifonova E.A., Romanova A.V., Sangaev S.S., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biol. Plant.* 2012. **56**. P. 571—574. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0206-4>
16. Berdichevets I.N., Shimshilashvili H.R., Gerasymenko I.M., Sindarovska Y.R., Sheludko Yu.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. **397**, № 6. P. 2289—2293. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3770-0>
17. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1951. **62**, № 3. P. 293—300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
18. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990. **12**, № 1. P. 13—15.
19. Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргун Б.В., Матвеева Н.А., Кучук М.В. Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду Баства, що містять ген *сyр11А1* цитохрому P450<sub>scс</sub>. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2009. **7**. С. 192—196.
20. Кирпа-Несміян Т.М. Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах: дис. ... канд. біол. наук / Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Київ, 2017.
21. Ovcharenko O., Potrokhov A., Sosnovska D., Hoysyuk Yu., Yaroshko O., Shevchenko T., Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene. *JJBS.* 2023. **16**, № 4. P. 587—592 <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>
22. Slominski A.T., Li W., Kim T.-K., Semak I., J. Wang, Zjawiony J.K., Tuckey R.C. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.* 2015. **151**. P. 25—37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.010>
23. Sakhno L.O., Ostapchuk A.M., Klochko V.V., Kuchuk M.V. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450<sub>scс</sub> *сyр11А1* gene. *Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph-part III*. Toruń: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, 2011. P. 55—59.
24. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *сyр11А1* цитохрома P450<sub>scс</sub> животного происхождения. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2011. **9**, № 2. С. 253—259.
25. Sakhno L.O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering. *Biopolym. Cell.* 2013. **29**, № 6. P. 443—453. <https://doi.org/10.7124/bc.000838>
26. Vasekina A.V., Yershov P.V., Reshetova O.S., Tikhonova T.V., Lunin V.G., Babakov A.V. Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley: Identification and response to salt stress. *Biochemistry.* 2005. **70**. P. 100—107. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0057-8>
27. Roslyakova T.V., Lasareva E.M., Kononenko N.V., Babakov A.V. New isoform *HvNHX3* of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in barley: expression and immunolocalization. *Biochemistry.* 2009. **74**, № 5. P. 549—556. <https://doi.org/10.1134/s0006297909050101>
28. Jabeen Z., Irshad F., Hussain N., Han Y., Zhang G. NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression under different salt levels and allelic diversity of *HvNHX* in wild and cultivated barleys. *Front. Genet.* 2022. **12**. 809988. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.809988>
29. Овчаренко О.О., Рудас В.А., Щербак Н.Л., Кучук М.В. Отримання трансгенних рослин картоплі (*Solanum tuberosum* L.), що містять антизмістовну послідовність гена проліндегідрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. **22**. С. 299—304. <https://doi.org/10.7124/FEEO.V22.965>

30. Ye Z.-H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol. Biol.* 1996. **30**. P. 697—709. <https://doi.org/10.1007/BF00019005>.
31. Кирпа-Nesmiian T., Rudas V., Ovcharenko O., Osipenko V., Kharhota M., Kuchuk M. Studies on the adaptation of *Solanum tuberosum* plants expressing the *desA* gene to osmotic stress. 2nd *International Conference „Smart Bio“* (Kaunas, 03-05 May 2018). Kaunas, Lithuania, 2018. P. 72. URL: <http://icsb.vdu.lt/wp-content/uploads/2018/05/ABSTRACT-BOOK-ICSB-2018.pdf>. (Дата звернення 22.11.2025).
32. Закон України “Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції”. *Відомості Верховної Ради (ВВР)*. 2023. № 91, ст. 354. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3339-20#Text>. (Дата звернення 22.11.2025).

