

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАН
УКРАЇНИ»**

САХНО ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК581.143.5 + 1575.123 + 577.21

**ОТРИМАННЯ РОСЛИН РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS* L.)
З ГЕТЕРОЛОГІЧНИМИ ГЕНАМИ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ
ТА АНАЛІЗ ЇХ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України.

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, директор

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка МОН
України, декан хіміко-біологічного факультету

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Дубровна Оксана Василівна,
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетичної
інженерії

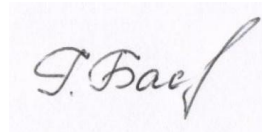
доктор біологічних наук, доцент
Панчук Ірина Ігорівна,
Чернівецький національний університет ім. Юрія
Федьковича МОН України, доцент кафедри
молекулярної генетики та біотехнології.

Захист відбудеться 10 березня 2016 р. о “13” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А. Факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А.

Автореферат розісланий 5 лютого 2016 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, к.б.н.



Баєр Г.Я.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Значні зусилля фахівців у галузі біологічної науки спрямовані на підвищення врожайності рослин (Bhatnagar-Mathur et al., 2008; Confalonieri et al. 2014; Su et al., 2015). Ріпак (*Brassica napus* L.) – важлива сільськогосподарська культура, яка забезпечує суттєвий внесок у всесвітню і українську економіку. Вона є третьою за значенням олійною культурою після пальми і сої (<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QD/E>) у світовому виробництві олії. Насіння ріпаку на сьогодні є одним із найважливіших джерел для отримання рослинної олії як для потреб харчування, так і технічного призначення, а також кормів з високим вмістом білка. Зміни клімату ускладнюють задачу отримання вихідного матеріалу для селекції, зокрема, ріпаку, який характеризувався би мінімальними втратами продуктивності за несприятливих умов вирощування, таких як висока (низька) температура, посуха, вимокання, засолення, підвищений вміст важких металів, ураження фітопатогенними мікроорганізмами і пошкодження комахами (Abbadì et al., 2011; Wittkop et al., 2009; Rahman et al., 2014).

Біотехнологічні методи дозволяють отримувати рослини з поліпшеною толерантністю до стресів на основі вже наявних, цінних з точки зору сільськогосподарських характеристик, генотипів. Так, отримано трансгенні рослини ріпаку, які експресували вакуолярний Na^+/H^+ антипорт з *Arabidopsis thaliana*, що надавало їм можливості рости, цвісти та продукувати насіння за умов засолення (200 mM NaCl) (Zang et al., 2001). Надекспресія мітохондріальної Mn супероксиддисмутази (Mn SOD3.1) з пшениці у рослинах ріпаку підвищувала їх здатність протидіяти впливу підвищених і низьких температур та нестачі вологи як у лабораторних умовах, так і у польових дослідах (Gusta et al., 2009). Трансгенні рослини *B.napus*, які несли антисенсову конструкцію з геном b-субодиниці фарнезилтрансферази з *Arabidopsis* (ERA1) під контролем rd29A промотору, який індукується посухою, були більш стійкими до абортивності насіння в результаті дефіциту вологи під час цвітіння (Wang et al., 2005). Польові випробовування підтвердили, що за умов достатнього водного забезпечення ці трансгенні рослини продукували такий самий урожай насіння, як і контрольні нетрансформовані. Нетривала посуха під час цвітіння не була перешкодою для формування врожаю насіння біотехнологічного ріпаку, в той час як рослини вихідного сорту продукували його значно менше (Wang et al., 2005).

Введення деяких гетерологічних генів надає трансгенним рослинам переваг тільки у чітко визначених межах стресової ситуації. Прикладом цього може бути інтеграція до рослинного геному генів стійкості до гербіцидів. Отримання власних біотехнологічних рослин на основі перспективних сортів вітчизняної селекції зі стійкістю до найбільш поширених гербіцидів – гліфосату та глюфозінату – є актуальним, бо зробить вирощування сільськогосподарських рослин, і ріпаку зокрема, більш рентабельним і екологічно чистим (Green, 2012; Vencill et al., 2012), крім того, незалежним від імпорту посівного матеріалу. Врахування нових тенденцій у створенні гербіцид-стійких трансгенних рослин,

а саме створення рослин, які поєднують стійкість до декількох гербіцидів одночасно, дасть змогу зменшити ризик виникнення спонтанно стійких бур'янів за рахунок чергування обробок гербіцидами з різними діючими агентами (Dill et al., 2008; Green and Castle, 2010).

Незважаючи на те, що гербіцид-стійкі біотехнологічні рослини вирощуються у промислових масштабах з 1996 року, дискусійним залишається питання щодо можливих непередбачуваних змін у трансгенних рослинах (Oberdoerfer et al., 2005; Сорочинський та ін., 2011; Xu et al., 2011). Вивчення біохімічних і фізіологічних особливостей створених рослин залишається актуальним, тому що може дати відповідь не тільки на питання щодо їх адаптивної пластичності за умов абіотичних і біотичних стресів, але і спрогнозувати вплив конкретних трансгенних рослин на здоров'я тварин і людей, які споживатимуть такі рослини і продукти їх переробки.

Гетерологічні гени різного походження – бактеріальні, тваринні та отримані з геному людини – можуть спричинювати плеiotропний ефект і змінювати адаптивну пластичність трансгенної рослини. Особливо це стосується інтеграції генів білків, що задіяні у відповідях на стрес або регуляції цих процесів. Дослідження наслідків введення таких генів має фундаментальний і практичний інтерес. Так, рослини рису, які надекспресували власний ген дегідроаскорбатредуктази *OsDHAR1*, мали достовірно вищу фотосинтетичну здатність і активність антиоксидантних ферментів за польових умов (Kim et al., 2013). У них спостерігали збільшення врожаю зерна і загальної біомаси завдяки підвищенню маси стебел і коріння і збільшенню кількості колосків і волотей. Вміст аскорбінової кислоти був підвищений у цих рослинах рису в 1,32 разів. Рослини томату (*Solanum lycopersicum*) зі зменшеною активністю аскорбатоксидази завдяки РНК-інтерференції формували більший врожай плодів за умов водного дефіциту і опадання листків (Garchery et al., 2013). Вони характеризувались також збільшеною провідністю продохів і вмістом цукрів у листках і плодах, а також зміненим співвідношенням гексоз до сахарози у апопласті. Отримання і характеристика нових трансгенних рослин ріпаку з підвищеною стійкістю до змін умов вирощування – актуальна проблема агробіотехнології.

Особливої уваги заслуговує питання відбору генотипів з поліпшеними адаптивними характеристиками як в асептичних, так і польових умовах за допомогою надійних біохімічних, молекулярно-біологічних, фізіологічних маркерів. Зокрема, вибір критерію для первинного скрінінгу і подальшого пошуку рослин з підвищеною стійкістю до змін умов культивування може визначати швидкість досягнення успіху у даному напрямку (Abedi et al., 2010).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводились у рамках бюджетних тем відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ «Вивчення поведінки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цінними агрономічними та фармацевтичними властивостями» (2007–2011 р.р., № держреєстрації 0107U002734), «Вивчення функціонування рослинних систем, які містять гетерологічний генетичний матеріал» (2010–2014 р.р., № держреєстрації 0110U002445), «Вивчення

фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (2015 р., № держреєстрації 0115U000025), а також при виконанні проектів цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина. Біопалива» – «Отримання генетично змінених рослин ріпаку з підвищеною продуктивністю, стійкістю до гербіцидів та зміненим складом олії як сировини для виробництва біодизеля» (2007–2010 р.р., № держреєстрації 0107U008096) та «Біотехнологічні рослини ріпаку з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів як сировина для виробництва біодизеля» (2010–2012 р.р., № держреєстрації 0111U004455); проектів «Дослідження фізіологічної ролі генів, що кодують десатурази з різною субстратною специфічністю, в життєдіяльності рослин в нормі та під впливом абіотичних стресових факторів середовища» та «Розробка біоінженерної платформи нового покоління для високоефективної експресії генів фармацевтичних білків в рослинах і створення істівних вакцин» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010–2014 р.р., №№ держреєстрації 0110U006062 і 0110U006061, відповідно), проектів НАНУ-РФФД «Дослідження механізмів стійкості вищих рослин до абіотичних стресів завдяки гетерологічній експресії генів ціанобактерій» (2008–2009 р.р., № 0108U003265), ДФФД - РФФД "Молекулярний дизайн системи для гетерологічної експресії білків з використанням термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* як репортера та носія" (2011 р., № держреєстрації № 0111U004979) та «Створення істівних та кормових рослин, які містять білки з протитуберкульозними та антивірусними властивостями» (ДЗ/489 – 2011).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було отримання та аналіз біотехнологічних рослин ріпаку з гетерологічними генами різного походження та вивчення їх фізіологічних, молекулярно-біологічних і біохімічних характеристик.

До завдань роботи входило:

- оптимізувати умови генетичної трансформації рослин ріпаку для отримання трансгенних рослин;
- отримати рослини ріпаку з геном *bar* з бактерії *Streptomyces hygroscopicus*, що надає рослинам стійкості до гербіцидів на основі фосфінотрицину (глюфозінат), та дослідити їх можливі біохімічні зміни;
- створити трансгенні рослини ріпаку з одночасною експресією гена *epsps* з *Agrobacterium* штама CP4, що надає рослинам стійкості до гербіцидів на основі фосфометилгліцину (гліфосат), і гена *bar* та дослідити їх можливі біохімічні зміни;
- отримати рослини ріпаку з геном *desC* з ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та вивчити зміни у їх холодостійкості;
- створити рослини ріпаку з геном *HuInf-α2b* (інтерферону альфа-2b людини), що обумовлює акумулювання рекомбінантного інтерферону людини, та проаналізувати їх фізіологічні та біохімічні параметри;

- отримати рослини ріпаку з геном *cup11A1*, що кодує цитохром P450scс тваринного походження, та виявити особливості створених рослин;
- визначити загальні характеристики отриманих трансгенних рослин та їх відмінності, що можуть бути пов'язані з експресією гетерологічних генів різного походження, та визначити їх можливі причини.

Об'єкт дослідження – біохімічні, молекулярно-генетичні та фізіологічні особливості трансгенних рослин.

Предмет дослідження – створення трансгенних рослин ріпаку з гетерологічними генами різного походження та аналіз особливостей фізіолого-біохімічних параметрів отриманих трансформантів в залежності від інтегрованих генів.

Методи досліджень. Методи дослідження включали методики культивування рослин *in vitro* та *in vivo* (вирощування у ґрунті в теплиці та кліматичній камері) за нормальних умов і за дії абіотичних стресів (висока та низька температури; обприскування розчинами гербіцидів; осмотичний стрес, індукований додаванням манітолу до культурального середовища; додавання гербіцидів до середовищ культивування). Для отримання трансгенних рослин ріпаку використовували метод *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації. Наявність та експресію цільових генів на рівні транскрипції у геномі рослин визначали за допомогою молекулярно-біологічних (полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) та полімеразно-ланцюгова реакція зворотніх транскриптів (ЗТ-ПЛР)) методів. Активність генів стійкості до гербіцидів і антибіотика визначали під час культивування рослин або експлантів на середовищах з додаванням фосфінотрицину (PPT, ген *bar*), або гліфосату (ген *epsps*), або канаміцину (ген *nptII*). Генетичний аналіз полягав в аналізі розщеплення за стійкістю до відповідних селективних агентів при пророщуванні у асептичних умовах насіння, отриманого від самозапилення трансгенних рослин. Антивірусну активність рослинних екстрактів вивчали методом мікротитрування, що базується на визначенні здатності екстрактів протидіяти цитопатичному впливу вірусу везикулярного стоматиту (штам Indiana з колекції Інституту мікробіології та вірусології НАНУ) на клітинну культуру тестикул поросят (з колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького) як показник активності введеного гена інтерферону людини. Біохімічні методи застосовувались для визначення вмісту сумарного розчинного білка (СРБ); вмісту хлорофілів і каротиноїдів; вмісту аскорбінової кислоти; вмісту жирних кислот у листі і насінні за допомогою газової хромато-мас-спектрометрії; відносного вмісту води; активності СОД; антирадикальної активності проти 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикала (DPPH-радикал); антиоксидантної активності, яку вимірювали з використанням 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію; активності ліхенази (якісний та кількісний тести). Фізіологічний стан рослин оцінювали за накопиченням сирової біомаси, за будовою квіток, за масою і схожістю насіння, за довжиною коренів і гіпокотилів у проростків. Для аналізу експериментальних даних було використано методи статистичної обробки.

Наукова новизна. Оптимізовано умови генетичної трансформації рослин ріпаку з використанням як експлантів листових дисків асептично вирощуваних рослин, підібрано склад середовищ для регенерації.

Вперше отримано трансгенні рослини ріпаку зі стійкістю до гербіцидів на основі фосфінотрицину за рахунок експресії безпромоторного гена *bar* при використанні векторної конструкції з елементами *Cre-lox* системи рекомбінації фага P₁. Не виявлено змін в активності супероксиддисмутази (СОД) і в антирадикальній активності за нормальних умов культивування.

Вперше отримано рослини ріпаку з трансгенами *bar* і *epsps*, стійкі до двох груп гербіцидів (фосфінотрицину і фосфонометилгліцину). Не виявлено змін в активності СОД і в антирадикальній активності за нормальних умов культивування.

За рахунок одночасного введення двох генетичних конструкцій в складі двох різних векторів вперше отримано рослини ріпаку з генами *bar*, *epsps*, *nptII*, *desC* та *licBM3*. Показано наявність і активність перенесених генів. Виявлено, що експресія гена ацил-ліпідної десатурази *desC* без спрямування гетерологічного білка в хлоропласти не змінює як активності СОД в нормі, так і толерантності рослин до дії низьких та високих температур і осмотичного стресу.

Вперше отримано рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини, показано біологічну активність гетерологічного білка, підвищення антиоксидантної активності тканин листків за рахунок зростання активності СОД. Виявлено здатність до накопичення більшої біомаси у порівнянні з вихідними рослинами як за сприятливих умов культивування, так і в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом *in vitro*. Вперше показано поліпшення росту рослин ріпаку за обробки насіння або верхівок асептичних рослин розчинами рекомбінантного альфа-2b інтерферону людини, продукovanого бактерією *Escherichia coli*, і виявлено підвищення активності СОД у нормальних умовах і за умов водного дефіциту, спричиненого додаванням манітолу до культурального середовища.

Вперше отримано рослини ріпаку з геном *sup11A1*, що кодує цитохром P450_{SCC} тваринного походження. Виявлено здатність рослин до накопичення підвищеної біомаси зі збільшеним вмістом сумарного розчинного білка (СРБ) за умов культивування *in vitro* і у кліматичній камері. Виявлено підвищену антиоксидантну активність тканин листків за рахунок збільшення активності СОД; вміст аскорбінової кислоти при цьому залишався незмінним. Показано зміни у складі жирних кислот ліпідів листя і насіння, підвищену толерантність отриманих рослин до осмотичного стресу *in vitro*, високої температури при пророщуванні насіння, високотемпературного стресу за умов кліматичної камери. Виявлено збільшену активність СОД за нормальних умов вирощування.

Практичне значення роботи. Отримані трансгенні рослини можуть бути використані для вирощування сировини з метою виробництва біодизелю завдяки їх стійкості до гербіцидів, здатності протистояти стресам, накопичувати більшу біомасу, розвиватись і давати врожай швидше за

нетрансформовані. Вирощування гербіцид-стійких рослин є більш рентабельним та екологічно чистим у порівнянні з культивуванням гербіцид-нестійких сортів.

Узагальнений теоретичний матеріал використовується в ході викладання спецкурсів на кафедрах ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка і Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут».

Методика визначення активності СОД може використовуватись для первинного скринінгу рослин на толерантність до умов водного дефіциту.

Методика отримання трансгенних рослин ріпаку з використанням як експлантів для трансформації листків асептичних рослин, запатентована в Україні, використовується для створення нових біотехнологічних рослин з іншими цільовими генами різного походження.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, проведенні всіх основних експериментів і дослідів, аналізі літератури, підготовці та написанні наукових статей. Спільно з науковим консультантом проведено вибір об'єкту, розроблено загальний напрямок досліджень і структуру дисертаційної роботи. Дослідження проводились за участі співробітників Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ та Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, серед яких с.н.с. відділу генетичної інженерії, к.б.н. І.К. Комарницький (ІКБГІ НАНУ), зав. відділом молекулярної генетики, к.б.н. Б.В. Моргун (ІКБГІ НАНУ), зав. лабораторією систем біосинтезу природних сполук, к.б.н. Ю.В. Шелудько (ІКБГІ НАНУ), зав. відділом проблем інтерферону і імуномодуляторів, д.б.н., член-кор. НАНУ М.Я. Співак (ІМВ НАНУ), зав. лабораторією біологічних полімерних сполук, к.б.н. А.М. Остапчук (ІМВ НАНУ). Отримані результати наведено у спільних публікаціях, при проведенні досліджень та їх узагальненні авторство здобувача становило близько 80%.

Апробація результатів роботи. Результати досліджень доповідалися на IX і X Міжнародних наукових конференціях «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008 та Казань, 2013), з'їзді генетиків і селекціонерів, присвяченому 200-річчю з дня народження Ч. Дарвіна, поєднаному з V з'їздом Вавіловського товариства генетиків і селекціонерів (Москва, 2009), україно-німецькому симпозиумі з фізики та хімії наноструктур та нанотехнологій (Берегове, Україна, 2010), Міжнародній конференції «Plant transformation technologies II» (Відень, Австрія, 2011), Міжнародній конференції «Rapeseed oil in European modern economy. 10th Int. Conf. on Research and Technology» (Торунь, Польща, 2011), Міжнародній конференції «Сучасні аспекти генетичної інженерії рослин» (Київ, 2011), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Генетичні основи селекції, насінництва і біотехнологій: наука, освіта, практика» (Київ, 2012), Міжнародному симпозиумі з клітинної біології, спільному з 3-м Українським з'їздом клітинних біологів (Лівадія, Ялта, 2012), Міжнародній конференції «Biotechnology and Plant Breeding. Perspective towards Food Security and

Sustainability» (Радзиков, Польща, 2012), Всеросійській конференції з міжнародною участю «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013), 5-му Центрально-Європейському Конгресі Природничих Наук (5th Central European Congress of Life Sciences, Eurobiotech 2013. Leading area: White and Green Biotechnology (Краков, Польща, 2013), 6-й конференції польського товариства експериментальних біологів рослин (PSEPB) (Лодзь, Польща, 2013), з'їздах Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова (Алушта, 2011-2013; Чернівці, 2015), III Міжнародній конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 2014), на конференції «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology, Львів, 2015).

