

Національна академія наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Кирпа-Несміян Тетяна Миколаївна

УДК 581.056:502.75

ДИСЕРТАЦІЯ

Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз
ціанобактерій у вищих рослинах

03.00.20 – БІОТЕХНОЛОГІЯ

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Т.М. Кирпа-Несміян

Науковий керівник Шелудько Юрій Всеволодович,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Кирпа-Несміян Тетяна Миколаївна. Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Київ, 2017.

В даний час досить актуальним є дослідження механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів (Шевцов А.І., 2007). Адаптація рослин до стресу залежить, насамперед, від властивостей мембран. Зі збільшенням частки ненасичених жирних кислот у складі мембранних ліпідів підвищується в'язкість мембран, збільшується їх пластичність, що дозволяє запобігати механічним пошкодженням (тріщини, розриви) під час впливу температурних стресів, або нестачі вологи (Лось Д.А., 2005).

Десатурази – це ферменти, що сприяють утворенню подвійних зв'язків у жирних кислотах та тим самим перетворюють ЖК з насичених в ненасичені. Разом зі збільшенням частки ненасичених жирних кислот у складі мембранних ліпідів підвищується в'язкість та плинність мембранних ліпідів, знижується температура кристалізації мембран (Маалі А.Р., 2007).

У роботі використовували гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, які утворюють подвійні зв'язки у положеннях $\Delta 9$ (ген *desC*, ціанобактерії *Synechococcus vulcanus*) та $\Delta 12$ (*desA* ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803) (Герасименко И.М., и др. 2010). Ціанобактерії одні з найдавніших організмів на нашій планеті, які за останні два мільйони років не зазнали суттєвих мутаційних змін геному, однак, мають гарні показники адаптації до впливу абіотичних стресів. Використання у роботі рослин *Nicotiana tabacum*, як модельного об'єкту, дозволяє досліджувати експресію перенесених генів не рослинного походження у рослинному організмі, для того, щоб в подальшому створювати сорти цінних сільськогосподарських культур.

Дослідження проводили з рослинами тютюну *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* ціанобактерії *S. sp.* PCC 6803 або *ats1A::desC::licBM3* ціанобактерії *S. vulcanus*. Дані трансгенні рослини були перевірені за допомогою мультиплексної ПЛР на наявність вставки гібридного гена. Після чого перевіряли експресію генів за ферментативною активністю репортерного білка – термостабільної ліхенази (якісним ліхеназним методом), ген якого був трансляційно злитий із геном десатурази.

У рослин, що експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази дослідили достовірне збільшення ліноленової кислоти, а у рослин, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази збільшення лінолевої кислоти. Як контроль використовували не трансгенні рослини тютюну та трансформанти, що містять у своєму геномі та експресують ген *gfp::licBM3*. Після впливу низьких температур було зареєстровано збільшення активності СОД, зниження рівня накопичення малонового діальдегіду, зменшення втрати електролітів у всіх рослин, які експресують гібридні гени десатураз порівняно з контролем (Герасименко І.М., и др. 2015).

Також досліджували рослини тютюну, що експресують ген *desA* або *desC* в умовах холодowego стресу, після того, як їх вирощували *in vivo*. Виявили, що вирощування *in vivo* не має суттєвого впливу на адаптацію рослин з генами десатураз ціанобактерій (Кирпа-Несміян Т.М., 2016).

Дослідження впливу гіпертермічного стресу показало зниження рівня показників МДА у рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контролем. Достовірної різниці показників СОД та рівнем втрати електролітів між дослідними рослинами і контролем не виявили.

Для того, щоб дослідити стійкість до осмотичного стресу рослини *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* висаджували на середовище MS (Мурашиге-Скуга) з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ. Дослідили кращу адаптацію у рослин тютюну, що експресують гени десатураз.

Досліджували успадкування генів десатураз на прикладі покоління T1,

було проаналізовано 30 рослин покоління T1, що містять в своєму геномі ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази та 30 рослин покоління T1, що містять в своєму геномі ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази. Виявлено, що у 20% рослин, що мали успадкувати ген *ats1A::desC::licBM3* спостерігали успадкування гена *desC* або *licBM3*. У 40% рослин, що мали успадкувати ген *desA::licBM3* спостерігали успадкування гена *desA* або *licBM3*.

Оскільки гени десатураз впливають на зміни в спектрі жирних кислот для рослин тютюну було проведено аналіз газової хроматографії та мас-спектрометрії. Для дослідження використовували рослини *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licBM3* або *desA::licBM3*. В рослин, що містять в своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази було відмічено збільшення частки ліноленової кислоти, а в рослин, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази – лінолевої кислоти. Для визначення стійкості рослин до стресу знижених температур та заморозків рослини піддавали дії холодового стресу, після чого досліджували показники втрати електролітів, рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза. Виявили кращі показники аклімації у рослин, що експресують гени десатураз.

Експресія перенесених генів може впливати на фізіологічні показники та процеси рослинного організму. При використанні холодоіндукованого промотора можна досягти експресії перенесених генів разом зі зниженням температури навколишнього середовища. У роботі використовували конструкцію, що містила ген *desA* ($\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази), злитий з репортерним геном термостабільної ліхенази *licBM3* під холодоіндукованим CBF1 промотром. Генетичну трансформацію здійснювали *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом.

Методом ПЛР було підтверджено, що отримано 13 ліній трансгенних рослин тютюну, які містять у своєму геномі ген *desA*. Після дії холодового стресу, дослідили наявність експресії генів десатураз за допомогою

активності репортерного білка термостабільної ліхенази, ген якого був трансляційно злитий в одній рамці зчитування з геном десатурази.

Для того, щоб визначити адаптацію рослин до холодового стресу перевіряли рівень накопичення малонового діальдегіду, активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень втрати електролітів та рівень експресії генів десатураз за ферментативною активністю репортерного білка після дії холодового стресу. Виявили, що краще переносять умови стресу рослини з генами десатураз порівняно з контролем.

Для отримання подвійних трансформантів було здійснено генетичну трансформацію трансгенних рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licBM3* методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації із застосуванням вектора, що містить послідовність гена *desA::licBM3*. Наявність вставки генів було доведено методом ПЛР. З 16 відселектованих ліній 14 ліній показали наявність в геномі копії трансгену і не містили агробактеріальної контамінації. Таким чином було отримано 14 ліній рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі одночасно два гени ацил-ліпідних десатураз *desC* ціанобактерій *S. vulcanus* та *desA* *S. sp.*PCC6803. Для трансформантів було здійснено аналіз спектру жирних кислот за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії. Виявили збільшення частки як лінолевої, так і ліноленової кислот. Після чого перевіряли дані рослини на стійкість до заморозків. Дослідили, що подвійні трансформанти краще адаптуються до умов заморозків порівняно з контролем (Курпа-Nesmiian T.M., 2016).

Картопля є однією з важливих сільськогосподарських культур, що має широке застосування у промисловості (харчовій, кормовій, технічній тощо). Неприятливі чинники навколишнього середовища, такі як температурні коливання, засоленість ґрунтів та посуха знижують врожайність даної культури. Рослини картоплі сортів української селекції були отримані шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації. Для підтвердження вставки трансгена (*desA::licBM3*) було проведено ПЛР. Для

опосередкованого підтвердження експресії гібридних генів було здійснено аналіз активності ферменту ліхенази за допомогою якісного ліхеназного методу. Методом газової хроматографії та мас-спектрометрії виявили збільшення частки лінолевої кислоти (Кирпа-Несмиян Т.Н., и др. 2016). Вирощували рослини на середовищі MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ, а також на стандартному середовищі MS (нормальні фізіологічні умови).

При дослідженні стійкості трансгенних рослин з генами десатураз до умов осмотичного стресу виявили, що кращі процеси вегетації у ліній сортів “Серпанок” №2, “Лугівська” №2, “Незабудка” №7, проте, у рослин картоплі сорту “Слов’янка” №1 не було виявлено різниці з контрольними рослинами.