Надійшла до редакції 02.12.2025

## REFERENCES

1. Vinterhalter, D., Zdravković-Korać, S., Mitić, N., Dragičević, I., Cingel, A., Raspor, M. & Ninković, S. (2008). Protocols for *Agrobacterium*-mediated transformation of potato. *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech.*, 2, Spec. Iss. 1: Potato I, pp. 1-15. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/328732619\\_Protocols\\_for\\_Agrobacterium\\_mediated\\_transformation\\_of\\_potato](https://www.researchgate.net/publication/328732619_Protocols_for_Agrobacterium_mediated_transformation_of_potato)
2. del Mar Martínez-Prada, M., Curtin, S. J. & Gutiérrez-González, J. J. (2021). Potato improvement through genetic engineering. *GM Crops Food*, 12, No. 1, pp. 479-496. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1993688>
3. Rather, G. A., Ayzenshtat, D., Teper-Bamnlker, P., Kumar, M., Forotan, Z., Eshel, D. & Bocobza, S. (2022). Advances in protoplast transfection promote efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tetraploid potato. *Planta*, 256, No. 1, 14. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03933-z>
4. Kikuchi, A., Huynh, H. D., Endo, T. & Watanabe, K. (2015). Review of recent transgenic studies on abiotic stress tolerance and future molecular breeding in potato. *Breed. Sci.*, 65, No. 1, pp. 85-102. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.85>
5. Sakhno, L. O., Gerasymenko, I. M., Komarnitskii, I. K., Sheludko, Y. V. & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2012). Creation of glyphosate-resistant *Brassica napus* L. plants expressing DesC desaturase of cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Biopolym. Cell*, 28, No. 6, pp. 449-455. <https://doi.org/10.7124/bc.000135>
6. Sakhno, L. O., Slyvets, M. S. & Kuchuk, M. V. (2014) *cyp11A1* Canola plants under short time heat stress conditions. *Cytol. Genet.*, 48, pp. 279-284. <https://doi.org/10.3103/S0095452714050090>
7. Tishchenko, O. M., Komisarenko, A. G., Mykhalska, S. I., Sergeeva, L. E., Adamenko, N. I., Morgun, B. V. & Kochetov, A. V. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using LBA4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytol. Genet.*, 48, No. 4, pp. 218-226. <https://doi.org/10.3103/S0095452714040094>
8. Potrokhov, A., Sosnovska, D., Ovcharenko, O., Budzanivska, I., Rudas, V. & Kuchuk, M. (2021). Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplasmic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk. J. Biol.*, 45, No. 1, pp. 79-87. <https://doi.org/10.3906/biy-2007-87>
9. Potrokhov, A. O. & Ovcharenko, O. O. (2024). Strategies for engineering of virus-resistant plants: focus on RNases. *Cytol. Genet.*, 58, pp. 99-114. <https://doi.org/10.3103/S0095452724020099>
10. Ovcharenko, O., Zholobak, N., Rudas, V. & Kuchuk, M. (2025). Plant systems as platforms for the production of interferon alpha and its application. *Cytol. Genet.*, 59, pp. 622-633. <https://doi.org/10.3103/S0095452725060088>
11. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, No. 3, pp. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
12. Bayat, F., Shiran, B. & Belyaev, D. V. (2011). Overexpression of *HvNHX2*, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from barley, improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Crop Sci.*, 5, No. 4, pp. 428-432. Retrieved from [https://www.cropj.com/bayat\\_5\\_4\\_2011\\_428\\_432.pdf](https://www.cropj.com/bayat_5_4_2011_428_432.pdf)
13. Krivosheeva, A. B., Varlamova, T. V., Yurieva, N. O., Sobol'kova, G. I., Kholodova, V. P. & Belyaev, D. V. (2014). Potato transformation with the *HvNHX3* gene and the improvement of transformant salt tolerance. *Russ. J. Plant Physiol.*, 61, pp. 792-800. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060119>
14. Trifonova, E. A., Sapotsky, M. V., Komarova, M. L., Scherban A. B., Shumny V. K., Polyakova A. M., Lapshina L. A., Kochetov A. V. & Malinovsky V. I. (2007). Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Rep.*, 26, No. 7, pp. 1121-1126. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0298-z>