Публікації. Результати досліджень представлено у 48 публікаціях, що включають 31 статтю, з них 25 статей у провідних фахових виданнях, 1 патент на корисну модель, 16 тез доповідей у збірках вітчизняних та закордонних з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація має в своєму складі вступ, шість розділів, серед яких огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження та чотири розділи, присвячені висвітленню і обговоренню експериментальних даних, а також перелік скорочень, узагальнення і висновки. Вона проілюстрована 22 таблицями та 114 рисунками. Повний обсяг дисертації – 327 стор. комп'ютерного друку, обсяг основного тексту – 263 стор. Список використаних джерел налічує 509 публікацій, з них 460 англomовні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ огляд літератури присвячений висвітленню останніх досягнень біотехнології у створенні трансгенних рослин з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів. Особлива увага приділена питанням збільшення біомаси рослин за сприятливих і стресових умов росту, обговорюється важливість змін у антиоксидантній системі рослин, зокрема у активності першого ферменту системи захисту рослин від надмірного вмісту активних форм кисню (АФК) – супероксиддисмутази (СОД), для підвищення здатності рослин протидіяти впливу несприятливих умов зростання різного походження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вихідний матеріал. Як вихідний матеріал для проведення експериментів використовували насіння ярого ріпаку (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) сортів Калинівський, люб'язно надане акад. В.Ф. Пересипкіним; ВНІС 100, люб'язно надане д.б.н. Ф.М. Парієм; Магнат, Марія, Обрій, Ліга, Титан і Ексголд, люб'язно надане к.б.н. М.В. Слісарчуком (відділ селекції та насінництва льону і ріпаку Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН», Київ), та Магнат, люб'язно надане А.М. Шишловою (відділ молекулярної генетики і біотехнології Інституту генетики і цитології НАН Білорусі, Мінськ).

Методи досліджень. Вирощування рослин в асептичних умовах. Для отримання асептичних рослин, що використовувались в експериментах, насіння поверхнево стерілізували і пророщували на безгормональному агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) (Murashige, 1962) в чашках Петрі без освітлення за 23°C. Після 5–7 діб проростки переносили в стерильні колби з тим же середовищем. Рослини розмножували живцюванням і підтримували у термальній кімнаті за температури 24°C і освітленні 4000–5000 люкс у колбах, сосудах Magenta Vox або пробірках Sigma 25×150 мм (Sigmaxware™) з безгормональним агаризованим середовищем MS.

Вирощування рослин за умов водного дефіциту. Під час вивчення толерантності до осмотичного стресу верхівки з одним повністю розвинутим листком переносили до пробірок Sigma 25×150 мм (Sigmaxware™) з 5мл рідкого безгормонального середовища MS, до яких перед автоклавуванням додавали відповідну кількість манітола (100 мМ, 200 мМ, 500 мМ) для моделювання осмотического стресу, і вирощували протягом двох тижнів в термальній кімнаті за 24°C і освітленні 4000 –5000 люкс. Контролем вважали ріст на середовищах без манітолу. Толерантність до дефіциту води в асептичних умовах аналізували і на безгормональному агаризованому середовищі MS з додаванням манітолу в концентрації 50 мМ. Рослини вирощували в зазначених вище пробірках і за тих же умов протягом чотирьох тижнів.

Вирощування рослин за низьких позитивних температур. Верхівки пагонів з одним повністю розвинутим листком переносили до пробірок Sigma 25×150 з 15 мл безгормонального агаризованого середовища MS. Протягом 21 доби їх вирощували в термальній кімнаті. Потім рослини переносили в тих самих пробірках в холодильну камеру (+4°C). Після 7 діб їх повертали для росту в термальну кімнату на три тижні. Ріст оцінювали на 21, 28, 35 і 48 добу за накопиченням сирої біомаси (СБ), вмісту сумарного розчинного білка (СРБ) і активності фермента супероксиддисмутази (СОД) в листках.

Вирощування рослин в кліматичній камері та високотемпературний тест. Рослини з асептичної культури висаджували в ґрунт (горшечки об'ємом 2 л) в умовах теплиці (12/12 фотоперіод, +23°C). За тиждень адаптовані рослини переносили в кліматичну камеру Programmable Plant Growth Chamber, модель WGC-P9 (WiseCube® WGC, Корея). Їх вирощували протягом двох тижнів, підтримуючи наступні параметри: 16 год (світло)/ 8 год (темрява) фотоперіод, температура +22°C (день)/+18°C (ніч), вологість – 70%, освітлення – 480-550 $\mu\text{M m}^{-2} \text{сек}^{-1}$). Високотемпературний тест проводили на рослинах у фазі 4–5 листків після двох тижнів вирощування в кліматичній камері. Вологість і освітлення залишали без змін. Температуру підвищували кожної години на 2°C до 42°C, потім її підтримували постійною протягом 16 год згідно (Gusta et al., 2009).

Отримання насіння в умовах закритого ґрунту. Для отримання насіння рослини з асептичної культури переносили в ґрунт в умовах теплиці. За настання цвітіння відбувалось самозапилення, використовували паперові ізолятори.

Тестування на толерантність до фосфінотрицину і гліфосату в асептичних умовах. Насіння ріпаку, отримане в результаті самозапилення створених ліній, стерильно пророщували в умовах освітлення в термальній кімнаті на безгормональному середовищі MS без додавання фосфінотрицину (PPT). Верхівки 5-7-добових проростків з повністю сформованими несправжніми листочками відокремлювали і переносили на середовище, що містило PPT (10 мг/л), і визначали розщеплення за цією ознакою за тиждень (нестійкі жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння). Для тестування на стійкість до гліфосату в асептичних умовах стерильний розчин N-фосфометилгліцина (2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте») додавали до безгормонального поживного середовища після автоклавування. За три тижні оцінювали коренеутворення і загальний стан рослин.

Тестування на толерантність до гліфосату і фосфінотрицину в умовах теплиці. В умовах закритого ґрунту проводили обприскування 3-тижневих адаптованих рослин розчином гліфосату (N-фосфометилгліцина 2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»); дію препарату спостерігали за тиждень.

Дію препарату BASTA (20% розчин фосфінотрицину) спостерігали за три доби після обприскування водним розчином (5 мг/л діючої речовини).

Вивчення впливу екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку. Вплив екзогенного інтерферону (ІНФ) вивчали в асептичних умовах при проростанні насіння і при культивуванні верхівок пагонів сформованих рослин. Насіння стерилізували, висушували за допомогою фільтрувального паперу і замочували в водних розчинах ІНФ (концентрації 10^2 , 10^3 , 10^4 МО/мл) протягом 30 хв за температури $+4$ °С. В якості контролю робили замочування 1) в деіонізованій воді, 2) в розчині ІНФ (10^2 МО/мл), інактивованому кип'ятінням, 3) в розчині ІНФ (10^2 МО/мл) з додаванням діетилдітіокарбамату натрію в якості інгібітора СОД (Heikkila et al., 1976). Потім насіння висушували фільтрувальним папером і розкладали на поверхню безгормонального агаризованого середовища MS по 10 штук в кожну чашку Петрі. Для приготування розчинів ІНФ використовували Laferon (рекомбінантний ІНФ альфа 2b людини, 1 М МО, INTER-PHARM-BIOTEK, Україна) і стерильну деіонізовану воду, охолоджену до $+4$ °С. Пророщування насіння і ріст проростків проходили в термостаті в темряві за температури 24°C . За 7 діб оцінювали фізіологічні (сиря вага проростків та їх окремих частин – коренів, гіпокотилів, котиледонів) та біохімічні (вміст сумарного розчинного білку, активність СОД) параметри і вплив обробки екзогенним ІНФ на проростання насіння (% проростання).

Верхівки пагонів відокремлювали від 4-5 тижневих рослин, що розвивались на безгормональному агаризованому середовищі MS. Їх занурювали в розчини ІНФ (10^3 МО/мл, експеримент, та 10^3 МО/мл, інактивованій кип'ятінням, контроль), витримували 30 хв, підсушували фільтрувальним папером і переносили в пробірки з 15 мл агаризованого поживного середовища без додавання манітола (контроль) та з 50 мМ манітолом (умови водного дефіциту). За 4 тижні оцінювали фізіологічні (сиря

маса) та біохімічні (вміст сумарного розчинного білку, активність СОД, вміст хлорофілів і каротиноїдів) показники.

Генетична трансформація. Трансформацію ріпаку проводили згідно розробленої нами методики (Сахно и др., 2008). Частоту регенерації розраховували як відношення кількості експлантів, на яких утворились регенеранти, до загальної кількості експлантів. Частоту трансформації визначали як частку трансгенних регенерантів (за ПЛР аналізом) у загальній кількості регенерантів.

Генетичні конструкції, використані в експериментах з трансформації. Векторні конструкції з плазмідами pICH3744, pICH3737 і pICH9414 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, Німеччина). Крім селективного гена неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) вони мали кодуєчу послідовність гена стійкості до фосфінотрицину (*bar* гена) і незалежний 35S промотор, які були розміщені між двома інвертованими *lox*-сайтами (рис. 1). Загальну схему конструкцій можна представити як RB- *lox*-*bar*- 35S- *lox*- *nptII*. Плазміди pICH3744 і pICH9414 несли додатковий *loxA* (*loxP*) сайт, який знаходився в прямій орієнтації по відношенню до іншого *lox A* (*loxP*) сайту.

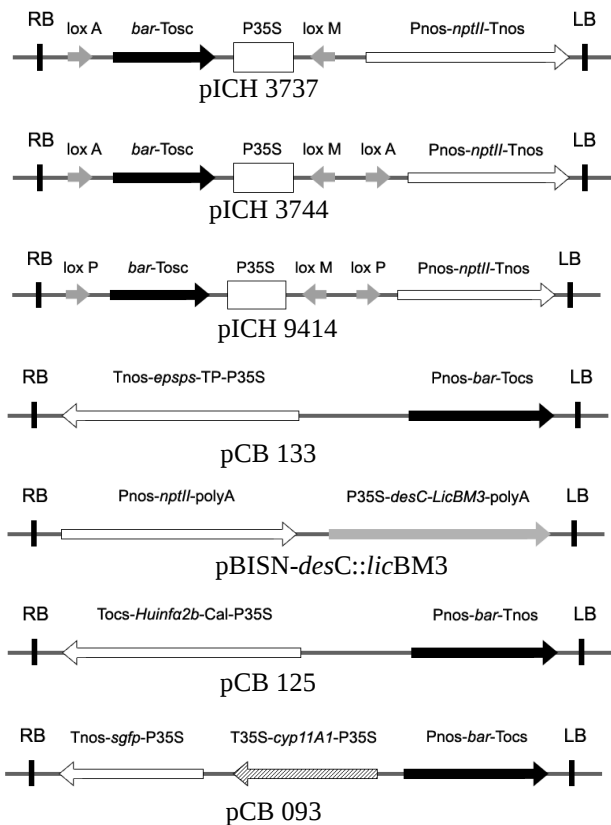


Рис.1. Схеми конструкцій, що були використані в експериментах з отримання рослин ріпаку: LB – ліва границя Т-ДНК, RB – права границя Т-ДНК, *bar* – кодуєча частина гена фосфінотрицинацетилтрансферази, *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II, *loxA*, *loxM*, *loxP* – сайти специфічної рекомбінації; Tnos – термінатор гена нопалінсинтази, Pnos – промотор гена нопалінсинтази, P35S – промотор гена ВМЦК, Tocs – термінатор гена октопінсинтази, TP – транзитний пептид, *epsps* – ген енолпірувілшкіматфосфатсинтази, *desC-licBM3* – злитий ген десатурази $\Delta 9$ ціанобактерії з репортерним геном ліхенази, *HuInf-α2b* – ген альфа-2b інтерферону людини, *cyp11A1* – ген цитохрома P450_{SCC}, *sgfp* – візуальний маркерний ген розчинного білка GFP.

Вектор pCB133 мав гени *epsps* (цільовий) під контролем 35S промотора ВМЦК і *bar* (селективний) під контролем *nos* промотора (рис. 1). Вектор був сконструйований к.б.н. І.К.Комарницьким на основі вектора pUC19 шляхом ексцизії гена *gus* і лігування гена *epsps* під контроль 35S промотора.

Вектор pBISN-*desC::licBM3* містив гени *desC* цианобактерії *Synechococcus vulcanus* і *licBM3* термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* (Маали и др., 2007), що були злиті в одній рамці зчитування під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), і селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) під контролем *nos* промотора (рис. 1). Вектор був люб'язно наданий д.б.н. І.В. Голденковой-Павловою (Інститут загальної генетики ім.М.І.Вавілова РАН, Москва).

Т-ДНК район плазмиди pCB125 містив ген альфа-2b інтерферону людини (*HuInf-α2b*), злитого з рослинним (*Nicotiana plumbagenifolia* L.) кальретикуліновим апопластним сигналом таргетингу, під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК, та селективний ген *bar* (рис. 1). Плазміда pCB125 була сконструйована к.б.н. І.М.Герасименко шляхом вирізання гена рекомбінантного інтерферону альфа-2b (*HuInf-α2b*) із вектора pICH17311 ендонуклеазами рестрикції *NcoI* і *XbaI* та лігування до вектора pICH5290 T4 ДНК лігазою. Вектори pICH5290 і pICH17311 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, Німеччина).

В якості донора гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} із мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби використовувалась плазміда pGBP450f, отримана з Інституту генетики і цитології НАН Біларусі. Бінарний вектор pICH5290 слугував реципієнтом гена *sup11A1* і основой для двох генетичних конструкцій – pCB092 і pCB093 (рис. 1).

Клонування проводилося по сайту *EcoRI*, присутньому на плазміді pICH5290, на Т-ДНК між *bar* та *gfp* генами, тому зберігалася рівноцінна можливість вбудовування донорного ДНК-фрагменту у двох протилежних орієнтаціях, прямій (pCB093) і оберненій (pCB092). Конструювання векторів, трансформацію компетентних клітин *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (Stratagene) і компетентних клітин *Agrobacterium tumefaciens* штама GV3101 виконано к.б.н. Б.В.Моргуном.

Підготовка агробактерій до інфікування рослинних тканин. Нічну культуру агробактерії нарощували в 20 мл рідкого середовища LB (Sambrook et al., 1989), доповненого 50 мг/л карбеніциліна і 100 мг/л рифампіцина, на качалці (180 об/хв) протягом 24 годин при 24°C в темряві. Потім агробактеріальну суспензію розводили в 3 рази рідким середовищем для калюсоутворення та інкубували за тих же умов протягом 3–4 годин. Отриману суспензію використовували для інфікування.

Аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Із листової тканини виділяли ДНК згідно методикам (Cheung et al., 1993; Querci et al., 2006). Для реакції використовували 40 нг рослинної ДНК, по 0,5 мкМ кожного з праймерів (табл.2.7.1), по 200 мкМ кожного з трифосфатів, 1ед. *Taq* ДНК-полімерази, ПЛР реакційний буфер, що містив 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 9 при 25°C), 0,1 % Triton X-100 і 2 мМ MgCl₂. Загальний об'єм суміші дорівнював 20 мкл. Ізольована ДНК з нетрансформованих рослин (негативний контроль) і 1 нг плазмідного вектору (позитивний контроль) були ампліфіковані з тими ж праймерами та за тих же умов. Реакцію проводили в ампліфікаторі “Терцик ИМ02” (фірма “ДНК–

технологія“, Москва). Крім того, ампліфікації (з однією парою праймерів або мультіплексні реакції) проводили в 10 мкл суміші, яка містила 1 мкг рослинної ДНК, по 0,5 мкМ кожного з праймерів (10 мкМ), 0,5 мкл (10 мкМ) суміші трифосфатів, 0,1 мкл *Taq* ДНК-полімерази (0,5 од.), 1 мкл 10X ПЛР буфера, в ампліфікаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США).

Аналіз експресії введених генів на рівні транскрипції. Для підтвердження експресії генів на рівні транскрипції проводили ПЛР аналіз зворотніх транскриптів (ЗТ-ПЛР) з використанням сумарної РНК. Її виділяли з листків рослин згідно методики (Logermann et al., 1987). Для аналізу брали 200 мг рослинного матеріалу. Концентрацію РНК вимірювали на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Синтез першого ланцюга кДНК на матриці РНК проводили з використанням набору для проведення ЗТ-ПЛР «First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas») згідно інструкціям фірми-виробника. РНК-матрицю попередньо обробляли дезоксирибонуклеазою I. Для кожного зразка РНК проводили дві реакції – з додаванням і без додавання зворотної транскриптази М-MuLV. Ампліфікацію і аналіз ПЛР-продуктів виконували, як описано вище.

Визначення антиоксидантної активності тканин листків. Антиокислювальну активність визначали за методом Семенова, Ярош (Семенов, Ярош, 1985) з деякими модифікаціями. Для цього 0,3 г листків розтирали в ступці з 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4). Отриманий гомогенат переносили до пробірок Eppendorf і центрифугували в мікроцентрифузі 10 хв при 4000 об/хв. До кювети для фотоелектроколориметра товщиною 1 см вносили 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мл 0,8 мМ 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію (DPIP), 0,5 мл сульфата заліза (II) і 0,5 мл супернатанта (дослід) чи 0,5 мл дистильованої води (контроль). Після цього кожні 30 с протягом 5 хв вимірювали оптичну густину розчину в кюветі (D_t) за довжини хвилі 510 нм. Крім цього, вимірювали оптичну густину розчину, в який замість 0,5 мл сульфата заліза (II) додавали 0,5 мл дистильованої води (D_∞). За цих умов 2,6-дихлорфеноліндофенолят натрію є повністю окисненим. Потім визначали константу швидкості окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію як тангенс кута нахилу прямої на графіку залежності натурального логарифма ΔD_t ($\Delta D_t = D_\infty - D_t$) від часу. За показник антиокислювальної активності рослинного матеріалу приймали значення константи інгібування (K_i) окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію, що вираховували за формулою: $K_i = \frac{K_{\text{контр}} - K_{\text{дослід}}}{C}$, де $K_{\text{контр}}$ і $K_{\text{дослід}}$ – константи швидкості окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію в контрольному і дослідному варіантах, відповідно, мл/л хв; C – концентрація рослинного матеріалу в кюветі, мг/мл.

Визначення вмісту загального розчинного білка. Для визначення кількості сумарного розчинного білка в листках рослин використовували метод Бредфорда (Bradford, 1976). Рослинні екстракти готували, розтираючи наважку в ступці або в пробірках на шаровому млині Retsch MM 400 (Німеччина) в подвійному об'ємі 50 мМ Tris-HCl буфера (рН 8,0), до якого додавали 5 мМ

Na₂ЕДТА, 100 мМ NaCl, 10 мМ β-меркаптоетанол і 2,5 % полівінілпіролідон, з наступним центрифугуванням при 13000 g (4°C) протягом 15 хв. Рідину над осадом використовували для аналізу. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. за довжини хвилі 595 нм. Як внутрішній стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Визначення активності СОД. Визначення активності СОД проводили з використанням метода фотохімічного окиснення нітроблакитного тетразоліа (НБТ) згідно (Beyer, Fridovich, 1987). Рослинний матеріал (100 мг) розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 8,0) у ступці або в пробірках на кульовому млині Retsch MM 400 (Німеччина) і центрифугували при 13 000 g (4°C) протягом 15 хв. Рідину над осадом використовували для аналізу. Реакцію з НБТ проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш мала в своєму складі 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл буфера, 130 мкл 65 мМ метіоніна, 47 мкл 63 мМ НБТ, 12,5 мкл 1 мМ рибофлавіна. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, інші три освітлювали протягом 5 хв в термостаті за температури 23°C лампой білого світла (люмінісцентна лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W). За довжини хвилі 550 нм визначали абсорбцію реакційною сумішшю, яку витримували на світлі, проти поглинання світла пробою, що була в темряві, на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 (Німеччина). Нульова проба мала в своєму складі всі перелічені компоненти, за виключенням рослинного екстракту. Кількість буфера збільшувалась в реакційній суміші до 550 мкл. Активність СОД виражали в од. акт./ мг білка.