Створення орхідей, які будуть стійкими до низьких температур та заморозків є досить актуальним завданням. В даній роботі було використано ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *S. vulcanus* та рослини орхідей *D. linguella*. За допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації було отримано рослини, в яких було доведено наявність вставки та експресії генів десатураз (Кирпа-Несмиян Т.Н., и др. 2013).

Отриманим трансгенним рослинам було проведено аналіз жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії та відмічено зниження частки двоненасиченої ЖК та збільшення частки триненасиченої ЖК. Також в цих лініях було помічено появу в складі мембранних ліпідів частки C19:0.

Перевіряли активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень активності ферментів десатураз за ферментативною активністю репортерного білка та рівень накопичення малонового діальдегіду під час та після дії холодового стресу. Холодовий стрес: 20 днів у холодильній камері при 0°C. Виявили кращу аклімацію у рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контрольними.

Вперше було отримано рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1 та тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно гібридні гени десатураз *desA* та *desC* за допомогою генетичної трансформації *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом.

Вперше було досліджено стійкість трансгенних рослин картоплі сортів української селекції, що містять у своєму геномі та експресують гени десатураз ціанобактерій до умов осмотичного стресу. Вперше досліджено трансгенні лінії орхідей *D. Linguella*, в яких, доведено наявність вставки та експресії гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази, до умов стресу знижених температур.

Дані дослідження є підґрунтям для створення сортів цінних сільськогосподарських рослин, які будуть стійкими до температурних коливань в умовах зміненого клімату. Отримані результати вносять вклад у розробку новітніх біотехнологічних прийомів по створенню ліній та сортів рослин стійких до абіотичних стресів.

Ключові слова: ацил-ліпідні десатурази ціанобактерій, абіотичний стрес, генетична трансформація рослин, *Nicotiana tabacum*, *Dendrobium linguella*, *Solanum tuberosum*.

SUMMARY

Курпа-Несміан Т.М. Study of desaturase heterologous gene expression of cyanobacteria in higher plants – Manuscript.

Thesis for PhD degree in specialty 03.00.20. – “biotechnology”. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, Kyiv, 2017.

Currently, it is very relevant to study the mechanisms of plant resistance to abiotic stress (Шевцов А.І., 2007). Plants adaptation to stress depends, first of all, on the properties of membranes. With the increase of unsaturated fatty acids (FA)

proportion in membrane lipids, the membranes viscosity as well as their plasticity also increases, which prevents mechanical damage (cracks, tears) during the impact of temperature stresses, or lack of moisture (Лось Д.А., 2005).

Desaturases are enzymes that contribute to the formation of double bonds in FA and thus convert FA from saturated to unsaturated. Along with the increase of unsaturated FA proportions in the membrane lipids, the viscosity and fluidity of the latter increases, and the temperature of membrane crystallization decreases (Maali A.P., et al 2007).

In this work, acyl lipid desaturase cyanobacteria genes were used that form double bonds in positions $\Delta 9$ (*desC* gene, of cyanobacteria *Synechococcus vulcanus*) and $\Delta 12$ (*desA* of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803) (Gerasymenko I.M., et al. 2010). Cyanobacteria are one of the most ancient organisms on our planet, which over the past two million years have not undergone significant mutational changes in the genome, however, have good indicators of adaptation to the effects of abiotic stresses. The use of *Nicotiana tabacum* plants as a model object allows investigating the expression of transgenic non-herbal genes in the plant organism in order to further create valuable varieties of agricultural crops.

The studies were conducted with tobacco plants *N. tabacum*, expressing hybrid genes *desA::licBM3* of cyanobacteria *S. sp.* RCC 6803 or *ats1A::desC::licBM3* of cyanobacteria *S. vulsanus*. These transgenic plants were tested using a multiplex PCR for a hybrid gene insertion. After that, the gene expression was checked by the reporter protein enzymatic activity – the thermostable lichenase (qualitative lichenase method), the gene of which was translated into a desaturase genome.

A significant increase in linolenic acid was observed in plants expressing the $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase gene, and an increase in linoleic acid – in plants expressing the $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene. Non-transgenic tobacco plants and transformants containing and expressing the *gfp::licBM3* gene in their genome were used as controls. After exposure to low temperatures, an increase in

superoxide dismutase SOD activity, a decrease in the accumulation of malondialdehyde (MDA), and a decrease in the loss of electrolytes in all plants expressing hybrid desaturase genes compared to control was recorded (Gerasymenko I.M., et al. 2015).

Also, tobacco plants that express the *desA* or *desC* gene in conditions of cold stress after they were grown *in vivo* were examined. It was established that *in vivo* cultivation does not have a significant effect on the adaptation of plants with cyanobacteria desaturases genes (Kyrpa-Nesmiian T.M., 2016).

The hyperthermic stress effect study showed a decrease in MDA values in plants expressing desaturase genes compared with controls. There was no significant difference between the SOD indices and the level of electrolyte loss between the experimental plants and the control.

In order to investigate the resistance to osmotic stress, *N. tabacum* plants expressing hybrid genes *desA::licBM3* or *ats1A::desC::licBM3* were planted onto MS medium (Murashige-Skoog) with the addition of mannitol at concentrations of 100 mM and 200 mM. The best adaptation was observed in tobacco plants expressing desaturases genes.

The desaturases genes inheritance was studied on the example of the T1 generation, 30 T1-generation plants containing $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase gene and 30 T1-generation plants containing $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene in their genome were analyzed. It was found that in 20% of plants that had to inherit the *ats1A::desC::licBM3* gene, the *desC* or *licBM3* gene inheritance was observed. In 40% of the plants that had to inherit the gene *desA::licBM3*, the *desA* or *licBM3* gene inheritance was observed.

Since the desaturases genes influence on the FA spectrum changes, gas chromatography and mass spectrometry analyses were conducted for tobacco plants. *N. tabacum* plants containing the *ats1A::desC::licBM3* or *desA::licBM3* gene expressed in their genome were used for the study. In plants containing and expressing the $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase gene in its genome, an increase of linolenic acid proportion was observed, and in plants expressing the $\Delta 12$ -acyl-lipid

desaturase gene – linoleic acid. To determine the plants resistance to reduced temperatures and freezing stress, the plants were exposed to cold stress, after which the indices of electrolyte loss, the level of accumulation of malondialdehyde, and the activity of the enzyme superoxide dismutase were investigated. The best indicators of acclimation were found in plants expressing desaturase genes.

The transmitted genes expression may affect the physiological parameters and processes of the plant organism. When using a cold-induced promoter, the transmitted genes expression can be achieved along with the decrease in the ambient temperature. A design containing the *desA* gene ($\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase), fused to the reporter genome of the thermostable lichenase *licBM3* under a cold-induced CBF1 promoter was used in this work. Genetic transformation was carried out by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method.

It was confirmed with PCR that 13 lines of transgenic tobacco plants that have a *desA* gene in their genome were received. After the cold stress, the presence of the desaturase genes expression was investigated with the reporter protein of thermostable lichenase activity, gene of which was translated into a reading frame with the desaturase genome.

In order to determine the plants adaptation to cold stress, the level of MAD accumulation, the superoxide dismutase enzyme activity, the level of electrolyte loss, and the desaturases genes expression level with the fusion protein enzyme activity after the cold stress were checked. It was established that stress conditions are better tolerated by the plants with the desaturases genes compared with the control.

To obtain double transformants, a genetic transformation of transgenic *N. tabacum* plants containing and expressing the *ats1A::desC::licBM3* gene in their genome was performed with the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method using the vector containing sequence of the *desA::licBM3* gene. The presence of gene insertion has been proven with PCR. 14 out of the 16 selected lines showed the presence of the transgene copies in the genome and did not contain agrobacterial contamination. Thus, 14 strands of *N. tabacum* plants

were obtained containing two genes of acyl-lipid desaturases *desC* of cyanobacteria *S. vulcanus* and *desA* of *S. sp.*PCC6803 in its genome simultaneously. The FA spectrum analysis was conducted for the transformants with gas chromatography and mass spectrometry. An increase in the proportion of both linoleic and linolenic acids was found. After that, the plants were tested for resistance to freezing. It was discovered that double transformants are better adapted to freezing conditions than control (Kyrpa-Nesmiian T.M., 2016).