15. Trifonova, E. A., Romanova, A. V., Sangaev, S. S., Sapotsky, M. V., Malinovsky, V. I. & Kochetov, A. V. (2012). Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biol. Plant.*, 56, pp. 571-574. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0206-4>
16. Berdichevets, I. N., Shimshilashvili, H. R., Gerasymenko, I. M., Sindarovska, Y. R., Sheludko, Y. V. & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2010). Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, No. 6, pp. 2289-2293. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3770-0>
17. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62, No. 3, pp. 293-300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
18. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, No. 1, pp. 13-15.
19. Rudas, V. A., Shakhovskiy, A. M., Morgun, B. V., Matveeva, N. A. & Kuchuk, M. V. (2009). Obtaining of transgenic potato plants resistant to the herbicide basta, containing the gene *cyp11A1* of cytochrome P450<sub>scc</sub>. *Faktori eksperimental'noi evolücii organizmiv*, 7, pp. 192-196 (in Ukrainian).
20. Kyrpa-Nesmiyan, T. M. (2017). Study of heterological expression of cyanobacterial desaturase genes in higher plants (Unpublished candidate thesis). Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine (in Ukrainian).
21. Ovcharenko, O., Potrokhov, A., Sosnovska, D., Hoysyuk, Yu., Yaroshko, O., Shevchenko, T., Budzaniwska, I., Rudas, V. & Kuchuk, M. (2023). Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene. *JJBS*, 16, No. 4, pp. 587-592 <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>
22. Slominski, A. T., Li, W., Kim, T.-K., Semak, I., Wang, J., Zjawiony, J. K. & Tuckey, R. C. (2015). Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 151, pp. 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.010>
23. Sakhno, L. O., Ostapchuk, A. M., Klochko, V. V. & Kuchuk, M. V. (2011). Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450<sub>scc</sub> *cyp11A1* gene. In: *Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph-part III* (pp. 55-59). Toruń: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.
24. Sakhno, L. O. (2011). Seed germination features of canola plants expressing mammalian cytochrome P450<sub>scc</sub> *cyp11A1* gene. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 9, No. 2, pp. 253-259 (in Russian).
25. Sakhno, L. O. (2013). Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering. *Biopolym. Cell.*, 29, No. 6, pp. 443-453. <https://doi.org/10.7124/bc.000838>
26. Vasekina, A. V., Yershov, P. V., Reshetova, O. S., Tikhonova, T. V., Lunin, V. G. & Babakov, A. V. (2005). Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley: Identification and response to salt stress. *Biochemistry*, 70, pp. 100-107. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0057-8>
27. Roslyakova, T. V., Lasareva, E. M., Kononenko, N. V., Babakov, A. V. (2009). New isoform HvNHX3 of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in barley: expression and immunolocalization. *Biochemistry*, 74, No. 5, pp. 549-556. <https://doi.org/10.1134/s0006297909050101>
28. Jabeen, Z., Irshad, F., Hussain, N., Han, Y. & Zhang, G. (2022). NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression under different salt levels and allelic diversity of *HvNHX* in wild and cultivated barleys. *Front. Genet.*, 12, 809988. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.809988>
29. Ovcharenko, O. O., Rudas, V. A., Shcherbak, N. L. & Kuchuk, M. V. (2018). Obtaining of transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) that contain antisense sequence of prolindehydrogenase gene. *Faktori eksperimental'noi evolücii organizmiv*, 22, pp. 299-304 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.7124/FEEO.V22.965>
30. Ye, Z-H. & Droste, D. L. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol. Biol.*, 30, pp. 697-709. <https://doi.org/10.1007/BF00019005>
31. Kyrpa-Nesmiian, T., Rudas, V., Ovcharenko, O., Osipenko, V., Kharhota, M. & Kuchuk, M. (2018). Studies on the adaptation of *Solanum tuberosum* plants expressing the *desA* gene to osmotic stress. *Proceeding of the 2nd International Conference „Smart Bio“* (p. 72), Kaunas, Lithuania. Retrieved from <http://icsb.vdu.lt/wp-content/uploads/2018/05/ABSTRACT-BOOK-ICSB-2018.pdf>
32. Law of Ukraine “On state regulation of genetic engineering activities and state control over the placing on the market of genetically modified organisms and products”. *Vidomosti Verkhovnoyi Rady (VVR)*, 2023 (in Ukrainian). Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3339-20#Text>

Received 02.12.2025

O.O. Ovcharenko, <https://orcid.org/0000-0003-4874-5258>

V.A. Rudas, <https://orcid.org/0000-0001-5643-1406>

N.L. Shcherbak, <https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

O.M. Kishchenko, <https://orcid.org/0000-0003-4768-2822>

B.V. Morgun, <https://orcid.org/0000-0001-7041-6894>

M.V. Kuchuk, <https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

EFFECTIVE METHOD FOR GENETIC TRANSFORMATION  
OF POTATOES AND CREATION OF IN VITRO COLLECTION OF TRANSGENIC PLANTS  
WITH GENES THAT INCREASE RESISTANCE TO ABIOTIC AND BIOTIC STRESSES

Currently, various agricultural crops are exposed to multiple environmental stresses, including salinity, drought, extreme temperatures, mineral deficiencies or excesses, etc. Potatoes (*Solanum tuberosum*) are an important food, feed, and industrial crop in Ukraine and worldwide. Polyploidy in cultivated *Solanum tuberosum* is a serious obstacle to its breeding. Genetic engineering has a number of advantages over traditional breeding in terms of increasing the crop's resistance to stress and allows for the rapid creation of resistant plants based on existing commercial varieties. Sustainable production strategies require the optimization of existing protocols for potato genetic transformation and the transfer of stress-resistant genes, which remain relevant and were the focus of our work. Genes of two isoforms of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter from barley (*HvNHX2* and *HvNHX3*) contribute to increased resistance to drought, salinity and soil alkalinity. A short antisense segment of the proline dehydrogenase (*PDH ex1*) gene from *Arabidopsis thaliana* reduces the activity of this enzyme by partially suppressing the PDH gene, thereby increasing proline content and resistance of transgenic plants to drought, cold, heavy metals and salinity. The cytochrome P450 gene from the bovine adrenal cortex (*CYP11A1*) increases yield and resistance to phytopathogenic fungi. Genes for extracellular RNase from *Zinnia* (*ZRNase*) and bovine pancreatic RNase (*bov*) increase plant resistance to viral infections. Commercial potato varieties were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* route using vectors containing the above-mentioned genes. The resulting collection of transgenic potato lines represents valuable material for future investigation on stress resistance and allows comparison of the influence of different alien genes across the certain backgrounds of a number of commercial varieties.

**Keywords:** genetic engineering, *Agrobacterium tumefaciens*, potato (*Solanum tuberosum*), heterologous genes.