Визначення вмісту аскорбінової кислоти в рослинному матеріалі. Вміст аскорбінової кислоти визначали з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у листі рослин T₂ покоління з геном *sup11A1*, вирощених в умовах теплиці, згідно методики (Zielinski et al., 2007). Ліофілізований зразок (50 мг) екстрагували 5 мл ортофосфорної кислоти (5%) протягом 2 хв в ультразвуковій бані. Після наступного 10 хв центрифугування при 13000g за температури 4°C відбирали надосадкову рідину. До 1 мл супернатанта додавали 200 мкл гептана для позбавлення від гідрофобних речовин. Потім суміш центрифугували ще 10 хв при 8000 g за тієї ж температури. Обережно відбирали слой гептана. Водну фракцію використовували для ВЕРХ аналізу. Його проводили розділенням у градієнтній суміші ацетонітрилу, 39 мМ натрій-фосфатного буфера (pH=2,5) та 2,5 мМ гексансульфонової кислоти. Було побудовано калібрувальну криву залежності площини піку на хроматограмі від концентрації аскорбінової кислоти з лінійною областю від 0,25 до 4 мкг.

Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів. Вміст фотосинтетичних пігментів визначали згідно (Wellburn, 1994), використовуючи в якості розчинника диметилсульфоксид. У пробірки з 4 мл реагенту занурювали зразки листків (50 мг), закручували кришками і витримували в темряві протягом 24 год за кімнатної температури, якщо аналізувались зразки рослин, культивованих в асептичних умовах. Якщо вивчали вміст пігментів фотосинтезу в рослинах, які вирощувались в кліматичній камері, тоді екстракцію проводили на водяній бані за температури 67°C протягом 4 год.

Вимірювали поглинання світла екстрактами за довжин хвиль 665, 649 і 480 нм на спектрофлуориметрі «Флуорат-02-Панорама» (Люмекс-Маркетинг, Росія).

Газова хроматографія метилових ефірів жирних кислот. Виділення жирних кислот та утворення їх метилових ефірів для проведення аналізів на газовому хроматографі відбувалось за один етап згідно (Garces and Mancha, 1993). Жирні кислоти виділяли з листя та насіння рослин ріпаку. Аналіз проводили в газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина – 30 м; внутрішній діаметр – 0,25 мм; товщина покриття 0,25 мкм) (J&W Scientific). Реакція відбувалась за температурної програми від 150°C до 220°C з градієнтом 2° /хв. В якості газа-носія використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Температура інжектора дорівнювала 250°C. Для ідентифікації отриманих спектрів жирних кислот використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш метилових ефірів жирних кислот бактерій Supelco.

Аналіз відносного вмісту води у листках. Відносну кількість води вираховували за формулою $BBV, \% = 100 \cdot (Сира\ Б - Суха\ Б) / (ТБ - Суха\ Б)$, де Сира Б – сира біомаса листка безпосередньо після взяття зразка, г, ТБ – тургорна біомаса того ж листка після насичення деіонізованою водою протягом 24 год в чашці Петрі, г, Суха Б – суха біомаса того ж листка після ліофільного висушування, г.

Вивчення загальної антирадикальної активності рослинних екстрактів. Для визначення загальної антирадикальної активності використовували метод DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал), принцип якого базується на методиці (Blois, 1958). Вимірювали інтенсивність забарвлення спиртового розчину даного стабільного радикалу, що має пурпурно-синє забарвлення, до і після додавання досліджуваних екстрактів. В результаті реакції спиртового розчину радикалу і розчину з радикал-поглинаючою активністю радикал відновлюється, при цьому інтенсивність забарвлення суміші зменшується пропорційно до зменшення концентрації вільного радикалу. Використовували розчин DPPH у 96% етиловому спирті (концентрація радикалу – 10^{-4} М); реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. У кожен лунку планшета додавали розчин радикалу та відповідні розведення досліджуваних екстрактів. Об'єм екстрактів, що додавався, становив 20, 10, 5, 2,5, 1,25 та 0,625 мкл; кінцевий об'єм реакційної суміші в лунці – 100 мкл. Реакційна суміш витримувалась при кімнатній температурі у темряві протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину суміші при довжині хвилі 550 нм. Крім цього, вимірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації у спирті (без додавання DPPH). В якості позитивного контролю використовували водний розчин аскорбінової кислоти (10 мг/мл).

Кількісно поглинання вільного радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою: $A(k) - A(e) / A(k) \cdot 100$, де: $A(k)$ – оптична щільність контрольного розчину, $A(e)$ – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту. На основі розрахованих відсотків інгібування було побудовано графік залежності величин інгібування забарвлення DPPH від

об'єму екстракту. За графіком встановлено об'єм екстракту, котрий викликав 50 % інгібування забарвлення вільного радикалу (EC_{50}).

Аналіз ліхеназної активності. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази проводили в чашках Петрі з 2 % агарозою, в яку додавали 50 мМ Tris/HCl (pH 8,0) і 0,05 % ліхенана (Megazyme, Ірландія). В підготовлені лунки заливали по 20 мкл рослинних екстрактів. Чашки інкубували за температури 65 °С протягом 1 год, фарбували в 0,5 % розчині Конго червоного (Sigma, США) 15 хв і відмивали 1М NaCl до появи світлих плям в місцях гідроліза ліхенана (Мовсесян и др., 2001). **Кількісне визначення активності** ліхенази проводили шляхом вимірювання кількості вільних редукуючих цукрів після реакції сумарних білкових екстрактів листків з ліхенаном в якості субстрата (Wood and Bhat, 1998). Екстракти отримували, розтираючи рослинний матеріал в однократному об'ємі 100 мМ Tris-HCl буфера (pH 8,0), який мав в своєму складі 0,1 М NaCl, 5 мМ Na_2EDTA і 10мМ β -меркаптоетанол, і центрифугуючи його при 13000 g (4°C) протягом 5 хв. Надосадкову рідину використовували для аналізу. До 20 мкл екстракта додавали 50 мкл 0,5 % водного розчину ліхенана, доводили водою до 500 мкл та інкубували 95 хв за температури 65-70 °С. Потім вносили 500 мкл ДНС-реагента (1% дінитросаліцилової кислоти та 0,05 % сульфата натрію в 1% розчині гідроксида натрію), 165 мкл 40% К-Na-виннокислого та витримували на водяній бані 10 хв за температури 95-100°C. Охолоджували при +4 °С, потім на 15-20 хв залишали при комнатній температурі. Вимірювали оптичну густину розчинів при 510 нм на BioPhotometer (Eppendorf, v.1.35, Німеччина). Концентрацію редукуючих цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованим для глюкози. За одиницю активності приймали активність фермента, що утворює 1 мкмоль редукуючих цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 сек. Питому активність розраховували на кількість білка в зразку.

Визначення антивірусної активності рослинних екстрактів. Інтерфероноподібну активність визначали за методом мікротитрування (Rubinstein et al., 1981), що базується на вивченні здатності екстрактів протидіяти цитопатичному впливу вірусу везикулярного стоматиту (штам Indiana з колекції Інституту мікробіології та вірусології НАНУ) на клітинну культуру тестикул поросят (з колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького). Результати реєстрували за 24 год. За одиницю активності інтерферону приймали розведення зразків, які захищали 50% клітинного моношару від цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту. Активність інтерферону виражали у міжнародних одиницях на грам сирової біомаси листків (МО/ г СБ).

При аналізі експериментальних даних використовували **стандартні методи статистичної обробки результатів** (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генетична трансформація ріпаку

Розробка протоколу трансформації з використанням в якості експлантів листків асептичних рослин. Підібрано умови регенерації ріпаку з

експлантів листків 3–4-тижневих рослин, вирощених в асептичних умовах. Цей підхід дає можливість працювати з незначною кількістю вихідного насіння (при його обмеженні) і використовувати молоді, здатні до активної проліферації і трансформації тканини, а також виключає необхідність стерилізації вихідного матеріалу перед постановкою кожного досліду. Метод листових дисків, запропонований Horsch et al. (1985) для трансформації тютюну, адаптовано нами для тканин ріпаку. При використанні прекультивованих листових пластинок початок регенерації спостерігався за 4–5 тижнів від постановки експерименту при використанні PPT в якості селективного агента, формування пагонів – приблизно за 2 місяці. Запропонована методика запатентована в Україні (патент на корисну модель) (Гочева та ін., 2009).

Трансгенні рослини ріпаку з безпромоторним геном *bar*. В ході роботи було відібрано 88 PPT-стійких незалежних ліній ріпаку, які були отримані на основі двох промислових ярих сортів (Калинівський і ВНІС100) і характеризувались наявністю в своєму геномі гена *nptII* і лише кодуючої послідовності гена *bar*. Регенерація відбувалась на середовищах з PPT. Подібні результати під час трансформації тютюну (Щербак и др., 2005) були отримані раніше. Крім того, було показано, що безпромоторний ген *bar* експресується завдяки оригінальному розташуванню в конструкції, а саме, між двома інвертованими *lox*-сайтами в безпосередній близькості до правої границі T-ДНК (Scherbak et al., 2013). Інтегровані в геном ріпаку гени *nptII* і *bar* зберігали свою активність у наступних поколіннях T₁–T₃.

Отримання біотехнологічних рослин ріпаку з геном *epsps*. Отримано 17 незалежних фосфінотрицинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів, що несуть в своєму ядерному геномі синтетичний ген енолпіруватшкіматфосфатсинтази (*epsps*). Ці рослини характеризувались стійкістю одночасно до двох гербіцидів – BASTA і Roundup. Наявність інтегрованого гена *epsps* показана за допомогою ПЛР, синтез матричної РНК продемонстровано в результаті проведення ПЛР зворотніх транскриптів. Відібрано шість гомозиготних ліній ріпаку, отриманих на основі сорту Ексголд, які є стійкими до обробки гліфосатом в умовах теплиці. Експресія гетерологічних генів зберігалась у поколіннях T₁–T₂, отриманих в результаті самозапилення в умовах теплиці.

Отримання рослин ріпаку з геном *desC* ціанобактерії. Показано, що у разі одночасного введення чотирьох генів у двох незалежних векторах (pCB133 і pBISN-*desC::licBM3*; рис.1) вдалося отримати рослини, у яких гетерологічні гени були функціональними. Активність гена *epsps* в рослинах ріпаку підтверджена на рівні транскрипції в результаті ПЛР зворотніх транскриптів, в умовах *in vitro* при культивуванні на безгормональному середовищі з N-фосфометілгліцином (2,5 мг/л) і після обробки рослин гербіцидом Ураган Форте у теплиці. Ген *desC* десатурази Δ9 ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* був злитий в одній рамці зчитування з репортерним геном термостабільної ліхенази (*licBM3*) *Clostridium thermocellum*. Наявність послідовності гена *licBM3* в складі гібридного продукту дозволило якісно (за допомогою чашечного теста) і кількісно (фотометрично) оцінити експресію злитого з ним

гена десатурази. Прослідковано успадкування інтегрованих генів та їхня експресія в першому поколінні, отриманому в результаті самозапилення первинних трансформантів за умов закритого ґрунта.

Показано, що введення гена *desC* *Synechococcus vulcanus* в рослини ріпаку приводило до зменшення вмісту насичених (C16:0, на 16%) і збільшення вміста триєнових (C16:3, на 33%, і C18:3, на 0,08%) жирних кислот, підвищення вміста жирних кислот і індекса ненасиченості в листках деяких трансгенних ліній (18b і 18a/6).

Рослини ріпаку з геном альфа-2b інтерферону людини. Показано, що біотехнологічні лінії мають різну інтерфероноподібну активність (рис.2), визначену як здатність листових екстрактів пригнічувати цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматиту у культурі тестикул поросят.

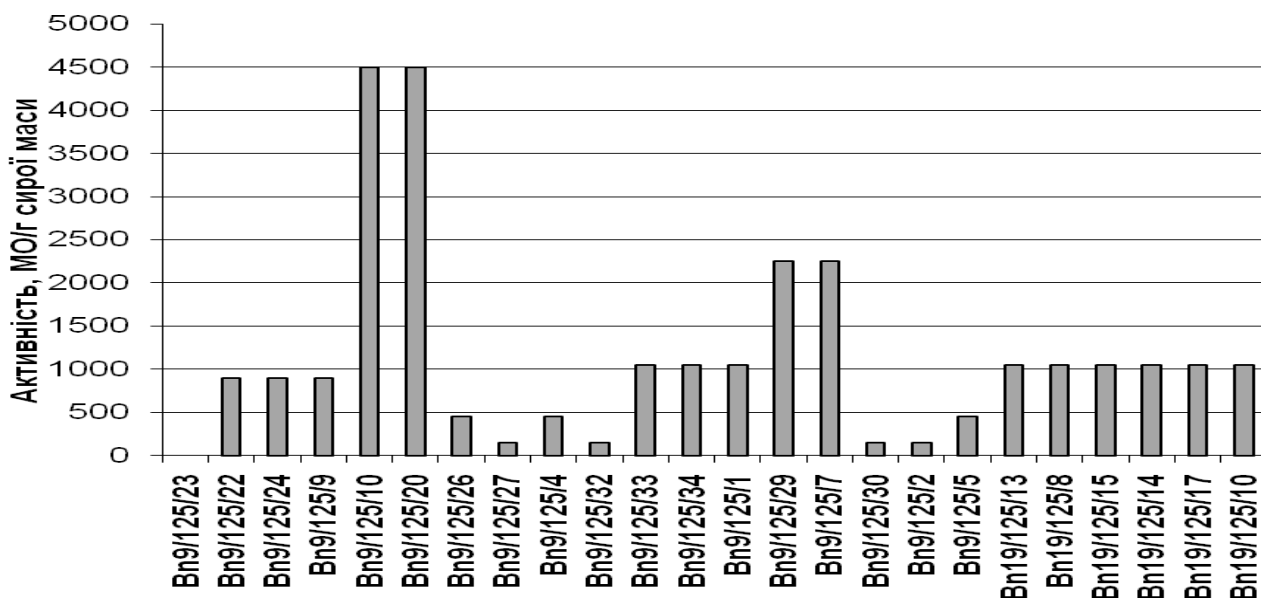


Рис.2. Інтерфероноподібна активність у первинних трансформантах ріпаку за результатами тесту на здатність листових екстрактів пригнічувати цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматиту в клітинах тестикул поросят.

Максимальне значення її дорівнювало 4500 МО/г сирі маси. Створені лінії ріпаку мали також таку біохімічну особливість як підвищена антиоксидантна активність тканин листків за умов вирощування *in vitro* та *in vivo* (в ґрунті в теплиці).

Біотехнологічні рослини ріпаку з геном сур11A1. Отримано трансгенні рослини ріпаку з геном тваринного походження *сур11A1*, які експресують також ген *bar*. За допомогою ПЛР показано наявність гетерологічних генів. Активність гена *bar* підтверджена в асептичних умовах при пророщуванні насіння на середовищах з фосфінотрицином (PPT) і в умовах теплиці при обприскуванні рослин гербіцидом БАСТА. Рослини характеризувались підвищеним до 30% вмістом білка у листках, підвищеною антиоксидантною активністю, незмінним вмістом аскорбінової кислоти. Інтеграція гена *сур11A1*

цитохрому P450_{SCC} тваринного походження в ядерний геном ріпаку вплинула на кількісний склад жирних кислот в його насінні. У трансгенному насінні вміст олеїнової кислоти підвищувався максимально на 6% (до 72,67 моль%) і вміст ліноленої кислоти зменшувався майже вдвічі (до 3,89 моль%) (рис.3). Загальна кількість жирних кислот залишалась на рівні контрольних рослин.

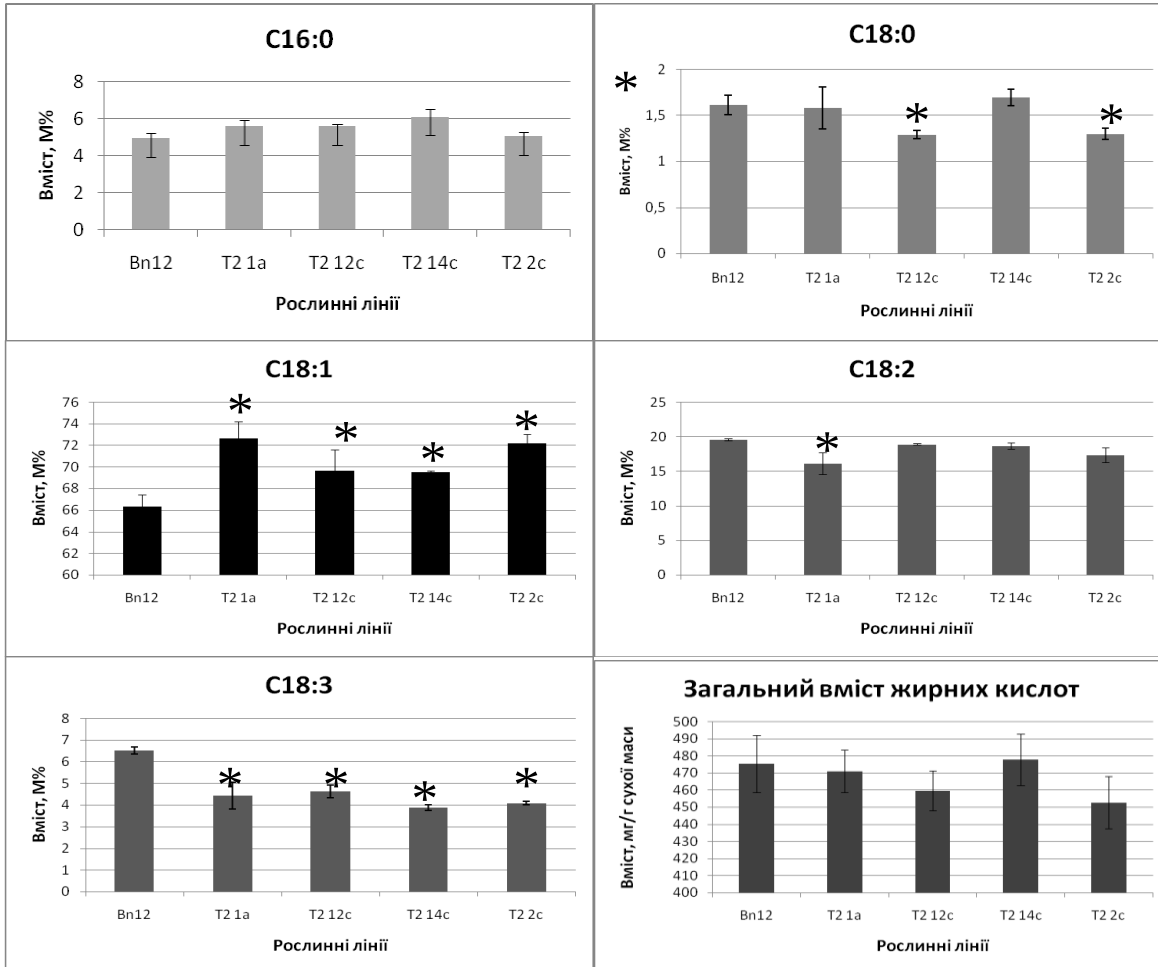


Рис.3. Вміст окремих жирних кислот (16:0 – пальмітинова, 18:0 – стеаринова, 18:1 – олеїнова, 18:2 – лінолева, 18:3 – ліноленова кислота) та їх загальний вміст в насінні ріпаку: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – гомозиготні трансгенні лінії другого покоління. Різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна при P ≤ 0,05.