Potatoes are one of the important crops that are widely used in industry (food, feed, technical, etc.). Adverse environmental factors such as temperature fluctuations, soil salinity and drought reduce the yield of this crop. Plants of Ukrainian selection potato varieties were obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PCR was performed to confirm the transgene (*desA::licBM3*) insertion. For indirect confirmation of hybrid genes expression, an analysis of the enzyme lichenase activity using a qualitative lichenase method was performed. The method of gas chromatography and mass spectrometry revealed an increase in the linoleic acid proportion (Kyrpa-Nesmiian T.M., et al. 2016). The plants were grown in MS medium with the addition of mannitol at concentrations of 100 mM and 200 mM, as well as in the standard MS medium (normal physiological conditions).

In the study of the transgenic plants containing desaturase genes resistance to the conditions of osmotic stress, it was found that the best growing processes had the "Serpanok" №2, "Lugovskaya" №2, "Nezabudka" №7 cultivars, however, no differences in potato plants of the "Sloviianka" №1 cultivar compared with control plants were detected.

Creating orchids that will be resistant to low temperatures and freezing is a very topical task. In this work, the genus Δ^9 -acyl-lipid desaturase cyanobacteria *S. vulcanus* and plants of *D. linguella* were used. With *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation, plants were obtained in which the presence of insert and the desaturase genes expression was proved (Kyrpa-Nesmiian T.M., et al. 2013).

The FA analysis with gas chromatography and mass spectrometry was performed on the obtained transgenic plants, and a decrease in the bivalent alkaline proportion and increased unsaturated FA proportion was noted. Also, the appearance of C19:0 particle in the membrane lipids was noticed in these lines.

The activity of the SOD enzyme, the the desaturases enzymes level of activity with the reporter protein enzymatic activity and the MAD accumulation level during and after the effect of cold stress were checked. Cold stress: 20 days in the refrigerator at 0°C. A better acclimatization in plants expressing desaturases genes compared with control ones was detected.

Tobacco *N. tabacum* plants containing and expressing *desA* gene in their genome under the control of a cold induction promoter CBF1 and tobacco *N. tabacum* plants containing and simultaneously expressing hybrid *desA* and *desC* desaturases genes in their genome were obtained for the first time with the genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method.

The resistance of transgenic potato plants varieties of Ukrainian selection, which contain and expresses the desaturases genes of cyanobacteria in its genome, to conditions of osmotic stress was investigated for the first time. The resistance of transgenic lines of *D. linguella* orchids, in which the presence of $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturases gene insertion and expression has been proved, to conditions of lowered temperature stress has been investigated for the first time.

These studies are grounds for the creation of valuable varieties of agricultural plants that will be resistant to temperature variations in a changing climate. The obtained results contribute to the development of the latest biotechnological methods for creating lines and varieties of plants resistant to abiotic stresses.

Key words: acyl lipid desaturases of cyanobacteria, abiotic stress, genetic transformation of plants, *Nicotiana tabacum*, *Dendrobium linguella*, *Solanum tuberosum*.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Герасименко И. М., Сахно Л. А, Кирпа Т. Н., Остапчук А. Н., Хаджиев Т. А., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. В. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены $\Delta 9$ или $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы // Физиология растений. Москва, РФ. 2015, Т – 62, № 3, С.1–10. *(вирощування рослин для досліджень, якісний та кількісний ліхеназні тести, аналіз активності ферменту СОД)*
2. Кирпа-Nesmiian T. Getting plants *Nicotiana tabacum* that simultaneously express heterologous gene of two acyl-lipid desaturases cyanobacterium *desC* and *desA*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies. Bucharest, Romania. 2016. Vol. XX, ISSN 2285-1364, С. 65 – 68. *(генетична трансформація рослин N. tabacum Agrobacterium tumefaciens-опосередкованим методом, вирощування рослин, ПЛР, опрацювання результатів, написання статті)*
3. Кирпа-Несміян Т.М., Кучук М.В., Шелудько Ю.В. Дослідження фізіолого-біохімічних характеристик рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени *desA* або *desC* в умовах стресів різних температур. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. Київ, Логос – 2016, Т – 2 № 14, С. 21-26. *(вирощування рослин для досліджень, аналіз рівня МДА, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті)*
4. Кирпа-Несміян Т.М., Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2016, Т – 19, С. 139-143. *(вирощування рослин тютюну в умовах in vivo, дослідження рівня втрати електролітів, рівень МДА, активність ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів та написання статті)*

5. Кирпа-Несміян Т.М., Герасименко І.М., Сахно Л.О., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В., Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени Δ -9 і Δ -12-ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2015, Т – 17, С.197-200. (*вирощування рослин для досліджень, аналіз визначення втрати електролітів, опрацювання результатів, написання статті*)
6. Кирпа-Несміян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А., Кучук Н.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum* экспрессирующие ген Δ 12- ацил-липидной десатуразы цианобактерии. // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. Минск, Білорусь. 2016. – Т – 24. – 432, С. 81-87. (*ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті*)
7. Кирпа Т.Н., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко І.М., Иванников Р.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия Δ 9-ацил-липидной десатуразы цианобактерии в орхидее *Dendrobium linguella* Rchb. F. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос. – 2013, – Т – 12, С. 244-248. (*підбирання умов холодного стресу, аналіз визначення втрати електролітів*)
8. Кирпа Т. М., Герасименко І.М., Сахно Л.А., Клочко В.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В. Экспрессия в *Nicotiana tabacum* генов ацил-липидных десатураз цианобактерий без сигналов транспорта в хлоропласты. // Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада. Київ, Україна. 2012 р. С. 267-268.

(вирощування рослин для досліджень, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів)

9. Кирпа Т. М., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко И.М., Иванников Р.В., Шелудько Ю.В. Создание растений орхидеи *Dendrobium linguella* RCHB. F., экспрессирующих ген $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии. // Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада. Київ, Україна. 2012 р. С. 265-266. *(якісна ліхеназна реакція, виділення ДНК, опрацювання результатів)*

10. Кирпа Т. Н., Герасименко И.М., Сахно Л.А., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова И.В., Шелудько Ю.В. Особенности жирнокислотного состава мембранных липидов растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гены дельта-9- и дельта-12-ацил-липидных десатураз цианобактерий. // Тезисы матер. 17-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", 21 – 26 апреля, 2013 г., Пущино, РФ. 2013 г. С. 339. *(вирощування рослин для досліджень, підготовка проб для аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, опрацювання результатів)*

11. Гра О.А., Хаджиев Т.А., Тюрин А.А., Кирпа-Несмиян Т.Н., Рудас В.А., Герасименко И.М., Юрьева Н.О., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологических генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам. // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых 21-26 сентября 2015 г. Петрозаводск, РФ. 2015 г. С. 143. *(вирощування рослин для досліджень, аналіз активності ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів)*

12. Кирпа-Несмиян Т.Н. Линии *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие ген Δ -12-цил-липидной десатуразы цианобактерий в условиях гипотермического стресса. // Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической

Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге 4 – 9 октября, 2015. Санкт-Петербург, РФ. 2015 г. С. 75. *(вирощування рослин для досліджень, дослідження активності ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання тез)*

13. Кирпа-Nesmiiian T.M., Sheludko Y.V. Superoxide dismutase activity in *Nicotiana tabacum* expressing hybrid cyanobacterial $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene after hyperthermal stress. // International conference Advances in cell biology and biotechnology, 11-13 October, 2015, Lviv, Ukraine. 2015. С. 38. *(вирощування рослин для досліджень, визначення активності ферменту СОД, опрацювання результатів, написання тез)*

14. Гра О.А., Хаджиев Т.А., Тюрин А.А., Кирпа-Несмиян Т.Н., Рудас В.А., Герасименко И.М., Юрьева Н.О., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологичных генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам. Генетика и Биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»). II Международная научная конференция. 13–16 октября, 2015 г.: материалы конференции / Ред. колл.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск, Республика Беларусь 2015 г. С. 56. *(вирощування рослин для досліджень, підготовка рослинних екстрактів для аналізу спектру жирних кислот, інтерпретація результатів)*