Активність супероксиддисмутази в трансгенних рослинах ріпаку

Активні форми кисню (АФК) постійно генеруються у рослинних клітинах у результаті фотосинтезу, фотодихання, β-окиснення жирних кислот. Умови оточуючого середовища, такі як екстремальні температури, водний дефіцит або надлишок води, особливо у поєднанні із високою інтенсивністю світла, і деякі патогени можуть провокувати окисдаивне пошкодження за рахунок надпродукції АФК. Першим ферментом у процесі детоксикації АФК виступає супероксиддисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1). Вона перетворює супероксид-радикали (O₂⁻) на перекис водню та кисень.

Показано відмінності за активністю СОД серед сортів ріпаку, задіяних у експериментах з трансформації (рис.4). Спостерігали відсутність достовірних відмінностей за активністю СОД в листках рослин ріпаку з трансгенами *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC::licBM3* у порівнянні з нетрансформованими за сприятливих умов росту (рис.4). Всі трансгенні рослини ріпаку, отримані в наших експериментах, експресують ген *bar*. Продукт гена *bar* – це ензим, який ацетилює фосфінотрицин або диметилфосфінотрицин (D'Halluin et al., 1992). Він забезпечує стійкість до відповідних гербіцидів, наприклад, BASTA. Реакція ацетилювання і експресія гена *bar* не супроводжуються продукуванням супероксид-радикалів.

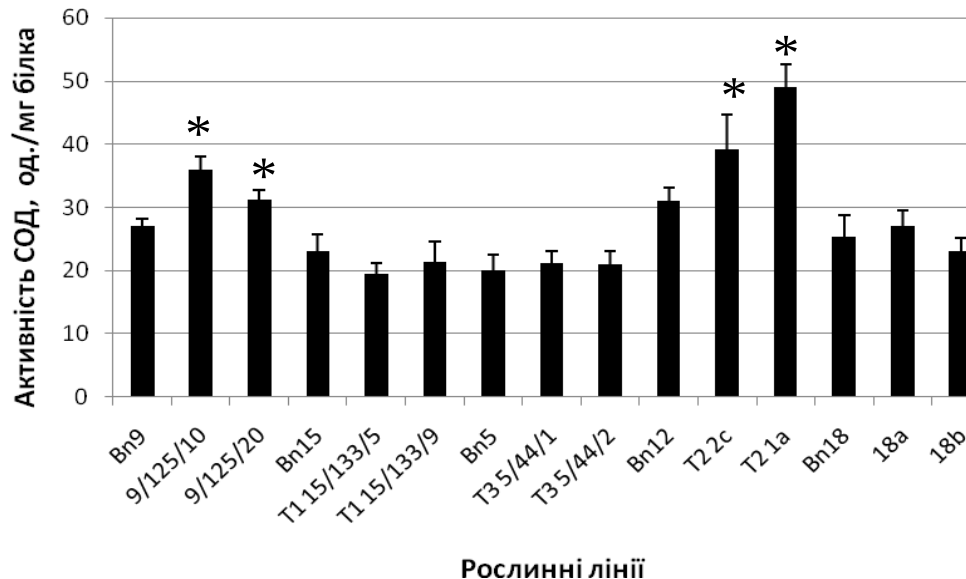


Рис.4. Активність СОД в трансгенних і нетрансформованих рослинах ріпаку за нормальних умов культивування *in vitro*.

Ген *epsps* кодує 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат (EPSP) синтазу, що каталізує наступну реакцію: фосфоенолпіруват+3-фосфошкімат $\rightleftharpoons$ фосфат+5-енолпірувілшкімат-3-фосфат (EPSP) (Funke et al., 2006). Експресія синтаз, зокрема EPSPS, не створює передумов для продукування O_2^- і змін у активності СОД.

Десатурази жирних кислот каталізують реакцію перетворення одинарного зв'язку між атомами вуглецю в ацильному ланцюзі (C-C) у подвійний (C=C) (Los, Murata, 1998). На прикладі трансгенних рослин тютюну було показано, що активність гена *desC* забезпечує переваги за умов низької температури. У цих рослин активність СОД підвищується під час стресу більше, ніж у контрольних рослин (Герасименко и др., 2015). Але за нормальних умов активність СОД у рослинах тютюну з геном *desC* не відрізнялась від такої в контрольних (Porov et al., 2006), як і в наших рослинах ріпаку.

За тих же умов у рослин з генами *sup11A1* і *HuInf-α2b* активність СОД була підвищена порівняно з контрольними (рис.4).

Ген *sup11A1* кодує цитохром P450_{SCC} із мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби. У ссавців цитохром P450_{SCC} каталізує триетапне

окиснення холестерина у прегненолон (Chung et al., 1986). В ході цих реакцій можливе утворення супероксид-радикалів. Активність СОД у рослин ріпаку з геном *sur11A1* може зростати за рахунок експресії гетерологічного білка P450_{SCC}.

У рослин ріпаку з геном *HuInf-α2b* активність СОД зростала максимально у 1,33 рази. Подібні результати зафіксовані щодо трансгенних рослин цикорію з геном альфа-2b інтерферону людини (Kvasko, Matvieieva, 2013). В клітинах тварин обробка екзогенним альфа-інтерфероном супроводжувалась утворенням супероксид-радикалів і підвищенням активності СОД (Al-Shabanah et al., 1999, Lu et al., 2002). Таким чином, саме експресія гетерологічного білка (альфа-2b інтерферону людини) може бути причиною зростання активності СОД за нормальних умов росту в отриманих нами трансгенних рослинах ріпаку.

Вплив екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку

Вплив обробки насіння ріпаку розчином інтерферону людини на фізіологічні і біохімічні параметри проростків. Вплив обробок інтерферонами (ІНФ) у будь-якій формі на фізіологічні і біохімічні параметри цілих рослин або насіння на сьогодні не вивчений. Результати визначень біомаси проростків, сумарного розчинного білка і активності СОД у проростків, які не оброблялись розчинами інтерферону альфа-2b людини або були витримані у розчинах інтерферону різної концентрації представлено на рис.5.

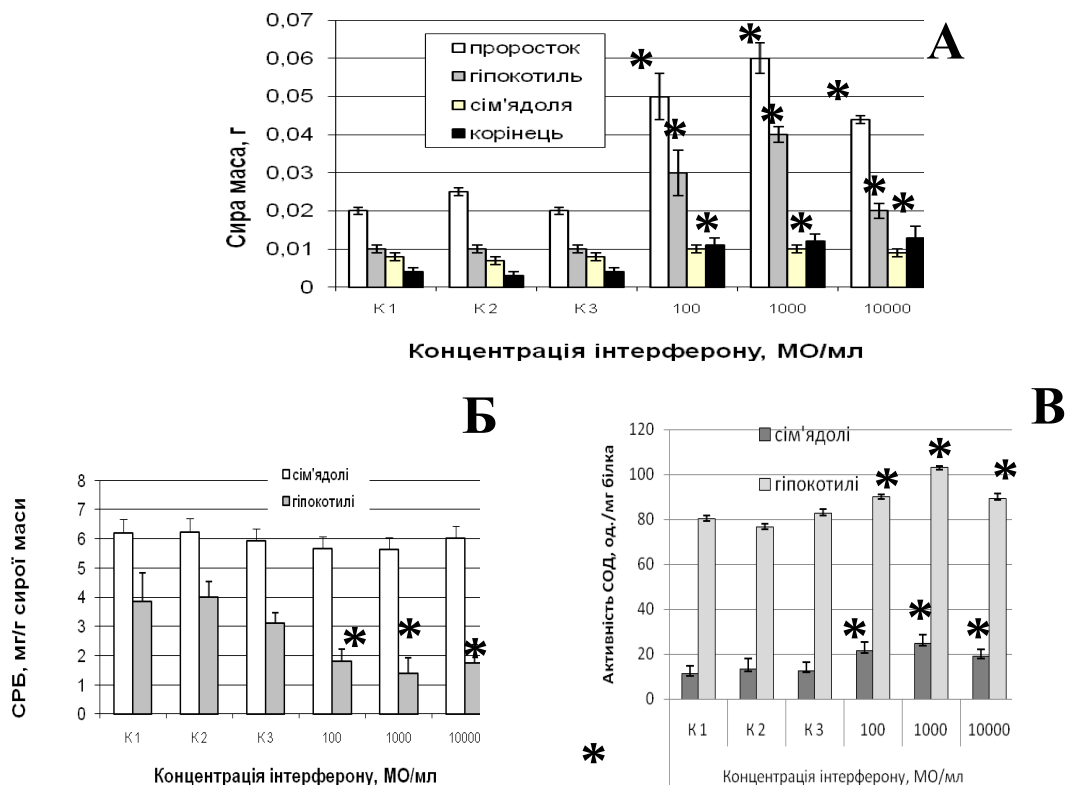


Рис.5. Приріст сирої біомаси (А), вміст СРБ (Б) і активність СОД (В) 7-добових проростків ріпаку, отриманих з насіння після обробки розчинами інтерферону альфа-2b людини.

Обробка насіння ріпаку розчинами рекомбінантного альфа-2b інтерферону людини приводила до збільшення біомаси 7-добових проростків, культивованих *in vitro* (до 2,4 разів) (рис.5). Крім того, виявлено позитивну кореляцію між ростом сирої біомаси і активністю СОД.

Вплив обробки пагонів ріпаку розчином інтерферону на ріст в асептичних умовах (сприятливі умови та осмотичний стрес). Показано, що інтерферон альфа-2b людини позитивно впливає на ростові і біохімічні характеристики (сира біомаса, вміст СРБ і фотосинтетичних пігментів) рослин ріпаку, оброблених розчином інтерферону як за нормальних умов росту, так і при осмотичному стресі в асептичних умовах (рис.6).

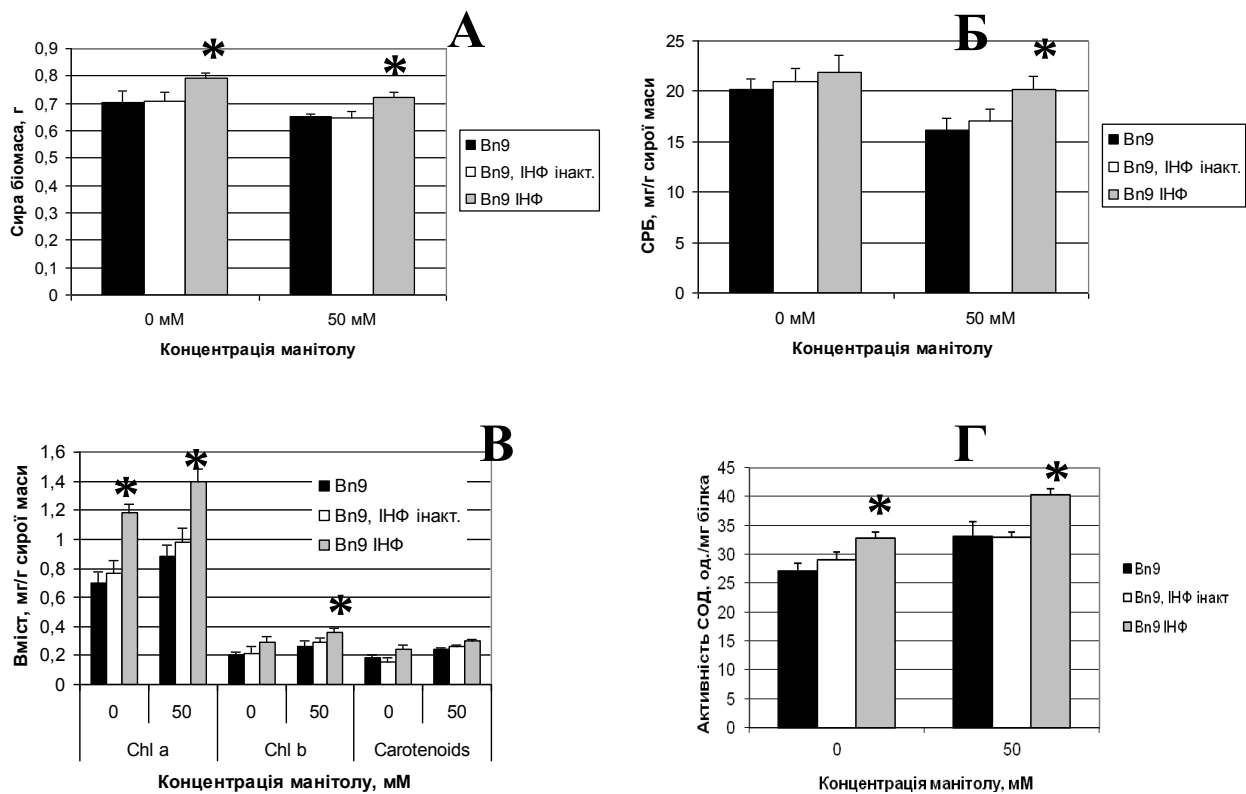


Рис. 6. Сира біомаса (А), СРБ (Б), вміст хлорофілів і каротиноїдів (В) та активність СОД (Г) асептичних пагонів ріпаку, оброблених розчином інтерферону, за два тижні росту. Bn9, Bn9 інакт., Bn9 ІНФ – пагони ріпаку сорту Магнат після обробки водою; розчином інтерферону, інактивованим кіп'ятінням, або розчином інтерферону з концентрацією 10^3 МО/мл, відповідно.

Таким чином, можна стверджувати, що особливості проаналізованих проростків і рослин ріпаку залежать від підвищення продукування в них супероксиду під впливом екзогенного інтерферону, ймовірно, за рахунок активації НАДФН-оксидаз, що, в свою чергу, веде до росту активності СОД.

Трансгенні рослини в умовах абіотичних стресів

Рослини ріпаку з lox-залежною експресією гена *bar* за умов росту на середовищах з додаванням фосфінотрицину. Рослини ріпаку з lox-залежною експресією гена *bar* зберігали стійкість до фосфінотрицину в поколінні T_3 в асептичних умовах. Показано, що трансгенні рослини не відрізнялись

достовірно від нетрансформованих за сировою біомасою і вмістом СРБ, а також за активністю СОД і загальною антирадикальною активністю проти DPPH-радикала в умовах росту без стресу (без гербіциду) (рис.7). Крім того, не спостерігалось достовірної різниці між накопиченням біомаси і СРБ у трансгенних рослин, які культивувались як на середовищі без гербіциду, так і при додаванні його в концентрації, яка вдвічі перевищує селективну.

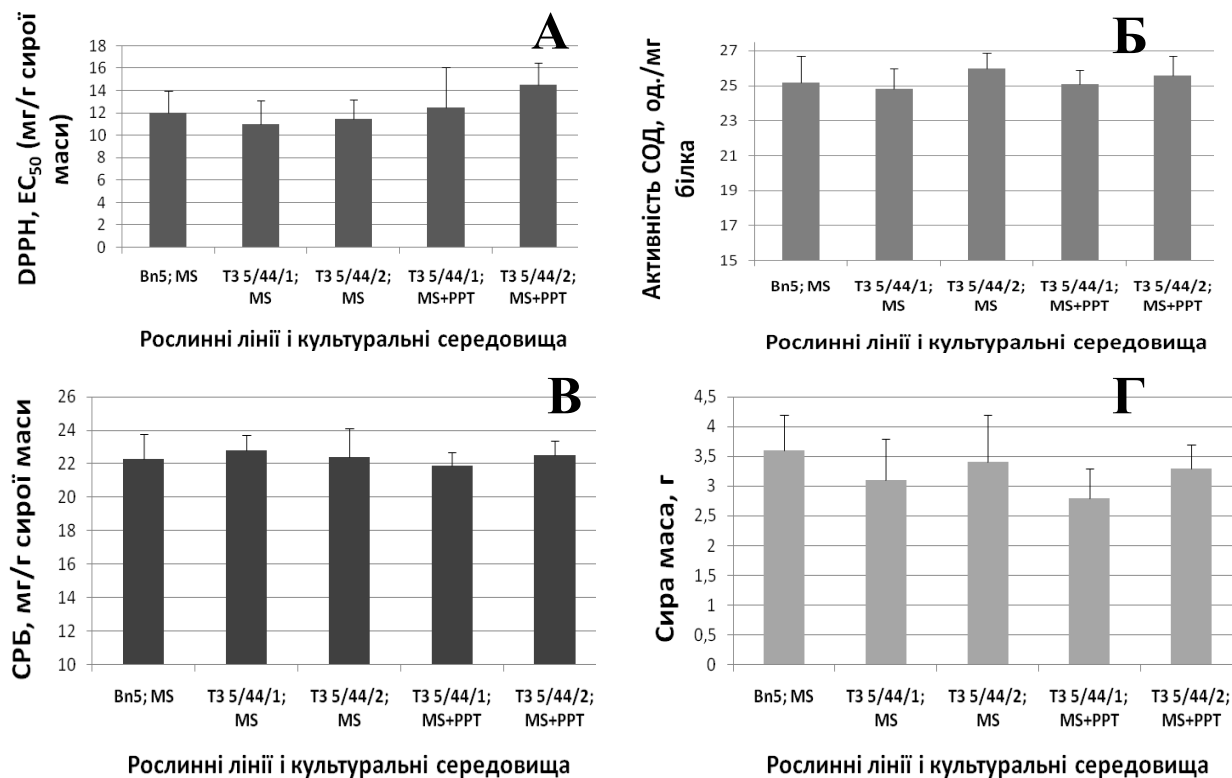


Рис.7. Антирадикальна активність ((DPPH), А), активність СОД (Б), вміст СРБ (В) і сира біомаса (Г) рослин ріпаку з безпромоторним геном *bar* за нормальних умов росту *in vitro* (середовище MS) та за наявності гербіцида фосфінотрицина (PPT). Bn5 – контрольні рослини сорту Калинівський, T₃5/44/1 і T₃5/44/2 – трансгенні лінії третього покоління, отримані в результаті самозапилення первинних трансформантів.