15. Кирпа-Несмиян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А, Кучук М.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum*, которые несут ген *desA* десатуразы цианобактерии. Международная научно-практическая конференция «Современное картофелеводство Евразийского содружества: от науки до практики» 11-14 июля 2016 г., Самохваловичи, Республика Беларусь. С. 132. *(ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, опрацювання результатів, написання тез)*

16. Кирпа-Несміян Т.М. Дослідження успадкування гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії у рослин тютюну T1 покоління. Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017», 20–22 квітня, Тернопіль, Україна, 2017 р. С. 254. (*вирощування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, інтерпретація результатів, написання тез*)
17. Tetiana Kyrypa-Nesmiian. Research plants *Nicotiana tabacum* generation T1 expressing gene *desA* in terms hot stress. International conference “Smart Bio” 2017, May 18-20. Kaunas, Lithuania, 2017. С. 128. (*вирощування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, опрацювання результатів, написання тез*)

Зміст

Вступ	22
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
РОЗДІЛ 1.	
1.1. Механізми адаптації рослин до абіотичних стресів	
1.1.1. <i>Стійкість рослин до знижених температур та заморозків.</i>	33
1.1.2. <i>Стійкість рослин до високих температур.</i>	34
1.1.3. <i>Стійкість рослин до осмотичного стресу.</i>	36
1.2. Властивості десатураз ціанобактерій.	38
1.3. Антиоксидантний фермент супероксиддисмутаза.	42
1.4. Малоновий диальдегід.	44
1.5. Участь електролітів в обміні речовин.	47
РОЗДІЛ 2.	
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
2.1. Вихідні генетичні конструкції.	49
2.2. Рослинний матеріал.	49
2.3. Трансформація рослин <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -опосередкованим методом.	50
2.4. Отримання рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що містять в своєму геномі та експресують одночасно гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз.	51
2.5. Умови культивування <i>Nicotiana tabacum in vivo</i> .	51
2.6. Полімеразна ланцюгова реакція.	52
2.7. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази.	52
2.8. Кількісне визначення активності термостабільної ліхенази.	53
2.9. Визначення активності супероксиддисмутаза.	54
2.10. Визначення рівня втрати електролітів.	54
2.11. Визначення рівня накопичення малонового диальдегіду.	55
2.12. Статистичний аналіз.	55
2.13. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії.	56

Розділ 3. Результати та обговорення.

3.1. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i>	57
3.1.1. Аналіз рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i> в умовах знижених температур та заморозків.	61
3.1.2. Аналіз рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i> в умовах підвищених температур.	66
3.1.3. Дослідження рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i> в умовах осмотичного стресу.	70
3. 2. Аналіз рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гени деапураз вирощені в умовах <i>in vivo</i> .	77
3.3. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i> T1 покоління.	83
3.3.1. Аналіз рослин <i>N. tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> або <i>ats1A::desC::licBM3</i> T1 покоління в умовах холодостресу	87
3.4. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресує гібридний гени <i>desA::licBM3</i> під холодоіндукованим промотором CBF1.	91
3.4.1. Аналіз рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридний гени <i>desA::licBM3</i> під холодоіндукованим промотором CBF1 в умовах короткострокових заморозків.	94
3.5. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що одночасно експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> та <i>ats1A::desC::licBM3</i>	98
3.5.1. Аналіз рослин <i>Nicotiana tabacum</i> , що експресують гібридні гени <i>desA::licBM3</i> та <i>ats1A::desC::licBM3</i> в умовах знижених температур та заморозків.	101

3.6. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Solanum tuberosum</i> , що експресують гібридний ген <i>desA::licBM3</i> .	106
3.6.1. Аналіз рослин <i>Solanum tuberosum</i> , що експресують гібридний ген <i>desA::licBM3</i> в умовах осмотичного стресу.	109
3.7. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин <i>Dendrobium linguella</i> , що експресують гібридний ген <i>ats1A::desC::licBM3</i> .	114
3.7.1. Аналіз рослин <i>Dendrobium linguella</i> , що експресують гібридний ген <i>ats1A::desC::licBM3</i> в умовах зижених температур.	118
ВИСНОВКИ	123
Література	125

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ats1A::desC::licBM3 – гібридний ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 і термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* з сигналом хлоропластного таргетингу;

desA::licBM3 – гібридний ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 і термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum*;

LB – поживне середовище Лурия – Бертані.

licB – ген термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* ;

MS – поживне середовище Мурашиге – Скуга ;

АБК – абсцизова кислота;

АФК – активні форми кисню;

БТШ – білки теплового шоку;

ЖК – жирні кислоти;

НЖК – ненасичені жирні кислоти;

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти;

СОД – фермент супероксиддисмутаза.

Вступ

В даний час досить актуальним є дослідження механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів. Вивчення нових напрямків в адаптації рослин до абіотичних стресів важливе у зв'язку зі змінами клімату та різкими температурними перепадами, пов'язаних з антропогенною діяльністю на території України, які ми спостерігаємо в останні десятиріччя [1,2]. Адаптація рослин до абіотичних стресів (впливу критичних температур, сильного вітру, суховіїв, пилових буревіїв, заморозків тощо) проходить декількома етапами. Доцільним є отримання рослин методами генетичної інженерії, що дозволяють протягом декількох років модифікувати рослинні організми, які будуть стійкими одночасно до декількох абіотичних факторів [3]. Адаптація рослин до стресу залежить, насамперед, від властивостей мембран [4,5]. Зі збільшенням частки ненасичених жирних кислот у складі мембранних ліпідів підвищується в'язкість мембран, збільшується їх пластичність, що дозволяє запобігати механічним пошкодженням (тріщини, розриви) під час впливу температурних стресів або нестачі вологи [6].

Десатурази – це ферменти, що каталізують утворення подвійних зв'язків у жирних кислотах (ЖК) та тим самим перетворюють їх з насичених в ненасичені [7]. Підвищується стійкість рослин до знижених температур та заморозків, умов зневоднення рослин внаслідок нестачі вологи або дії сильних вітрів, засоленості ґрунтів [8]. Загалом, ферменти десатурази поділяються на три групи залежно від переносника субстрату: ацил-ліпідні десатурази використовують у якості субстрата ЖК, які знаходяться в складі ліпідів, ацил-АПБ використовують ЖК, які зв'язані з ацил-переносним білком, ацил-КоА використовують ЖК, які приєднані до коферменту ацетилювання [9]. У рослин функціонують два види десатураз – ацил-АПБ та ацил-ліпідні десатурази [10]. У роботі використовували гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, які утворюють подвійні зв'язки у положеннях $\Delta 9$ (ген *desC*) та $\Delta 12$ (ген *desA*) [11].

Слід зазначити, що утворення подвійних зв'язків відбувається у визначеній послідовності: спочатку утворюються подвійні зв'язки в положеннях $\Delta 9$ та $\Delta 12$, а вже потім – у положеннях $\Delta 6$ та $\Delta 15$. Тому жирні кислоти, які утворюються (олеїнова та лінолева), забезпечують субстратом інші типи десатураз [12,13].

Ціанобактерії одні з найдавніших організмів на нашій планеті, які за останні два мільйони років не зазнали суттєвих мутаційних змін геному, однак, мають гарні показники адаптації до впливу абіотичних стресів. Використання у роботі рослин *Nicotiana tabacum*, як модельного об'єкту, дозволяє досліджувати експресію перенесених генів не рослинного походження у рослинному організмі для того, щоб в подальшому створювати стійкі сорти цінних сільськогосподарських культур, які містять даний ген.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за темами НДР: III-1-15 "Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах", II –I-17 "Вивчення функціонування гетерологічних генів та їх впливу на адаптаційні характеристики рослинних систем в умовах біотичних та абіотичних стресів" та за підтримки гранту НАНУ УкрІНТЕІ № 0115U004171.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити вплив експресії генів десатураз, перенесених у вищі рослини на стійкість рослин до абіотичних стресів та вплив зміни спектру жирних кислот на адаптацію рослин до температурних стресів та умов зневоднення.

Відповідно до мети були поставлені завдання:

1. Отримати трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують одночасно гени десатураз *desA* та *desC*. Дослідити адаптацію отриманих трансгенних рослин до умов знижених температур та заморозків.

2. Отримати трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1. Дослідити адаптацію отриманих трансгенних рослин до дії знижених температур та заморозків.
3. Проаналізувати адаптацію рослин тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гени десатураз *desA* або *desC*, до дії як гіпотермічного, так і гіпертермічного стресів.
4. Дослідити адаптацію рослин орхідей *Dendrobium linguella*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desC*, в умовах стресу знижених температур.
5. Дослідити адаптацію рослин картоплі *Solanum tuberosum* сортів української селекції, що експресують ген *desA*, до дії умов осмотичного стресу.

Об'єкт дослідження – гетерологічна експресія генів ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій у вищих рослинах;

Предмет дослідження – отримання трансгенних рослин *N. tabacum*, дослідження впливу збільшення частки ненасичених жирних кислот на стійкість рослин до абіотичних стресів.

Методи дослідження. Вирощування рослин в умовах *in vitro* та *in vivo*. Генетична трансформація листкових дисків рослин здійснювалась *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом. Дослідження наявності перенесених генів здійснювалось методом ПЛР. Дослідження активності ферментів десатураз відбувалось за ферментативною активністю репортерного білка термостабільної ліхенази, ген якого був трансляційно злитий із геном десатурази, методом якісного та кількісного ліхеназного тесту. Визначення активності ферменту супероксиддисмутази, визначення накопичення малонового діальдегіду, дослідження рівня втрати електролітів. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії.

Наукова новизна. Вперше було отримано трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1, тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно гібридні гени десатураз *desA* та *desC*. Досліджено вплив експресії гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази у рослин орхідей *D. linguella* в умовах знижених температур. Показано адаптацію рослин картоплі *S. tuberosum* сортів української селекції (Лугівська, Слов'янка, Серпанок), що експресують ген *desA*, до дії умов осмотичного стресу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані лінії рослин тютюну *N. tabacum* були досліджені на стійкість до умов знижених температур та заморозків, а також протестовані на чутливість до впливу високих температур. Дані дослідження є підґрунтям для створення сортів цінних сільськогосподарських рослин, які будуть стійкими до температурних коливань.

Отримані та протестовані на стійкість до умов знижених температур лінії рослин орхідей *D. linguella* можуть використовуватись в якості декору для оформлення інтер'єрів та екстер'єрів.

Південні області України потерпають від посухи та дії сильних вітрів у період, який припадає на дозрівання бульб картоплі. Лінії картоплі, що містять у своєму геномі та експресують перенесені додаткові гени десатураз, показали кращі адаптивні властивості порівняно з контрольними не трансгенними лініями. Тому їх можна рекомендувати для використання у технічних цілях.

Отримані результати вносять вклад у розробку новітніх біотехнологічних прийомів для створення ліній та сортів рослин, стійких до абіотичних стресів.

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, представлені у роботі, були виконані автором у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України разом із деякими

співробітниками. Вибір об'єкту і напрямку досліджень та інтерпретація деяких результатів були здійснені разом із науковим керівником – к.б.н., с.н.с. Шелудьком Ю. В. Здобувачем виконано більшу частину досліджень. Отримано трансгенні лінії тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно гібридні гени десатураз *desA* і *desC*, та рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1.

Виділено ДНК, здійснено аналіз ПЛР для детекції перенесених генів та якісні і кількісні ліхеназні реакції для підтвердження експресії генів десатураз за репортерним білком. Здійснено аналізи активності ферменту супероксиддисмутази, рівня накопичення малонового диальдегіду, рівня електролітів. Культивування рослин тютюну та картоплі *in vitro* та *in vivo*. Було пророщено насіння на середовищі MS із додаванням селективних агентів *N. tabacum* покоління T1 *in vitro*, та переведено їх в умови культивування *in vivo*.

Всі рослини, використані у дослідженнях, були проаналізовані методом газової хроматографії та мас-спектрометрії разом з к.б.н., зав. Центром колективного користування, Остапчуком А. М., та к.б.н., н.с. Хархотою М. О. Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3*, були отримані та люб'язно надані для подальших досліджень д.б.н., с.н.с. Сахно Л. О.

Рослини орхідей *D. linguella*, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3* та рослини картоплі *S. tuberosum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3* були отримані та люб'язно надані для подальших досліджень к.б.н, с.н.с., Рудасом В. А. відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Здобувач особисто проводив роботу при оформленні тез та статей із використанням результатів дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені та доповідались на XII Міжнародній конференції молодих вчених "Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів" (Київ, 2012); 17 Міжнародній Пушчинській школі-конференції молодих вчених "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2013); Всеросійській науковій конференції для молодих вчених (Петрозаводськ, 2015); III (XI) Міжнародній Ботанічній конференції молодих вчених (Санкт-Петербург, 2015); International conference "Advances in cell biology and biotechnology" (Львів, 2015); II Міжнародній науковій конференції "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы" (Мінськ, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції "Современное картофелеводство Евразийского содружества: от науки до практики" (Самохваловичі, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю "Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017", (Тернопіль, 2017); International Conference "Smart Bio" (Kaunas, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць. З них: 4 статті у провідних фахових виданнях України, 3 статті у зарубіжних виданнях та 10 публікацій – у матеріалах та тезах міжнародних конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 148 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу та основних розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення) висновки, список літератури (223). Робота містить 6 таблиць та 62 ілюстрації.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Герасименко И. М., Сахно Л. А., Кирпа Т. Н., Остапчук А. Н., Хаджиев Т. А., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. В. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены $\Delta 9$ или $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы //

Физиология растений. Москва, РФ. 2015, Т – 62, № 3, С.1–10. (*вирощування рослин для досліджень, якісний та кількісний ліхеназні тести, аналіз активності ферменту СОД*)

2. Кырпа-Nesmiian T. Getting plants *Nicotiana tabacum* that simultaneously express heterologous gene of two acyl-lipid desaturases cyanobacterium *desC* and *desA*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies. Bucharest, Romania. 2016. Vol. XX, ISSN 2285-1364, С. 65 – 68. (*генетична трансформація рослин N. tabacum Agrobacterium tumefaciens-опосередкованим методом, вирощування рослин, ПЛР, опрацювання результатів, написання статті*)

3. Кырпа-Несміян Т.М., Кучук М.В., Шелудько Ю.В. Дослідження фізіолого-біохімічних характеристик рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени *desA* або *desC* в умовах стресів різних температур. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. Київ, Логос – 2016, Т – 2 № 14, С. 21-26. (*вирощування рослин для досліджень, аналіз рівня МДА, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті*)

4. Кырпа-Несміян Т.М., Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2016, Т – 19, С. 139-143. (*вирощування рослин тютюну в умовах in vivo, дослідження рівня втрати електролітів, рівень МДА, активність ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів та написання статті*)

5. Кырпа-Несміян Т.М., Герасименко І.М., Сахно Л.О., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В., Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени $\Delta 9$ і $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2015, Т – 17, С.197-200. (*вирощування рослин для досліджень,*

аналіз визначення втрати електролітів, опрацювання результатів, написання статті)

6. Кирпа-Несмиян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А., Кучук Н.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum* экспрессирующие ген $\Delta 12$ - ацил-липидной десатуразы цианобактерии. // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. Минск, Білорусь. 2016. – Т – 24. – 432, С. 81-87. (ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті)

7. Кирпа Т.Н., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко И.М., Иванников Р.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова И.В., Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии в орхидее *Dendrobium linguella* Rchb. F. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос. – 2013, – Т – 12, С. 244-248. (підбирання умов холодостресу, аналіз визначення втрати електролітів)

8. Кирпа Т. М., Герасименко И.М., Сахно Л.А., Клочко В.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова И.В., Шелудько Ю.В. Экспрессия в *Nicotiana tabacum* генов ацил-липидных десатураз цианобактерий без сигналов транспорта в хлоропласты. // Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада. Київ, Україна. 2012 р. С. 267-268. (вирощування рослин для досліджень, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів)

9. Кирпа Т. М., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко И.М., Иванников Р.В., Шелудько Ю.В. Создание растений орхидеи *Dendrobium linguella* RCHB. F., экспрессирующих ген $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии. // Тези матер. XII конференції молодих вчених

«Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада. Київ, Україна. 2012 р. С. 265-266.