Рослини ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів на основі глюфозінату і гліфосату. Трансгенні рослини ріпаку, які експресують гени *bar* та *epsps* одночасно (рис.8), у другому поколінні не відрізнялися від нетрансформованих контрольних рослин за антиоксидантною активністю, виміряною через показники активності СОД і загальної антирадикальної активності у листках асептичних рослин (рис.9) і вмістом СРБ (табл.1). Рослини ріпаку, що несуть гени стійкості до гербіцидів з діючими речовинами гліфосат і глюфозінат, є подібними до рослин, залучених до трансформації, і у них не спостерігаються непередбачувані біохімічні зміни. Інтеграція генів стійкості до гербіцидів не надає рослинам додаткових переваг за умов стресу (обробка гербіцидами).

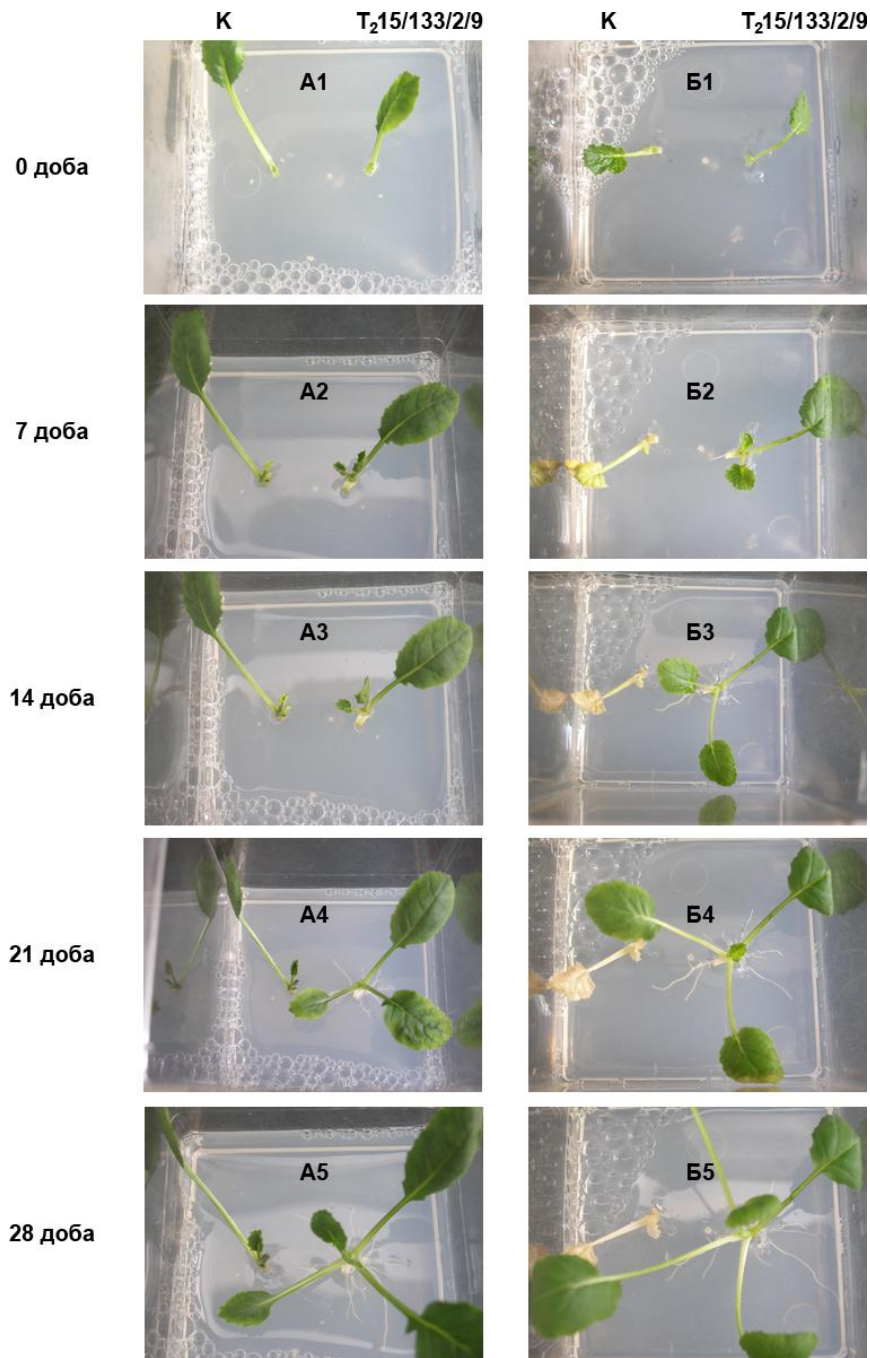


Рис. 8. Ріст біотехнологічних рослин ріпаку з генами *epsps* і *bar* на середовищах з гліфосатом (2 мг/л) і PPT (10 мг/л): A1-A5 і B1-B5 – доба росту (0 – початок експерименту; 7, 14, 21 і 28 доба); К – контрольна нетрансформована рослина сорту Ексголд; T₂15/133/2/9 – трансгенна лінія другого покоління.

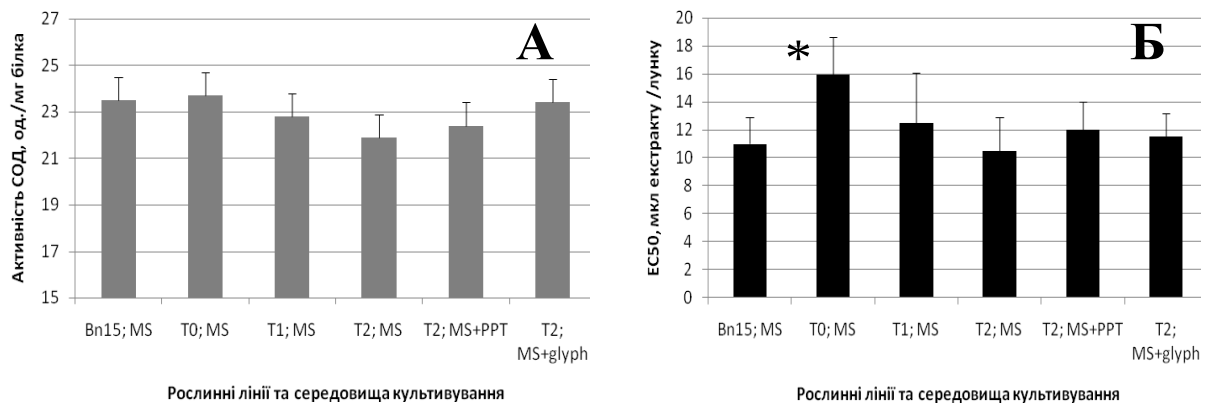


Рис. 9. Активність СОД (А) і загальна антирадикальна активність (Б) тканин листків ріпаку. Bn15 – сорт Ексголд, контроль, T₀, T₁, T₂ – лінії T₀15/133/2, T₁15/133/2/9 і T₂15/133/2/9, відповідно.

Таблиця 1

СРБ у листках асептично вирощених 4-тижневих рослин ріпаку

Назва лінії	СРБ, мг/г сирової маси		
	Без гербіцидів	PPT	Гліфосат
Вп15 (сорт Ексголд, контроль)	24,15±1,3	н.в.	н.в.
T ₂ 15/133/2/9	23,86±1,5	23,74±1,2	23,96±1,4
T ₁ 15/133/2/9	24,2±0,9	н.в.	н.в.
T ₀ 15/133/2	23,85±1,1	н.в.	н.в.

Рослини ріпаку з цільовим геном *desC* за дії низьких позитивних температур. В попередніх експериментах встановлено, що ген десатурази ціанобактерії інтегровано до ядерного геному ріпаку, і він функціонує, що приводило до збільшення вмісту ненасичених жирних кислот. Однак трансгенні рослини не відрізнялись за накопиченням біомаси, вмістом СРБ і активністю СОД від контрольних рослин при рості за температури 22°C, після переходу на 4°C і за умов наступного повернення до вихідної температури (рис.10).

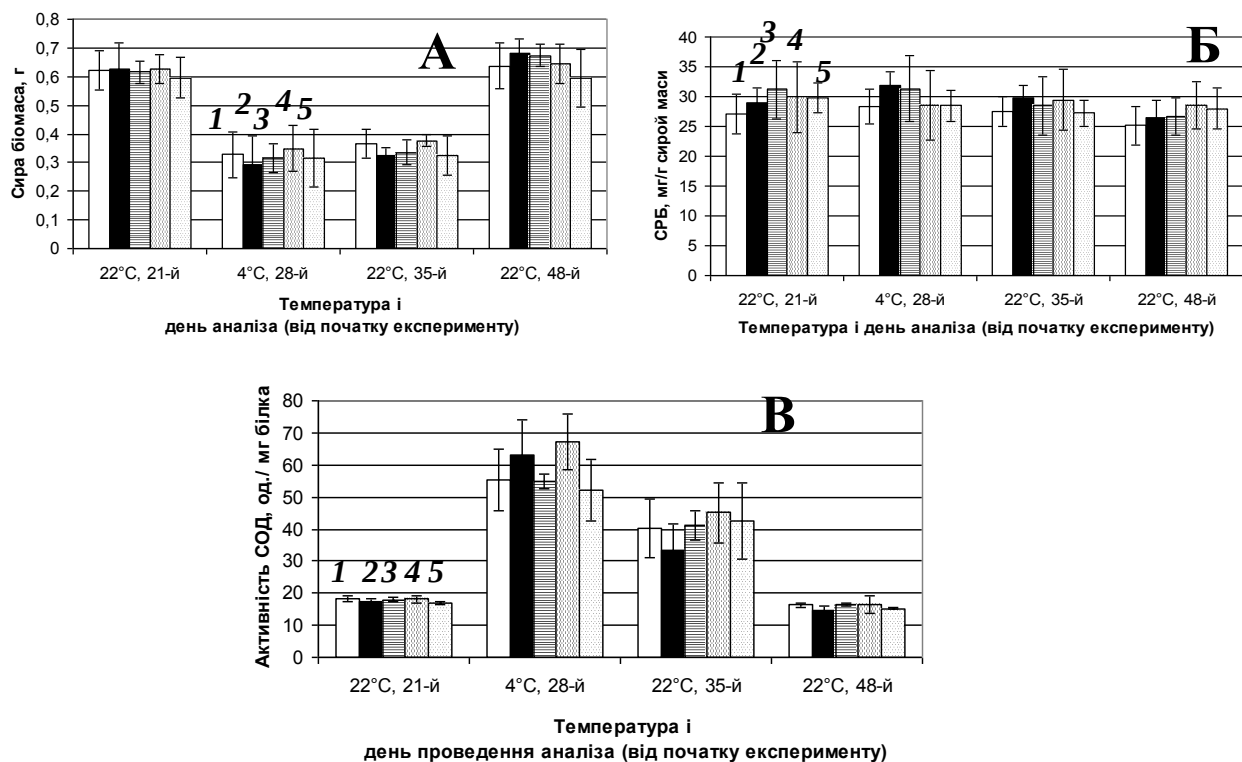


Рис.10. Сира біомаса (А), вміст СРБ (Б) і активність СОД (В) у рослин ріпаку з геном *desC* ціанобактерії. Цифрами позначено: 1 – контроль, нетрансформовані рослини сорта Обрій; 2, 3 – первинні трансформанти ліній 18a і 18b; 4, 5 – трансформанти першого покоління ліній 18a/6 і 18b/25.

Виявилось, що збільшення вмісту ненасичених жирних кислот, яке відбувається, головним чином, за рахунок пальмітліноленової кислоти (C16:3, до 33 %), недостатньо для підвищення толерантності ріпаку до знижених температур. Можливо, робота даного фермента в ендоплазматичному

ретикулюмі неефективна. Утворення першого подвійного зв'язку у насичених жирних кислотах відбувається, головним чином, у хлоропластах. Для більш суттєвого впливу додаткового гена $\Delta 9$ десатурази на жирнокислотний склад ліпідів мембран, мабуть, необхідне спрямування кінцевого продукту у хлоропласти, що можна здійснити шляхом введення послідовності відповідного сигнального пептида до Т-ДНК вектора. Однак має місце повідомлення щодо рослин тютюну, які стабільно експресували трансген *desC* із *S.vulcanus* після агробактеріальної трансформації і характеризувались підвищенням толерантності до холоду (Orlova et al., 2003), хоча не було заявлено про наявність хлоропластного спрямування чужорідного білка. Ймовірно, зміни у складі жирних кислот цих рослин більш суттєві для них як рослин теплолюбних. Для ріпаку, можливо, вони повинні бути більш радикальними.

Рослини з геном *desC* ціанобактерії за умов високотемпературного тесту. Гетерологічна експресія гена *desC* бактеріального походження у рослинах ріпаку за умов короткотривалого високотемпературного стресу не впливала на такі показники як вміст фотосинтетичних пігментів і співвідношення хлорофілів, вміст СРБ, активність СОД (рис.11).

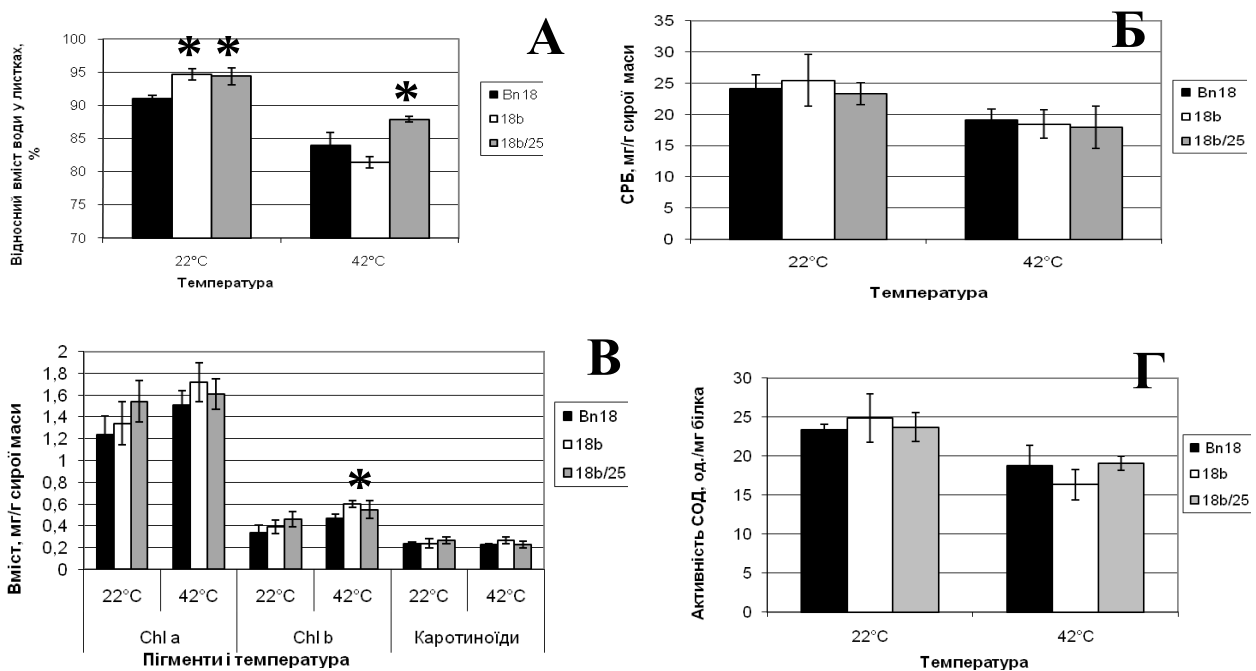


Рис. 11. Відносний вміст води (А), вміст СРБ (Б) і фотосинтетичних пігментів (В) та активність СОД (Г) у листках ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Для трансгенних рослин зафіксовано достовірно на 6% вищий відносний вміст води у листках за нормальних умов росту. Підйом температури приводив до зменшення відносного вмісту води у всіх тестованих рослин на 8%-12%. Рослини трансгенної лінії 18b/25 зберігали відносний вміст води у листках на

5% вищим ($87,91 \pm 0,43\%$), ніж у контрольних рослин ($84,0 \pm 1,97\%$) під час високотемпературного стресу. Лінія 18b достовірно не відрізнялась за цим показником від нетрансформованих рослин.

Гетерологічна експресія гена *desC* не змінювала якісного і кількісного складу жирних кислот у листі та індекс ненасиченості мембранних ліпідів (рис.12).

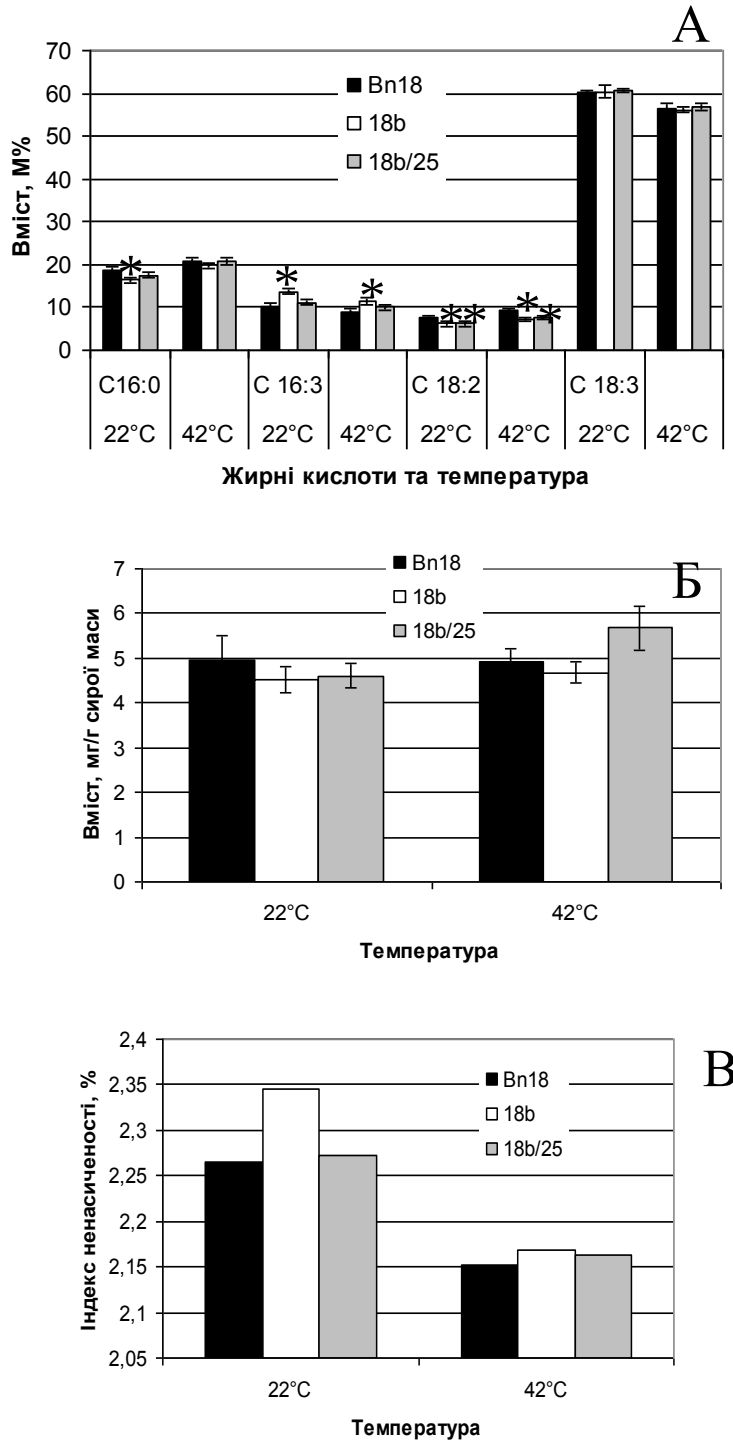


Рис. 12. Жирнокислотний склад ліпідів (А), вміст жирних кислот (Б) та індекс ненасиченості мембранних ліпідів (В) в листках рослин ріпаку з геном *desC* ціанобактерії до (температура 22°C) та після (температура 42°C) теплового шоку.

Гетерологічна експресія гена *desC* бактеріального походження не надає переваг рослинам ріпаку за умов підвищених температур, але і не приводить до погіршення відповіді трансгенних рослин на високотемпературний шок.

Рослини з геном *desC* за умов осмотичного стресу. Рослини ріпаку з геном *desC*, які крім цього гена мають і експресують ще гени *bar*, *epsps*, *nptII* і *licBM3*, не відрізнялись від нетрансформованих за накопиченням біомаси, вмістом СРБ і активністю СОД за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом в середовищі культивування (рис.13).

Введення цих гетерологічних генів бактеріального походження додатково не змінювало адаптивної пластичності рослин ріпаку, крім забезпечення стійкості до гербіцидів на основі РРТ і гліфосату.

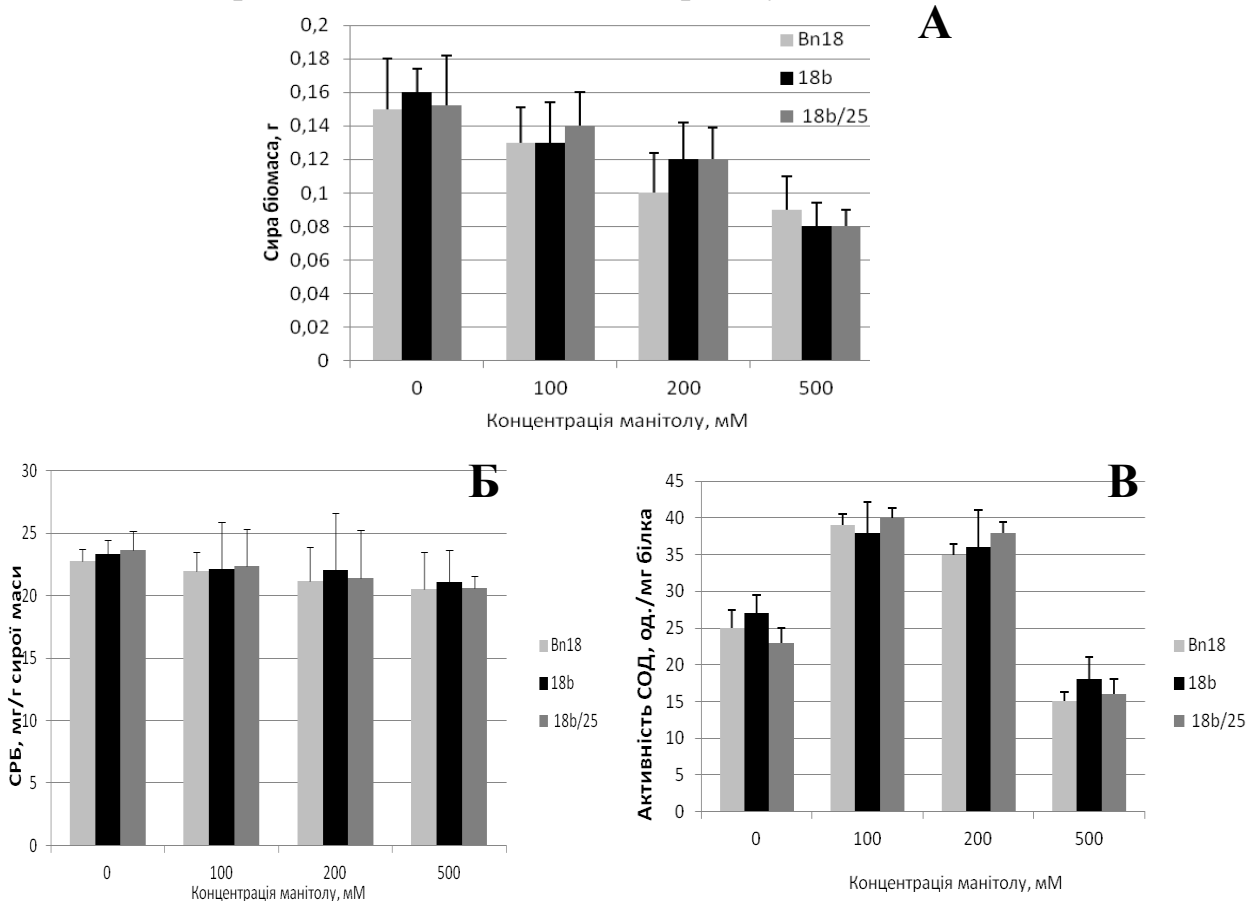


Рис.13. Сира біомаса (А), СРБ (Б) і активність СОД (В) у листках рослин ріпаку з геном *desC* і контролі за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини за умов осмотичного стресу. Показано позитивний вплив трансгенного ІНФ альфа-2b людини на ріст рослин ріпаку в умовах осмотичного стресу, який був індукований додаванням 50 мМ манітолу до середовища культивування і аналізований за здатністю накопичувати ними біомасу в умовах *in vitro*, вмістом СРБ, вмістом хлорофілів та каротиноїдів і активністю СОД (рис.14).

Дві тестовані трансгенні лінії з найвищою інтерфероподібною активністю екстрактів тканин листка (4500 МО/мг сирої маси) характеризувались здатністю до формування на 18-20% більшої біомаси за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу у порівнянні з

нетрансформованими; не відрізнялись від контрольних за рівнем СРБ в умовах без стресу і не знижували, як контрольні, накопичення СРБ в умовах осмотичного стресу; трансгенні рослини мали більший вміст фотосинтетичних пігментів і характеризувались підвищеною активністю фермента антиоксидантного захисту – СОД. Експресія гена інтерферону людини підвищує толерантність трансгенних рослин до осмотичного стресу та їх адаптивну пластичність.

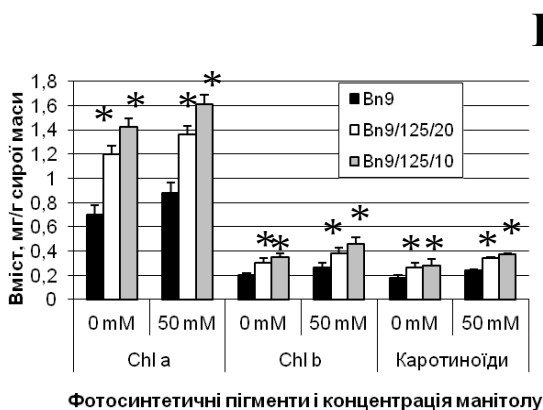
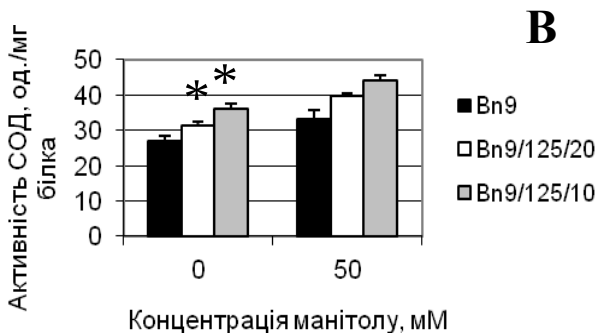
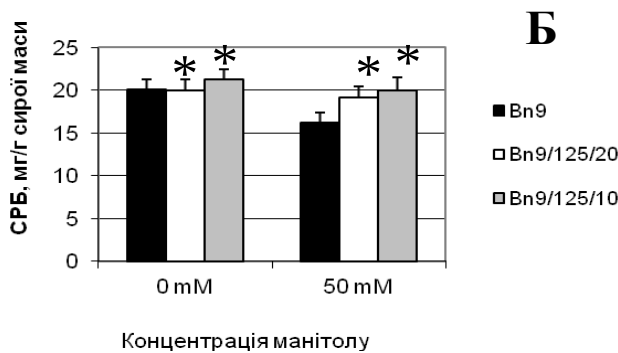
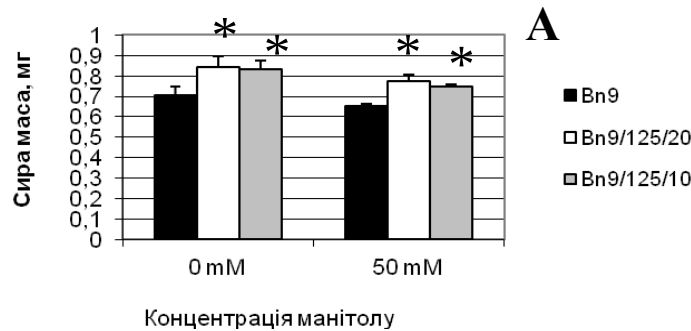


Рис.14. Сира біомаса (А), СРБ (Б), активність СОД (В) і вміст фотосинтетичних пігментів (Г) в екстрактах з листків рослин ріпаку за фізіологічних умов і за умов осмотичного стресу (50 мМ манітолу): Bn9 – нетрансформовані рослини, сорт Магнат, Bn9/125/20 і Bn9/125/10 – трансгенні лінії з геном інтерферону альфа-2b людини.

Особливості рослин ріпаку з геном *sur11A1*. Проростання насіння за підвищеної температури. Як аналізований матеріал було задіяне насіння (T_2) чотирьох гомозиготних трансгенних ліній ріпаку, отримане в результаті самозапилення первинних трансформантів в умовах теплиці.

Показано, що за умов підвищеної температури насіння двох з чотирьох аналізованих трансгенних рослин з геном *sur11A1* (друге покоління від самозапилення) проростало краще, ніж насіння нетрансформованих рослин. Це підтверджено результатами вимірювання сирої біомаси, довжини коренів і гіпокотилів, вмістом СРБ у проростках і активністю СОД (рис.15).

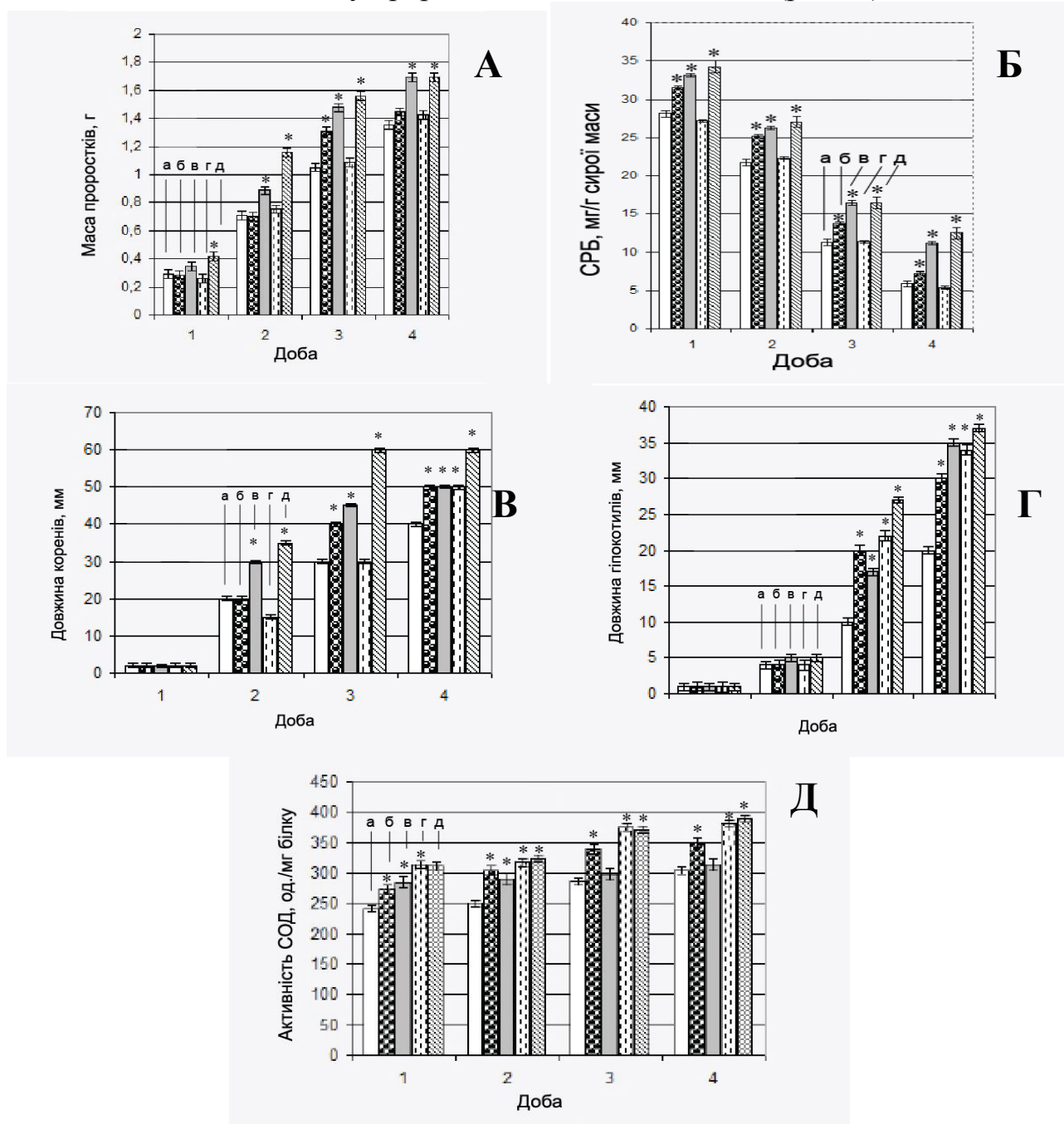


Рис.15. Динаміка змін маси (А), вмісту СРБ (Б), довжини коренів (В) і гіпокотилів (Г) та активності СОД (Д) у контрольних і трансгенних проростків: а – Вn12(к), контроль; б, в, г, д – трансгенні лінії T_{212c} , T_{21a} , T_{214c} , T_{22c} . * – відмінності достовірні за $P < 0,05$.

На четверту добу пророщування в термостаті без світла проростки ліній T₂1a і T₂2c накопичували біомасу, яка була на 25% більшою порівняно з такою у контрольних проростків. Накопичення більшої біомаси супроводжувалось достовірно вищим зростанням активності СОД у цих проростків за умов стресу. Проростки ліній T₂12c і T₂14c не відрізнялись достовірно від нетрансформованих проростків сорту Марія за параметрами, що тестувались.

Стійкість рослин з геном *sur11A1* до осмотичного стресу *in vitro*. Матеріалом, що аналізували, слугували рослини ярого ріпаку сорту Марія (тип “00”, стійкість до посухи 8,8 бала за 10 бальною шкалою) (контроль) і трансформанти другого покоління з геном *sur11A1* – рослини ліній T₂1a і T₂2c. Рослини ріпаку з трансгеном *sur11A1*, тестовані в наших експериментах, продукували більше сирі біомаси (до 30%) за відсутності осмотичного стресу *in vitro* та зменшували її в умовах стресу (рис.16, А). Однак вони були здатні накопичувати біомасу, характерну для контрольної лінії, починаючи з нижчих концентрацій манітолу.

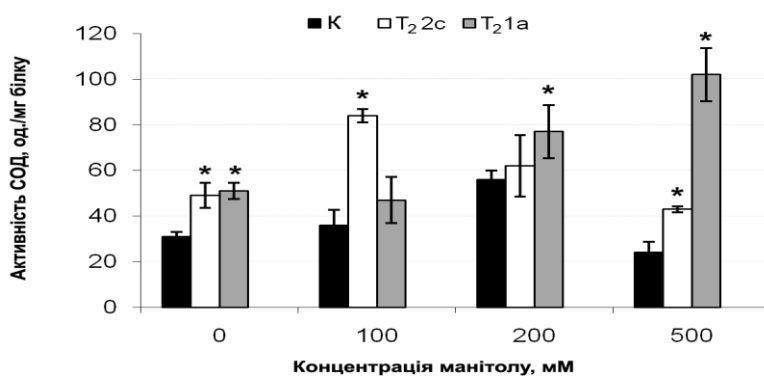
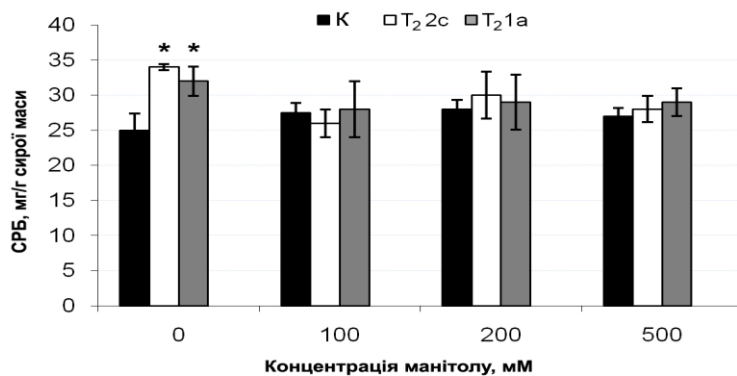
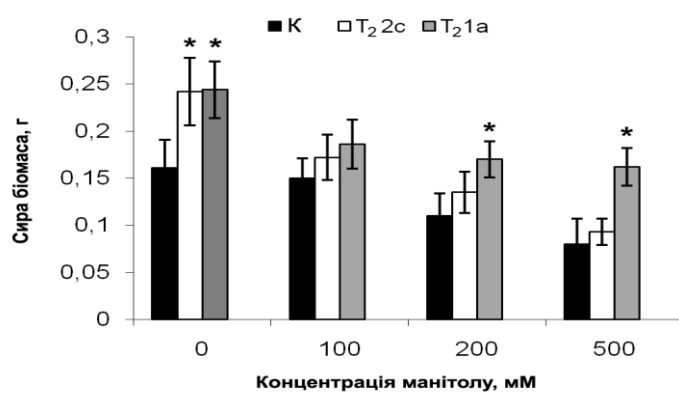


Рис.16. Сира біомаса (А), вміст СРБ (Б) і активність СОД (В) в листках рослин ріпаку з геном *sur11A1* і контрольних рослин в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом: Bn12 – контрольна лінія, T₂1a і T₂2c – лінії з геном *sur11A1*. *- відмінності достовірні в порівнянні з контролем за $P \leq 0,05$.

Одна з аналізованих трансгенних ліній (T₂1a) демонструвала здатність до продукування збільшеної сирової маси за умов сильного осмотичного стресу (200мМ і 500 мМ манітола) у порівнянні з контролем. Це вказує на те, що експресія гена *суп11А1* тваринного походження впливає на здатність до накопичення біомаси рослинами ріпаку в умовах осмотичного стресу *in vitro*. Аналізовані нами рослини ріпаку з геном *суп11А1* демонструють стабільне, на рівні контрольних рослин, накопичення білка у тканинах листків протягом росту в заданих стресових умовах (рис.16, Б).