(якісна ліхеназна реакція, виділення ДНК, опрацювання результатів)

10. Кирпа Т. Н., Герасименко И.М., Сахно Л.А., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова И.В., Шелудько Ю.В. Особенности жирнокислотного состава мембранных липидов растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гены дельта-9- и дельта-12-ацил-липидных десатураз цианобактерий. // Тезисы матер. 17-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", 21 – 26 апреля, 2013 г., Пущино, РФ. 2013 г. С. 339. *(вирощування рослин для досліджень, підготовка проб для аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, опрацювання результатів)*

11. Гра О.А., Хаджиев Т.А., Тюрин А.А., Кирпа-Несмиян Т.Н., Рудас В.А., Герасименко И.М., Юрьева Н.О., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологических генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам. // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых 21-26 сентября 2015 г. Петрозаводск, РФ. 2015 г. С. 143. *(вирощування рослин для досліджень, аналіз активності ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів)*

12. Кирпа-Несмиян Т.Н. Линии *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие ген Δ -12-цил-липидной десатуразы цианобактерий в условиях гипотермического стресса. // Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге 4 – 9 октября, 2015. Санкт-Петербург, РФ. 2015 г. С. 75. *(вирощування рослин для досліджень, дослідження активності ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання тез)*

13. Kyrpa-Nesmiiian T.M., Sheludko Y.V. Superoxide dismutase activity in *Nicotiana tabacum* expressing hybrid cyanobacterial Δ 12-acyl-lipid desaturase

gene after hyperthermal stress. // International conference Advances in cell biology and biotechnology, 11-13 October, 2015, Lviv, Ukraine. 2015. С. 38. *(вирощування рослин для досліджень, визначення активності ферменту СОД, опрацювання результатів, написання тез)*

14. Гра О.А., Хаджиев Т.А., Тюрин А.А., Кирпа-Несмиян Т.Н., Рудас В.А., Герасименко И.М., Юрьева Н.О., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологичных генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам. Генетика и Биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»). II Международная научная конференция. 13–16 октября, 2015 г.: материалы конференции / Ред. колл.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск, Республика Беларусь 2015 г. С. 56. *(вирощування рослин для досліджень, підготовка рослинних екстрактів для аналізу спектру жирних кислот, інтерпретація результатів)*

15. Кирпа-Несмиян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А, Кучук М.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum*, которые несут ген *desA* десатуразы цианобактерии. Международная научно-практическая конференция «Современное картофелеводство Евразийского содружества: от науки до практики» 11-14 июля 2016 г., Самохваловичи, Республика Беларусь. С. 132. *(ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, опрацювання результатів, написання тез)*

16. Кирпа-Несмиян Т.М. Дослідження успадкування гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії у рослин тютюну Т1 покоління. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017», 20–22 квітня, Тернопіль, Україна, 2017 р. С. 254. *(вирощування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, інтерпретація результатів, написання тез)*

17. Tetiana Kyrpa-Nesmiian. Research plants *Nicotiana tabacum* generation T1 expressing gene *desA* in terms hot stress. International conference “Smart Bio“ 2017, May 18-20. Kaunas, Lithuania, 2017. С. 128. (виращування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, опрацювання результатів, написання тез)

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми адаптації рослин до абіотичних стресів

1.1.1. Стійкість рослин до знижених температур та заморозків.

Холодовий стрес, що включає в себе дію знижених температур та/або заморозків, негативно позначається на рості і розвитку рослин, оскільки, значно обмежує їх продуктивність [14]. Для стабілізації внутрішньоклітинних структур істотне значення має накопичення захисних речовин, що призводить до покращення взаємодії між компартментами клітини, або її органелами. Як захисні речовини від негативного впливу абіотичних стресів оточуючого середовища рослина використовує мінеральні солі, цукри, водорозчинні білки, амінокислоти, фосфоліпіди [15].

Механізми дії цих речовин досить різноманітні і пов'язані зі специфічністю будови тієї чи іншої сполуки [16]. Встановлено, що кріопротектори здатні знижувати ймовірність утворення великих кристалів льоду, беруть участь в структурній перебудові цитоплазми, сприяють утворенню стабільних клітинних мембран, та тим самим захищають їх від пошкодження [17].

Підвищення вмісту неорганічних сполук (хлоридів калію або натрію) призводить до зниження льодоутворення [18]. Іони мінеральних солей зв'язують воду і таким чином знижують температуру її замерзання. Зростання вмісту цукрів, навіть при незначних концентраціях (глюкоза 1-2%), має істотно захисну дію, оскільки, знижує температуру замерзання на 8-11°C [19].

Під час адаптації рослин до низьких температур збільшується плинність мембран, що є результатом збільшення кількості ненасичених жирних кислот в складі мембранних фосфоліпідів [20]. Як відомо, зміну насичених жирних кислот на ненасичені жирні кислоти в ліпідах здійснюють ферменти – десатурази та ацетелтрансферази. Активність цих ферментів, а також експресія генів, що їх кодують зростають у відповідь на вплив знижених температур [21].

Теплолюбні рослини мають ряд захисних пристосувань до значення дії низьких позитивних температур. Перш за все, це включає підтримку стабільності мембран та попередження втрати іонів [22].

Рослини стійкі до дії гіпотермічного стресу відрізняються збільшенням частки ненасиченості жирних кислот у складі фосфоліпідів мембран [23]. Це дозволяє підтримувати мембрани фізіологічно активними і запобігає їх руйнуванню. У зв'язку з цим важливу роль виконують ферменти ацетилтрансфераз та десатураз [24]. Доведено, що мутанти, у яких відсутні ці ферменти, не можуть переносити знижені температури [25]. Разом з тим, введення в геном теплолюбних культур генів, що кодують десатурази, призводило до підвищеної стійкості таких організмів до холоду [26]. Трансформовані рослини тютюну з введенням гена десатурази, відрізняються підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот та зростанням холодостійкості [27].

Процеси адаптації рослин до низьких позитивних температур проявляються в здатності підтримувати гомеостаз [28]. Це досягається завдяки широкому температурному діапазону роботи ферментів і синтезу протекторних сполук [29]. У стійких рослин підвищується потреба у кисні, зростає ефективність роботи антиоксидантної системи, синтезуються захисні стресові білки.

Показано, що при дії низьких позитивних температур індукується синтез низькомолекулярних білків. Експериментальні дані показали подібність реакції генома на вплив низьких критичних температур багатьох рослин, що проявляється в зміні інтенсивності транскрипції одних і тих же генів низькомолекулярних білків [30].

1.1.2. Стійкість рослин до високих температур

Більшість видів рослин реагує на стрес при температурі 35-40°C. Краще переносять підвищену температуру зневоднені органи: насіння та пилок [31]. Однак є вищі рослини, головним чином рослини пустель

(наприклад, сукуленти), які переносять підвищення температури до 60°C [32]. Одним з важливих фізіологічних процесів рослин є транспірація. Температура листя, що здійснює транспірацію, завжди нижче температури повітря [33]. Тому водний дефіцит, який виникає при нестачі води, збільшує несприятливу дію гіпертермічного стресу [34]. Високі температури, що згубно впливають на організми, викликають пошкодження мембран та деактивацію білків [35].

Температура денатурації різних білків-ферментів відрізняється. Навіть часткова денатурація деяких, найбільш термолабільних ферментів, призводить до порушення узгодженості процесів обміну [36]. Накопичуються розчинні азотисті сполуки та інші отруйні проміжні продукти обміну, в результаті чого відбувається загибель клітин [37]. Висока температура гальмує як фотосинтез, так і дихання [38].