Рослини ріпаку з геном *суп11А1* відрізнялись від нетрансформованих підвищеним вмістом СРБ за нормальних умов росту. Осмотична дія манітолу приводила до зниження вмісту СРБ у трансгенних рослин до рівня контрольних.

Трансгенні рослини цієї групи характеризувались підвищеною активністю СОД (до 58%) за відсутності осмотичного стресу (рис.16, В). Активність СОД зростала у більш чутливої до стресу лінії T₂2с при рості на середовищах з підвищеним осмотичним тиском (100 мМ і 200 мМ манітолу) та падала за умов гіперстресу (500 мМ манітолу). У трансгенної лінії T₂1a спостерігали ріст активності СОД за умов сильного осмотичного стресу, що поєднувалось зі здатністю формувати більшу біомасу за цих умов у порівнянні з контролем.

Таким чином, осмотичний стрес пригнічував ріст як контрольної, так і трансгенних ліній ріпаку з геном цитохрома Р450_{scs} тваринного походження. Але лінія T₂1a була здатна накопичувати біомасу в умовах сильного осмотичного стресу, подібну до такої, що її формували контрольні рослини за нормальних умов (рис.16, А).

Ріпак з геном *суп11А1* за умов високотемпературного стресу. Конститутивна експресія гена *суп11А1* забезпечувала більш високий відносний вміст води у листі у порівнянні з контрольними рослинами під час високотемпературного стресу в кліматичній камері (рис.17, А).

Загальна кількість жирних кислот у листках була достовірно нижчою на ~ 27 % у трансгенних листках, ніж у контролі за нормальної температури у кліматичній камері (рис. 17, Б). У результаті підвищення температури вона зменшувалась у контролі на 33%, в той же час не змінювалась у трансгенних *суп11А1* рослинах. За температури 42 °С загальна кількість жирних кислот у трансгенних рослинах на 20–25% перевищувала показник контролю. Зниження вмісту пальмітолеїнової кислоти у листках і індекса ненасиченості разом зі збільшенням вмісту пальмітинової кислоти характерно для біотехнологічних рослин з трансгеном *суп11А1* порівняно з контролем (рис.17, В).

Активність СОД у трансгенних листках була на 76% вищою, ніж у нетрансформованих рослин, за температури 22 °С і не змінювалась за високої температури (рис.17, С). Вміст Chl *a* і каротиноїдів збільшувався протягом стресу, причому підвищення було більш вагомим у контролі. Вміст Chl *b* залишався без змін за виключенням підвищення у трансгенної лінії T₂1a до рівня контролю.

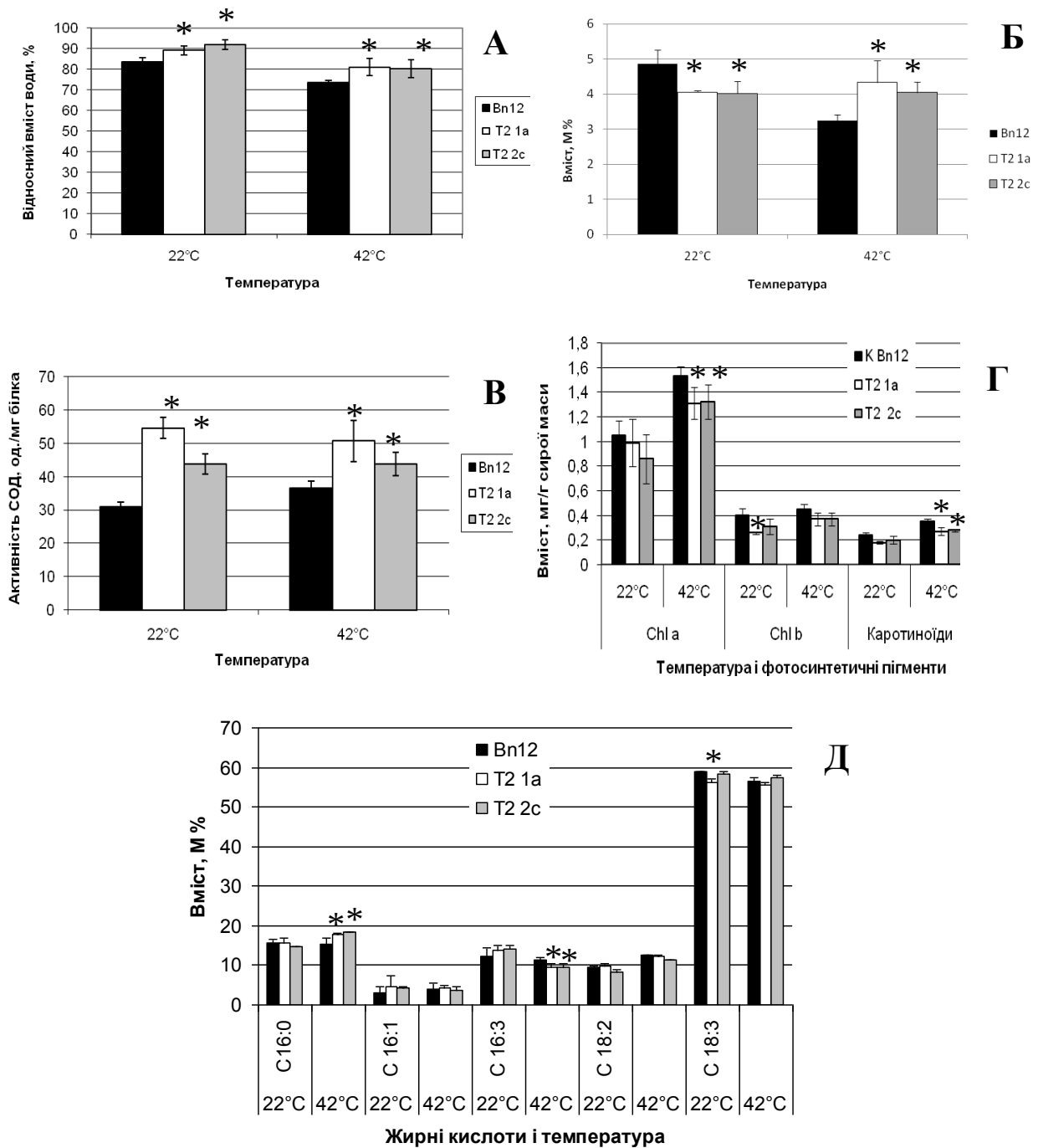


Рис.17. Відносний вміст води (А), загальний вміст жирних кислот (Б), активність СОД (В), вміст фотосинтетичних пігментів (Г) і жирнокислотний склад ліпідів в листках (Д) ріпаку до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: T₂1a і T₂2c – гомозиготні лінії *sur11A1* другого покоління, Bn12 – нетрансформований контроль, сорт Марія.

Рослини *sur11A1* виявляють себе більш витривалими за умов високотемпературного стресу. Оскільки раніше показана кореляція між результатами високотемпературного теста (Gusta et al., 2009), який ми провели, і толерантністю рослин до підвищених температур у польових умовах, можна

сподіватись на підвищену толерантність рослин ріпаку з геном *cup11A1* у порівнянні з нетрансформованими рослинами до дії високих температур при вирощуванні у полі.

Таким чином, можна припустити, що підвищена активність СОД, виявлена у цих трансгенних рослин, відіграє визначальну роль у біохімічних змінах рослинного метаболізму, які дозволяють їм набувати більшої стійкості, зокрема, до дії підвищених температур.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми, що заключаються у розробці ефективної технології отримання трансгенних рослин важливої олійної культури – ріпаку (*Brassica napus* L.) з гетерологічними генами різного походження та виявленні рослин ріпаку з трансгенами *cup11A1* і *HuInf-α2b*, що експресують цитохром P450_{SCC} або інтерферон альфа-2b людини, які мають покращені фізіологічні і біохімічні характеристики порівняно з нетрансформованими контрольними рослинами як за сприятливих умов росту, так і за дії стресів різної природи. Експресія генів *bar*, *nptII*, *epsps* або *desC::licBM3* не надає рослинам додаткових переваг за умов абіотичних стресів.

1. Запропонована ефективна методика генетичної трансформації ріпаку з використанням як експлантів листових дисків асептично вирощуваних рослин для отримання ліній з різними гетерологічними генами.
2. Стійкість до гербіциду фосфінотрицину в трансгенних рослинах ріпаку може бути досягнута за рахунок експресії безпромоторного гена *bar*, яка зберігається у рослин, принаймні, до третього покоління.
3. Виявлено, що рослини ріпаку з геном *bar* та з генами *bar* і *epsps*, стійкі до двох груп гербіцидів (фосфінотрицину і фосфонометилгліцину), не відрізняються від контрольних рослин за антиоксидантною активністю, накопиченням біомаси і вмістом сумарного розчинного білка.
4. Показано наявність і активність введених генів *bar*, *nptII*, *epsps* і *desC::licBM3* в трансгенних лініях ріпаку. Продемонстровано, що експресія гена ацил-ліпідної десатурази *desC* не впливає на толерантність рослин до дії низьких та високих температур і осмотичного стресу.
5. Показано біологічну активність гетерологічного білка в рослинах ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини та підвищення антиоксидантної активності тканин листків. Виявлено здатність до накопичення більшої біомаси в порівнянні з вихідними рослинами як за сприятливих умов культивування, так і в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом *in vitro*.
6. В створених рослинах ріпаку з геном *cup11A1*, що кодує цитохром P450_{SCC} тваринного походження, виявлено здатність до накопичення ними підвищеної біомаси зі збільшеним вмістом загального розчинного білка за асептичних умов культивування. Зафіксовано підвищену антиоксидантну активність тканин листків та скорочення вегетативного періоду росту таких рослин. Виявлено зміни в жирнокислотному складі ліпідів листя і насіння у отриманих рослин,

- що корелювало з їх підвищеною толерантністю до осмотичного стресу *in vitro*, високої температури при пророщуванні насіння, високотемпературного стресу.
7. Серед отриманих трансгенних рослин ріпаку виділено дві групи, здатні формувати більшу, ніж нетрансформовані рослини, біомасу за фізіологічних умов і при дії абіотичних стресів (підвищена температура, водний дефіцит). Це рослини, що несуть гени *surp11A1* і *HuInfα-2b*.
 8. Біотехнологічні рослини ріпаку з генами *surp11A1* і *HuInfα-2b* відрізняються від інших аналізованих в даній роботі за активністю першого фермента в системі антиоксидантного захисту рослин – супероксиддисмутази, яка є підвищеною за фізіологічних умов.
 9. Підвищена активність СОД, ймовірно, є наслідком експресії гетерологічних генів P450_{SCC} і інтерферон альфа-2b людини, які здатні впливати на продукцію супероксид-радикалів.
 10. Вперше продемонстровано, що обробка розчинами екзогенного інтерферону позитивно корелює з активністю СОД і толерантністю рослин ріпаку до умов водного дефіциту, а також покращує проростання насіння.
 11. Показано, що трансгенні рослини, які експресують лише гени стійкості до антибіотиків (*nptII*) та/або гени стійкості до гербіцидів (*bar*, *epsps*) не відрізняються від нетрансформованих рослин за активністю СОД за нормальних умов. Ці гени не надають рослинам додаткових переваг за умов стресів (знижена та підвищена температури).
 12. Ріст рослин ріпаку може бути покращений за рахунок експресії цільових генів, здатних впливати на активність ферментів антиоксидантного захисту, зокрема СОД. Показники активності СОД доцільно використовувати як критерій для відбору рослин, стійких до осмотичного стресу.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у провідних фахових виданнях

1. **Sakhno L.A.** Stable expression of the promoterless *bar* gene in transgenic rapeseed plants / L.A. Sakhno, E.A. Gocheva, I.K. Komarnitsky, N.V. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2008. – V.42, N 1. – P. 16-22. (*Здобувачем проведено пошук літератури, розроблено методику генетичної трансформації ріпаку, проведено генетичний аналіз, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування та аналіз результатів*).
2. Герасименко И.М. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий / И.М. Герасименко, **Л.А.Сахно**, И.С. Головач, Е.М. Кищенко, Я.Р.Синдаровская, Х.Р.Шимшилашвили, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т.14, № 1. – С.127-133 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів, підготовку статті до друку*).
3. **Сахно Л.А.** Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *surp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения / Л.А. Сахно, Б.В. Моргун, Е.Ю. Кваско, Н.В. Кучук // Біотехнологія. – 2010. – Т.3, № 5. – С.74–82 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено*

генетичний аналіз, аналіз вмісту СРБ і оцінка біомаси рослин. Написано текст статті і підготовлено її до друку).

4. Шишлова А.М. Введение кДНК *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения в растения рапса / А.М. Шишлова, **Л.А.Сахно**, Б.В.Моргун., Н.В.Кучук, Н.А.Картель // Молекулярная и прикладная генетика. – 2010. – Т.11, № 2. – С.12-19 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено генетичний аналіз, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів, підготовку статті до друку).

5. **Сахно Л.А.** Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения / Л.А. Сахно // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 2. – С.253–259.

6. Gerasymenko I.M. Multiplex PCR assay for detection of human interferon alpha 2b gene in transgenic plants / I.M. Gerasymenko, **L.O. Sakhno**, M.G. Mazur, Y.V. Sheludko // Cytol. Genet. – 2012. – V.46, N. 4. – P.197-201 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів, підготовку статті до друку).

7. **Sakhno L.O.** Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene / L.O. Sakhno, O.Y. Kvasko, Z.M. Olevinska, M.Y.Spivak, M.V.Kuchuk // Cytol. Genet. – 2012. – V.46, N. 6. – P.342–346 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено аналізи вмісту СРБ і активності СОД, підготовлено проби для визначення антивірусної активності рослинних екстрактів, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

8. **Сахно Л.О.** Жирнокислотний склад насіння ріпаку з трансгеном *суп11А1* цитохрому P450_{SCC} / Л.О.Сахно, А.М.Остапчук, В.В.Клочко, М.В.Кучук // Біотехнологія. – 2012. – Т.5, №.5. – С.27–33 (Здобувачем отримано насіння трансгенного ріпаку в умовах теплиці, підготовлено проби для проведення газової хромато-мас-спектрометрії, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

9. **Сахно Л.А.** Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus* / Л.А. Сахно, И.М. Герасименко, И.К. Комарницкий, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // Biopolym. Cell. – 2012. – Т. 28, № 6. – С.449–455 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено генетичний аналіз, аналіз стійкості до гербіцидів, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

10. Shcherbak N. Lox-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation / N.Shcherbak, O.Kishchenko, **L.Sakhno**, I. Komarnitsky, M. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2013. – Т. 47, N. 3. – С.145-155 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, спільно із співавторами

проведено планування експериментів та аналіз результатів, коригування тексту статті).

11. **Сахно Л.А.** Экспрессия трансгена *desC* цианобактерии в растениях рапса не изменяет их холодоустойчивости / Л.А.Сахно, М.С. Сливец, Ю.В. Шелудько // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т.11, № 2. – С.267–275 (Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено аналіз активності СОД, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

12. **Sakhno L.O.** Changes in fatty acid composition of leaf lipids in canola biotech plants under short-time heat stress [Електронний ресурс] / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets, N.A. Korol, N. V. Karbovska, A. M. Ostapchuk, Y. V. Sheludko, M. V. Kuchuk // J. of Stress Physiology & Biochemistry. – 2014. – V.10, N. 2. – P.24–34. Режим доступу: http://www.jspb.ru/issues/2014/N2/JSPB_2014_2_24-34.html (Здобувачем підготовлено проби для визначення вмісту жирних кислот в листках ріпаку з використанням газової хромато-мас-спектрометрії, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

13. **Sakhno L.** Interferon application causes canola seedling biomass increase [Електронний ресурс] / L. Sakhno // J. of Microbiology, Biochemistry and Food Science. – 2014. – V.3, N. 6. – P.436–439. Режим доступу: http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2014/05/jmbfs_0612_sakhno.pdf.

14. **Sakhno L.O.** Cyp11A1 canola plants under short time heat stress conditions / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets, M.V. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2014. – V. 48, N. 5. – С.279–284 (Здобувачем проведено аналізи активності СОД і вмісту фотосинтетичних пігментів в листках рослин ріпаку, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів).

15. **Sakhno L.O.** Superoxide dismutase activity in transgenic canola / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets // Cytol. Genet. – 2014. – V. 48, N. 3. – С.145–149 (Здобувачем проведено аналізи активності СОД в листках рослин ріпаку, написано текст статті та підготовлено її до друку).

16. Slyvets M. Human interferon alpha 2b positively affects canola growth in both aseptic non-stress and water deficit conditions [Електронний ресурс] / M. Slyvets, **L. Sakhno** // Int. J. Biosci. Nanosci. – 2014. – V.1, N. 5. – P.104-118. Режим доступу: http://ijbsans.com/journal14/oct14/MS-09-14-01_3.pdf (Здобувачем проведено аналізи накопичення біомаси, вмісту СРБ і активності СОД, написано текст статті та підготовлено її до друку).

17. Taranenko A.M. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registrated glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants / A.M.Taranenko, **L.O. Sakhno**, B.V. Morgun, M.V. Kuchuk // Biotechnol. acta. – 2015. – V. 8, N. 2. – P.52-57 (Здобувачем спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів, коригування тексту статті).

18. **Сахно Л.О.** Стійкість до гліфосату і глюфозінату в поколіннях T₁–T₂ біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) / Л.О. Сахно, І.К. Комарницький, М.В. Кучук // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2015. –

Т.13, № 1. – С.3-10 (*Здобувачем проведено аналіз успадкування гетерологічних генів стійкості до гербіцидів, написано текст статті та підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

19. **Sakhno L.O.** Adaptive plasticity in osmotic stress of biotech canola (*Brassica napus* L.) possessing *cyp11A1* or simultaneously *desC* and *epsps* transgenes [Електронний ресурс] / L.O. Sakhno // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – № 5 (54). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_5/9.pdf.

20. **Сахно Л.О.** Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.), одночасно стійких до дії гербіцидів на основі гліфосату і глюфозінату / Л.О.Сахно, І.К.Комарницький, Кучук М.В. // Доповіді НАН України. – 2015. – № 9. – С.84-90 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено аналіз накопичення біомаси і вмісту СРБ, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

21. **Sakhno L.O.** Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering / L.O. Sakhno // Biopolym. Cell. – 2013. – Т. 29, № 6. – С.443–453.

22. **Сахно Л.А.** Трансгенные растения семейства крестоцветных как продуценты ненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью / Л.А. Сахно // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 9–18.

23. **Sakhno L.O.** Variability in the fatty acid composition of rapeseed oil: Classical breeding and biotechnology / L.O. Sakhno // Cytol. Genet. – 2010. – V. 44, N. 6. – С. 389–397.

24. **Sakhno L.O.** Alterations in superoxide dismutase activity due to heterologous gene expression: plant peculiarities // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2015. – Т.17. – С.274-279.