Стійкість рослин до умов високих стресових температур досягається завдяки пристосувальним змінам метаболізму, в тому числі, зростанням в'язкості цитоплазми, збільшенням вмісту осмотично активних речовин, органічних кислот, що зв'язують аміак [39]. Стійкі до високих температур рослини здатні до синтезу більш жаростійких білків-ферментів [40].

На організменому рівні стійкість до високих температур пов'язана з пристосуваннями, які спрямовані на зменшення транспірації та інсоляції шляхом згортання листя або зменшення їх розміру [41].

При високих температурах в клітинах синтезуються специфічні білки, толерантні до перегріву, і так звані білки теплового шоку (БТШ) [42]. Вони допомагають клітині вижити при дії температурного стресора і відновити фізіологічні процеси після його припинення. БТШ утворюються в результаті експресії певних генів [43]. На прикладі сої показано, що при температурі від 25° до 40°C синтезуються специфічні мРНК, і вже через 3-5 хв після підвищення температури з'являються БТШ [44,45].

Клітини, здатні до утворення таких білків стійкі до високих температур. Так, в дослідях на арабідопсисі індукція експресії

транскрипційного фактора, який бере участь в синтезі БТШ, підвищувала стійкість до спеки [46,47]. При інактивації синтезу БТШ, стійкість до високих температур різко падала. Деякі з цих БТШ синтезуються не тільки при підвищеній температурі, а й при інших стрес-факторах, наприклад, при нестачі води, низьких температурах, дії солей [48,49].

Показано, що досить часто після дії одного стрессора клітини стають стійкими до інших [50]. Так, томати після 48-годинного дії 38°C витримували температуру 2°C протягом 21 доби [51].

1.1.3. Стійкість рослин до осмотичного стресу

У природних умовах, дуже часто, навіть в звичайні ясні дні надходження води в рослину не встигає за її випаровуванням [52]. Утворюється водний дефіцит, який легко виявити, визначаючи вміст води в листі в різні години доби [53].

Збільшення водного дефіциту супроводжується зменшенням водного потенціалу листя. Саме тому, в денні години водний потенціал листя, як правило, найменший [54,55]. Значному збільшенню водного дефіциту перешкоджає скорочення транспірації в нічні години [56,57]. У деяких випадках, може спостерігатися втрата тургору.

Перші фази в'янення схожі з першими фазами плазмолізу, так як в силу зменшення вмісту води об'єм клітини зменшується [58]. Однак, в подальшому процеси в'янення і плазмолізу проходять по різному. При плазмолізі відбувається відставання цитоплазми від клітинної стінки [59,60]. Якщо своєчасно забезпечити рослину водою, то тургор відновлюється, життєдіяльність організму підтримується, однак, можуть спостерігатись пошкодження мембран, або органел клітини [61,62].

Наслідки водного дефіциту можуть бути різноманітними. Перш за все, в клітинах знижується вміст вільної води, одночасно зростає концентрація клітинного соку [63,64]. Відбуваються зміни в цитоплазмі, збільшується її в'язкість. Зростає проникність мембран. Листя, що зазнало браку води, при

переміщенні у сприятливі умови виділяє значну кількість солей та інших розчинних сполук [65].

Посилений вихід солей (екзоосмос) спостерігається також з клітин кореня, що піддавались дії осмотичного стресу. Одночасно ці клітини втрачають здатність до поглинання поживних речовин [66,67].

Зміни пов'язані з порушеннями в структурі мембран спостерігаються при зниженні вмісту води нижче 20% від норми [68]. В результаті порушення гідратних оболонок змінюється конфігурація білків-ферментів і, як наслідок, їх активність. Особливо різко падає активність ферментів, які каталізують процеси синтезу [69]. Разом з тим активність ферментів, які каталізують процеси розпаду, зростає. Наприклад, крохмаль розщеплюється до глюкози.

Зневоднення призводить до підвищення активності ферментів, які каталізують розщеплення білків (протеоліз) [70,71]. Вміст білкового азоту різко падає, а не білкового – зростає. Розпад білків при зневодненні може бути настільки глобальним, що настає загибель рослин [72, 73].

Змінюється обмін нуклеїнових кислот. Показано, що за умов зростання водного дефіциту посилюється розпад РНК, зростає активність рибонуклеаз, призупиняється синтез ДНК [74]. Що стосується інтенсивності дихання, то в перший період в'янення вона зростає. При цьому цукри накопичуються переважно в листі, так як відтік асимілятів під час посухи різко гальмується [75].

З усіх фізіологічних процесів найбільш чутливим до нестачі вологи є процес росту [76]. Спостереження показують, що у початковий період, коли рослина відчуває нестачу вологи, фотосинтез проходить, дихання здійснюється нормальним шляхом, однак, ріст вже призупиняється [77]. Це пояснюється кількома причинами. Зменшення вмісту води припиняє редуплікацію ДНК, що впливає на поділ клітин [78]. Друга фаза росту клітин (фаза розтягування), що йде за рахунок посиленого надходження води в умовах водного дефіциту різко гальмується [79].

Клітини, що утворилися в умовах посухи, відрізняються малим розміром. Нестача води призводить і до інших анатомічних змін – більшого розвитку механічних тканин [80].

Гальмування процесів росту, що спостерігається при розвитку водного дефіциту, може також бути наслідком порушення гормонального обміну. Показано, що при нестачі води збільшується активність інгібіторів росту (абсцизової кислоти, етилену) [81]

1.2. Властивості десатураз ціанобактерій

В процесі еволюції живі організми виробили декілька механізмів пристосовань до змін умов оточуючого середовища, використовуючи різноманітні стратегії адаптації [82]. На сьогоднішній день вивчення стресової толерантності передбачає загальну відповідь регуляторних факторів в механізмах адаптації до умов навколишнього середовища [83].

В даний час велика увага надається вивченню холодостійкості рослин на молекулярному рівні [84]. Низькі температури викликають значну перебудову всього клітинного метаболізму. Ці зміни включають десатурацію жирних кислот, накопичення поліолів, амінокислот, гліцин-бетаїна, сахарози, багаточисленних білків [85].

Під дією низьких температур мембрани можуть здійснювати фазовий перехід в стан гелю і не здатні підтримувати іонні градієнти та нормальне функціонування мембранозв'язаних ферментних систем, в результаті чого порушується клітинний метаболізм, що призводить до загибелі всього організму [86].

Здатність клітин рослин до адаптації в таких умовах пов'язують з можливістю зміни текучості мембран за рахунок збільшення кількості ненасичених ЖК в мембранних фосфоліпідах [87]. В зв'язку з цим важливе значення має дослідження структури, властивості та регуляції десатураз ЖК – ферментів, які відповідають за утворення подвійних зв'язків у їхніх

ланцюгах та, як наслідок, за зміни фізичних властивостей біологічних мембран [88, 89].

Відомо, що ліпідний склад мембран дуже швидко реагує на зниження температури [90]. Зазвичай, в першу чергу змінюється рівень ненасиченості жирних кислот мембранних ліпідів.

У морозостійких рослин в період низькотемпературної адаптації синтезуються ліпіди, збагачені ліноленовою кислотою, що при зниженні температури перешкоджає переходу мембрани із рідкокристалічного стану в твердий гель [91]. Також у злаків, що зимують уже в перші 15-20 діб дії зниженої температури відбувається десатурація раніше синтезованих жирних кислот мембранних ліпідів.

У холодостійких рослин при низькій плюсовій температурі не спостерігається фазових переходів ліпідів, завдяки підвищенню в них відносного вмісту ненасичених жирних кислот, внаслідок чого мембрани залишаються функціонально активними в широкому діапазоні температур [92]. Здатність клітин теплолюбних рослин адаптуватись до холоду в значній мірі визначається їх можливістю синтезувати ненасичені жирні кислоти.

Десатурази жирних кислот є ферментами, які утворюють подвійні зв'язки в ЖК мембранних ліпідів, тим самим сприяють стійкості мембран до дії низьких температур [93]. Десатурація жирних кислот в гліцероліпідах є важливою реакцією, яка необхідна для підтримання фізичних властивостей мембранних ліпідів [94].