25. **Сахно Л.О.** Антиоксидантна активність листків біотехнологічного ріпаку (*Brassica napus* L.) зі стійкістю до гербіцидів на основі гліфосату і глюфозінату /Л.О.Сахно, К.В.Листван, М.В.Кучук // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. – 2015. – Т. 3, № 36. – С. 61-69 (*Здобувачем підготовлено екстракти та визначено активність СОД і вміст СРБ, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

Статті у інших виданнях

26. Gerasymenko I.M. Obtaining and analysis of tobacco, lettuce, and rape plants transformed with human interferon alpha 2b gene / I.M.Gerasymenko, N.M. Lypova, **L.A. Sakhno**, N.L.Shcherbak, Y.R.Sindarovska, M.A.Bannikova, Y.V.Sheludko, N.V.Kuchuk // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2009. – Т.7. – С.274–279 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, спільно із співавторами проведено планування експериментів, аналіз результатів і коригування тексту статті*).

27. Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия генов ацил-липидных десатураз цианобактерий в растениях / Ю.В.Шелудько, **Л.А.Сахно**,

И.М.Герасименко, Я.Р.Синдаровская, В.В.Клочко, А.Н.Остапчук, И.В.Голденкова-Павлова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2010. – Т.9. – С.369–374 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, спільно із співавторами проведено планування експериментів, аналіз результатів і коригування тексту статті*).

28. **Sakhno L.O.** Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene / L.O. Sakhno, A.M. Ostapchuk, V.V. Klochko, M.V. Kuchuk // Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph – part III/ Editor-in-Chief Edward Szlyk. – Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń. – 2011. – P.55–59 (*Здобувачем отримано насіння трансгенного ріпаку, підготовлено проби для проведення газової хромато-мас-спектрометрії, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

29. Трегуб М.С. Особенности роста трансгенных растений рапса с геном *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} в условиях осмотического стресса / М.С. Трегуб, **Л.А. Сахно** // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (за ред. Кунаха В.А.). – 2012. – Т.4. – С.623–628 (*Здобувачем отримано трансгенні рослини ріпаку, проведено аналіз накопичення біомаси і вмісту СРБ, написано текст статті*).

30. **Сахно Л.А.** Рапс с трансгеном DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*: жирнокислотный состав листьев / Л.А. Сахно, М.С. Сливец, А.Н. Остапчук, Н.А.Король, Ю.В.Шелудько, И.В. Голденкова-Павлова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X Междунар. конф.: сб. ст., Казань, 14-18 октября 2013 года. – Казань: Центр инновационных технологий, 2013. – С.94–98 (*Здобувачем підготовлено проби для визначення вмісту жирних кислот в листках ріпаку з використанням газової хромато-мас-спектрометрії, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

31. **Сахно Л.А.** Жирнокислотный состав листьев рапса с трансгеном *cyp11A1* в условиях высокотемпературного стресса / Л.А.Сахно, М.С.Сливец, А.А.Петерсон, Н.А.Король, Н.В.Карбовская, А.Н. Остапчук, Н.В.Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2013. – Т.12. – С.301-306 (*Здобувачем підготовлено проби для визначення вмісту жирних кислот в листках ріпаку з використанням газової хромато-мас-спектрометрії, написано текст статті і підготовлено її до друку, спільно із співавторами проведено планування експериментів та аналіз результатів*).

Патент

32. Патент України на корисну модель № 39205, МПК А01Н1/00; А01Н4/00; А01Н5/00; С12Н1/00; С12Н5/00; С12Н15/00, Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є.А., **Сахно Л.О.**, Кучук М.В., заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ, заявл. 3.10.2008; опубл.

10.02.2009, бюл. № 3 (*Здобувачем розроблено методику трансформації ріпаку, спільно із співавторами проведено аналіз результатів і коригування тексту*).

Тези конференцій

33. Герасименко И.М. Получение и анализ трансгенных растений, несущих гены $\Delta 9$ и $\Delta 12$ десатураз цианобактерий / И.М. Герасименко, И.С. Головач, Е.М. Кищенко, **Л.А. Сахно**, Я.Р.Синдаровская, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч.Дарвина и V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 21–28 июня 2009 г.: тезисы докл., ч.1. – Москва: изд-во РГАУ-МСХА, 2009. – С.537.

34. Matvieieva N.A. Edible vaccines produced by transgenic chicory, canola and tomato / N.A.Matvieieva, **L.A.Sakhno**, V.A.Rudas, A.M.Shachovsky, M.J.Spivak, M.V.Kuchuk // Україно-німецький симпозиум з фізики та хімії наноструктур та нанотехнологій. Берегове, Україна, 6-10 вересня 2010: К., вид-во НВК «Комункомплекс Україна», 2010. – С.216.

35. Vyacheslavova A.O. Thermostable lichenase of *Clostridium thermocellum* as a perspective reporter and carrier for expression of heterologous proteins / A.O.Vyacheslavova, I.M.Gerasymenko, **L.O. Sakhno**, Y.R.Sindarovska, Y.V.Sheludko, I.V.Goldenkova-Pavlova // International Conference “Plant transformation technologies II”. Vienna, Austria. February 19-22, 2011. – P.47.

36. **Sakhno L.O.** Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene / L.O.Sakhno, A.M.Ostapchuk, V.V. Klochko, M.V. Kuchuk // Rapeseed oil in European modern economy. 10th Int. Conf. on Research and Technology. – Torun, Poland, October 5-8, 2011. – P.37.

37. **Сахно Л.А.** Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения [Електронний ресурс] / Л.А.Сахно // Материалы Международной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений», 30 мая – 1 июня 2011 г., Киев. – С.55.

38. Трегуб М.С. Ріст рослин ріпаку, трансформованих геном *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC}, в умовах осмотичного стресу / М.С.Трегуб, **Л.О.Сахно** // Біотехнологія ХХІ століття. VI Всеукр. наук.-практ. конф., 5 квітня 2012 року: тези доповідей. – К.: вид-во НТУ «КПІ», 2012. – С.197.

39. Степаненко О.В. Ріст рослин ріпаку з геном десатурази ціанобактерії DesC в умовах осмотичного стресу / О.В.Степаненко, **Л.О.Сахно** // Біотехнологія ХХІ століття. VI Всеукр. наук.-практ. конф., 5 квітня 2012 року: тези доповідей. – К.: вид-во НТУ «КПІ», 2012. – С.114.

40. Трегуб М.С. Рослини ріпаку з гетерологічними генами різного походження в умовах осмотичного стресу *in vitro* / М.С.Трегуб, О.В.Степаненко, **Л.О.Сахно** // Генетичні основи селекції, насінництва і біотехнологій: наука, освіта, практика. Міжнар. наук.-практ. конф. 21-24 травня 2012 р. – К.: НУБіП, 2012. – С.103.

41. Trehub M.S. Superoxide dismutase activity in leaves of rapeseed expressing cytochrome P450_{SCC} *CYP11A1* gene under osmotic stress conditions / M.S. Trehub,

L.O. Sakhno // Int. Symp. on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology. May 16-20, 2012. Resort Livadiya, Yalta. – P. 179.

42. Trehub M.S. Transgenic *Brassica napus* plants expressing cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene under *in vitro* osmotic stress conditions / M.S. Trehub, **L.O. Sakhno** // Biotechnology and Plant Breeding. Perspective towards Food Security and Sustainability: Int. Conf. Radzikow, Poland. September 10-12, 2012. – P. 156.

43. **Sakhno L.O.** Superoxide dismutase activity in transgenic canola / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets // Инновационные направления современной физиологии растений: Всерос. конф. с междунар.участием. Москва, Россия. 2-6 июня 2013 г. – С. 111–112.

44. **Сахно Л.А.** Рапс с трансгеном *DesC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus*: жирнокислотный состав листьев / Л.А. Сахно, М.С. Сливец, А.Н. Остапчук, Н.А.Король, Ю.В.Шелудько, И.В. Голденкова-Павлова // X Междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». 14-18 октября 2013 г., Казань: изд-во «Центр инновационных технологий». – С. 254–255.

45. Slyvets M.S. DesC desaturase of cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* expression in canola plants does not improve the low positive temperature growth / M.S. Slyvets, **L.O.Sakhno**, Y.V. Sheludko // Eurobiotech 2013. Leading area: White and Green Biotechnology: 5th Central European Congress of Life Sciences, 8-11 October, 2013, Krakow, Poland: abstracts. – 2013. – P. 130.

46. **Sakhno L.** Short-term heat stress effects on a *cyp11A1* canola plants / L. Sakhno, M. Slyvets, N. Korol, N. Karbovska, A. Ostapchuk, M. Kuchuk // Biotechnologia. – 2013. – V.93 (3). – 6th Conference of the PSEPB. – September 16-19, 2013. – Łódź, Poland. – P. 409.

47. Slyvets M. Human interferon alpha 2b positively affects plant growth in both aseptic non-stress and water deficit conditions / M. Slyvets, **L. Sakhno** // «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні аспекти». 11-12 листопада 2014 р., Харків: Харківський національний університет ім.В.Н.Каразіна. – 2014. – С.142–143.

48. **Sakhno L.O.** Leaf antioxidant activity of biotechnological canola (*Brassica napus* L.) plants resistant to both glyphosate and glufosinate herbicides / L.O. Sakhno, K.V.Lystvan, M.V. Kuchuk // «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology). 11-13 жовтня 2015 р., Львів, Інститут біології клітини НАНУ. – 2015. – P.141.

АНОТАЦІЯ

Сахно Л.О. Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) з гетерологічними генами різного походження та аналіз їх толерантності до абіотичних стресів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки). – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2016.

Дисертація присвячена створенню і вивченню трансгенних рослин ріпаку як вихідного матеріалу для селекції, який характеризувався би мінімальними втратами продуктивності за несприятливих умов вирощування, на основі наявних генотипів, цінних з точки зору сільськогосподарських характеристик. Запропоновано ефективну методику генетичної трансформації з використанням як експлантів листових дисків асептично вирощуваних рослин. Отримано рослини ріпаку, які експресують гени бактеріального походження (*bar*, *epsps*, *desC*), гени тварин (*cyp11A1*) і людини (*HuInf-α2b*). Отримані рослини мають стійкість до гербіцидів з діючою речовиною гліюфозінат натрію завдяки експресії гена *bar*. Рослини ріпаку, які експресують одночасно гени *bar* і *epsps*, мають стійкість до гербіцидів двох груп, гліюфозінату і гліфосату, що враховує останні тенденції щодо створення гербіцид-стійких трансгенних рослин. Виявлено, що експресія генів *bar*, *epsps*, *nptII*, *desC* не надає рослинам додаткових переваг за умов стресів (висока або низька температури, осмотичний стрес). Показано, що рослини з генами *cyp11A1* і *HuInf-α2b* мають підвищену активність супероксиддисмутази (СОД), першого у ланцюзі ферментів антиоксидантного захисту рослин, за нормальних умов росту. Ці рослини виявляють себе більш толерантними до абіотичних стресів, ніж контрольні. Вперше продемонстровано, що обробка розчинами інтерферону позитивно корелює з активністю СОД і стійкістю рослин ріпаку до умов водного дефіциту, а також покращує проростання насіння. Запропоновано використовувати показники активності СОД для первинного скринінгу рослин, толерантних до умов осмотичного стресу.

Ключові слова: *Brassica napus*, *bar*, *epsps*, *desC*, *HuInf-α2b*, *cyp11A1*, супероксиддисмутаза

АННОТАЦИЯ

Сахно Л.А. Получение растений рапса (*Brassica napus* L.) с гетерологичными генами различного происхождения и анализ их толерантности к абиотическим стрессам. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология (биологические науки). – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2016.

Диссертация посвящена созданию и изучению трансгенных растений рапса как исходного материала для селекции, который характеризовался бы минимальными потерями продуктивности при неблагоприятных условиях выращивания, на основе существующих генотипов, ценных с точки зрения сельскохозяйственных характеристик. Предложена эффективная методика генетической трансформации рапса с использованием в качестве эксплантов листовых дисков асептически выращиваемых растений. Получены растения рапса, которые экспрессируют гены бактериального происхождения (*bar*, *epsps*, *desC*), гены животных (*cyp11A1*) и человека (*HuInf-α2b*). Полученные растения обладают устойчивостью к гербицидам с действующим веществом гліюфозінат натрия благодаря экспрессии гена *bar*. Растения рапса, экспрессирующие одновременно гены *bar* и *epsps*, устойчивы к гербицидам двух групп,

глюфозинату и глифосату, что учитывает последние тенденции относительно создания устойчивых к гербицидам трансгенных растений. Выявлено, что экспрессия генов *bar*, *epsps*, *nptII*, *desC* не дает растениям дополнительных преимуществ в условиях стрессов (повышенная или пониженная температура, осмотический стресс). Показано, что растения с генами *cyp11A1* и *HuInf-α2b* имеют повышенную активность супероксиддисмутазы (СОД), первого в ряду ферментов антиоксидантной защиты растений, при нормальных условиях роста. Эти растения более толерантны к абиотическим стрессам, чем контрольные. Впервые продемонстрировано, что обработка растворами интерферона положительно коррелирует с активностью СОД и устойчивостью растений рапса к водному дефициту, а также улучшает прорастание семян. Предложено использовать показатели активности супероксиддисмутазы для первичного скрининга растений, толерантных к осмотическому стрессу.

Ключевые слова: *Brassica napus*, *bar*, *epsps*, *desC*, *HuInf-α2b*, *cyp11A1*, супероксиддисмутаза

SUMMARY

Sakhno L.O. Creation of canola plants (*Brassica napus* L.) bearing heterologous genes of different origins and analysis of their tolerance to abiotic stresses. – Manuscript.

Thesis for Dr.Sc. degree in biology (Dr.Sc. Biol.), the speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is aimed to obtain and analyse the transgenic canola plants as initial material for selection for the improved productivity under both favourable and stress conditions. Valuable industrial canola genotypes, namely Kalinovskii, BNIS100, Exgold, Mariia, Magnat, Titan, and Obrii were used as a background for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The usage of leaf discs of aseptic plants as the explants for transformation was the feature of our protocol. Our method allows avoiding necessity of seed sterilization before a new round of transformation experiments. So we reduce both the period of time for study and the cost of the reagents needed for transgenic canola plant creation.

We have produced several groups of transgenic canola plants. They express either 1) *lox*-dependent *bar* gene or 2) both *bar* and *epsps* genes or 3) *nptII*, *bar*, *epsps* genes and *desC* gene for DesC desaturase from cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* transcriptionally fused with *licBM3* gene for lichenase from bacterium *Clostridium thermocellum* or 4) *bar* gene and *HuInf-α2b* gene for human interferon α2b or 5) *bar* gene and *cyp11A1* gene for cytochrome P450_{SCC} from bovine adrenal cortex mitochondria. The integration and transcriptional activity of the target genes were demonstrated using PCR and RT-PCR analyses.

All transgenic plants were resistant to glufosinate herbicides due to *bar* gene expression. Herbicide resistance tests were conducted both under *in vitro* and greenhouse conditions. Canola plants possessing *bar* and *epsps* genes were resistant to glufosinate as well as glyphosate herbicides. It is according to a new emerged

tendency in the design of herbicide-resistant varieties to combine the resistance to several herbicides in one plant. Superoxide dismutase (SOD) activity and total radical scavenging activity were similar in untransformed and transgenic plants possessing either the promoterless *bar* gene or simultaneously *bar* and *epsps* genes in growth on media without herbicide(s). Additionally, these parameters have no significant changes when transgenic plants were cultured on both media with herbicide(s) or without it(s).

The *licBM3* gene product activity as a part of hybrid protein allowed quantitative and qualitative estimation of the desaturase gene expression. Gas chromatography-mass spectrometry of the fatty acid methyl esters showed higher palmitlinolenic acid content, higher total fatty acid content and slight increment in index unsaturation in comparison with that of untransformed plants. But the expression of *desC* gene has no effect on transgenic plant tolerance to low positive and high temperature as well as osmotic stress. At the same time, SOD activity of transgenic plants has no differences under growth both in normal and stressful conditions as compared to the controls.

Human interferon-like activity in *HuInf-a2b* canola plants was measured by microtitration method based on the studied plant extract ability to protect the established piglet testicular cell culture against cytopathic effect of vesicular stomatitis virus. Leaf antioxidant and SOD activities of transgenic plants were higher as compared to the control ones. *HuInf-a2b* canola plants produce larger biomass and have higher chlorophyll and carotenoid content under normal growth conditions. Furthermore, the improved tolerance to osmotic stress *in vitro* was confirmed in terms of higher fresh weight, total soluble protein content and photosynthetic pigment content in transgenic plants than in the untransformed ones. Leaf SOD activity was higher in *HuInf-a2b* canola plants as compared to the controls under stress.

The improved canola seedling growth after seed imbibition in water human interferon alpha 2b solution was demonstrated for the first time. Exogenous interferon treatment also positively affected canola shoots *in vitro* either in normal or stress conditions. Thus, transgenic and exogenous interferon influenced similarly canola plant growth.

Cyp11A1 canola plants formed up to 33% higher fresh weight and had total soluble protein content up to 1.3-fold higher in comparison with untransformed controls under aseptic growth. In addition, the elevated leaf antioxidant and SOD activities were determined. Ascorbic acid content remained without differences. Changes in fatty acid composition of leaves and seeds were detected. Vegetative stage of development was shorter for 5-7 days. The improved tolerance to osmotic stress *in vitro*, high temperature during seed germination and heat shock under growth chamber conditions was confirmed for *cyp11A1* canola plants.

Two groups of transgenic plants were able to produce higher biomass than untransformed ones under physiological as well as abiotic stress conditions (heat shock, water deficit). There were *cyp11A1* and *HuInf-a2b* canola plants.

These plants differed from the others by means of their SOD activity under normal growth conditions. SOD is the first enzyme in the plant antioxidant system to protect from excessive amount of reactive oxygen species.

The elevated SOD activity may be a consequence of either *cyp11A1* or *HuInf- α 2b* gene expression.

In mammals, cytochrome P450_{SCC} catalyses three-step reactions to converse cholesterol to pregnenolone. Electron leakage from the mitochondrial NADPH - adrenodoxin reductase – adrenodoxin - P450_{scc} system causes superoxide formation and SOD activity increase. In plants, the β -sitosterol may be a substrate for P450_{SCC}. So the elevated leaf SOD activity in *cyp11A1* canola plants may be due to heterologous P450_{scc} activity.

Exogenous interferon treatment of animal or human cell cultures leads to superoxide formation and SOD activity increase in dose-dependent manner by influencing on NADP-oxidase activity. Respiratory burst oxidase homologue (RBOH) proteins are plant NADP-oxidases which produce superoxide radicals. Their activities may be affected by interferon following SOD activity increase in plant tissues.

Thus, heterologous proteins such as P450_{SCC} and human interferon alpha 2b are able to influence the superoxide radical formation, SOD activity increase and growth improvement in plants. Herbicide- and antibiotic resistance genes have no additional advantages for plant growth either normal or stress conditions.

We propose to use the means of SOD activity for primary selection of plant material for osmotic stress tolerance.

Key words: *Brassica napus*, *bar*, *epsps*, *desC*, *HuInf- α 2b*, *cyp11A1*, superoxide dismutase