При нормальній (фізіологічній) температурі полярні гліцероліпіди, які містять тільки насиченні ЖК, не утворюють подвійного шару – основної структури біологічних мембран [95]. Утворення певної кількості подвійних зв'язків в ЖК знижує температуру переходу із фази гелю (тверда фаза) в рідкокристалічну фазу, та надає мембранам необхідну ступінь плинності [96]. Параметри плинності мембран є визначальними для функціонування багатьох мембранозв'язаних ферментних систем.

Десатурація в цис-положенні більш ефективна для зміни фізичних властивостей ліпідів, ніж десатурація в транс-положенні, тому абсолютна більшість подвійних зв'язків знаходиться в цис-положенні [97].

Десатурази ЖК поділяються на такі групи: ацил-ліпідні десатурази використовують у якості субстрата ЖК, що знаходяться у складі ліпідів, ацил-АПБ використовують ЖК, що зв'язані з ацил-переносним білком, ацил-КоА використовують ЖК, що приєднані до коферменту ацетилювання [98]. У рослин функціонують два види десатураз – ацил-АПБ та ацил-ліпідні десатурази [99].

Відомо, що активні десатурази мають два атома тривалентного ферума, які формують активний комплекс з атомом кисню: Fe-O-Fe [100]. Цей комплекс здатний утворювати подвійні зв'язки -C=C- в ланцюгах ЖК. Кристалізація десатурази показала, що функціональний фермент складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких зв'язує два атоми заліза в активному центрі [101]. Один із атомів заліза взаємодіє з глютаміноювою кислотою (E196) та гістидином (H232). Другий атом заліза взаємодіє з глютаміноювою кислотою та гістидином (E105 і H146 відповідно) [102].

Основа змін специфічності десатураз обумовлена геометрією субстрат-зв'язуючого каналу [103]. Так, наприклад, фермент A188G/Y189F, в якому аланін і тирозин замінені на менші за розміром амінокислоти гліцин і фенілаланін, має видовжений канал, здатний “прийняти” ЖК на два вуглеводних атома більше, ніж фермент дикого типу [104].

Важливою спільною особливістю первинної структури ацил-ліпідних десатураз є наявність постійного мотиву в їх амінокислотних послідовностях – трьох консервативних гістидинових кластерів, які можуть брати участь в зв'язуванні атомів заліза в активному центрі десатурази [105].

Вивчення умов, в яких функціонують гени десатураз, важливо для розуміння механізмів адаптації біологічних мембран та організмів в цілому. Ліпідний склад мембран, а також ступінь ненасиченості ЖК змінюються в

широких межах при зміні температур, інтенсивності освітлення, концентрації осмотичних речовин та солей [106].

Вивчення регуляції експресії генів десатураз необхідно ще й тому, що продукти десатуразної реакції – ненасичені жирні кислоти – не тільки регулюють експресію десатураз шляхом зворотнього зв'язку, але і здатні контролювати експресію інших білків, як структурних, так і регуляторних [107].

В клітинах рослин і ціанобактерій десатурази відіграють важливу роль в адаптації до змін умов оточуючого середовища. Клонування генів десатураз з цих об'єктів в останні роки зробило можливим вивчення їх експресії та ролі ЖК в процесах адаптації. Найбільш об'ємно вивчена експресія генів десатураз ЖК ціанобактерій [108].

Ген *desC*, який кодує Δ -9-десатуразу, перетворює стеарат в олеат; ген *desA*, який кодує Δ -12-десатуразу, перетворює олеат в лінолеву кислоту; Δ -6-десатураза (*desD*) в основному використовує ліноленову кислоту в якості субстрата, але в випадку мутації гена *desA* можливе утворення міnorних кількостей 18:2 Δ 6, Δ 9 ЖК [109].

Адаптаційна зміна жирнокислотного складу мембранних ліпідів ціанобактерій під дією низьких температур відома давно, але питання щодо молекулярних механізмів даного процесу залишалися відкритими. Існує декілька гіпотез, які пояснюють накопичення ПНЖК [110]. Так вважалось, що низькі температури можуть викликати підвищення активності пресинтезованих десатураз [111].

Альтернативна схема передбачала, що при зниженні температури сповільнювався синтез насичених ЖК *de novo*, в той час як активність десатураз залишається без змін, в результаті чого співвідношення насичених і поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) змінюється на користь останніх [112].

Існують також дані про пригнічення десатурації рифампіцином та хлорамфениколом – інгібіторами транскрипції і трансляції у прокаріот, що передбачало синтез самих десатураз *de novo* при низьких температурах [113].

Накопичення мРНК генів тих десатураз, які відповідають за синтез ПНЖК, вказує на те, що активація десатурації при зниженні температури є результатом індукції транскрипції цих генів [114].

1.3. Антиоксидантний фермент супероксиддисмутаза

Антиоксидантний фермент супероксиддисмутаза був відкритий наприкінці 1930-х років Маном і Кеїліном та був названий гемокупреїном [115]. Вважали, що біологічна роль даного білка полягає в запасанні іонів міді. У 1969 році Мак-Кордом та Фридовичем було виявлено, що гемокупреїн являється ферментом, який каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів [116]. Внаслідок цього новий фермент набув назву супероксиддисмутаза (СОД).

В 1970-ті роки із *Escherichia coli* були виділені ферменти з аналогічною функцією, але замість іонів міді та цинку в активному центрі вони містили іони заліза або марганцю. Таким чином, окрім CuZn СОД відкрили існування ще двох ізоформ – MnСОД та FeСОД [117]. Подальші дослідження показали наявність СОД в клітинах всіх живих організмів різного рівня організації: рослин, людини, тварин, мікроорганізмів, грибів, бактерій [118].

СОД каталізує диспропорціонування супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та перекису водню [119]. Механізм дії СОД полягає в послідовному відновленні та окисленні супероксидними аніон-радикалами металу активного центру ферменту.

Вивченню СОД приділяють багато уваги, оскільки їй належить важлива роль в захисті клітин та тканин від окисної деструкції [120]. Супероксидні радикали як первинні продукти одноелектронного відновлення

молекулярного кисню є джерелом утворення інших, в тому числі і більш реакційно ефективних активних форм кисню (АФК) [121].

Перекис водню, гідроксильні та гідроперексидні радикали, синглетний кисень та пероксинітрит є продуктами перетворення радикалів кисню. Оскільки гідроксильні радикали, синглетний кисень та пероксинітрит активно окислюють білкові молекули, специфічних ферментів-дезактиваторів даних АФК не існує, їх рівень у клітинних регулюється безпосередньо СОД, шляхом нейтралізації супероксидних радикалів [122]. СОД є первинною лінією захисту від окисних пошкоджень, що перешкоджає окислення клітинних макромолекул ще на стадії ініціації.

Супероксидні аніон-радикали можуть викликати прямі пошкоджуючі ефекти, а також бути джерелом утворення інших, в тому числі і більш токсичних форм кисню, тому клітина потребує суворого контролю утворення та своєчасного видалення даних радикалів [123].

Ізоформи СОД відрізняються за різною чутливістю до інгібіторів – азоту, вуглецю та перекису водню. Так, CuZnСОД пригнічується азотом, вуглецем та і перекисом водню, FeСОД – тільки перекисом водню, а MnСОД не чутлива до інгібіторів [124].

Ізоформи СОД відрізняються не тільки молекулярною масою та чутливістю до інгібіторів, а й локалізацією в клітинах рослин [125]. Фермент присутній в клітинах рослин там, де проходять окисно-відновні реакції, тобто практично у всіх її компартментах, а також в апопласті. Порівняння даних про локалізацію різних форм СОД показало, що найбільша концентрація в клітинах рослин CuZnСОД [126]. Вона була знайдена в усіх клітинних компартментах: в цитозолі, хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах, а також в апопласті [127].

Що стосується MnСОД і FeСОД, то вони були виділенні тільки з певних органел. Зокрема MnСОД розташована в мітохондріях та пероксисомах, а FeСОД – в хлоропластах та цитозолі зародків деяких бобових [128,129].

1.4. Малоновий диальдегід

Мембрани клітини є неполярним середовищем, в якому кисень розчиняється в 7-8 разів краще, ніж в полярному [130]. Реакції окислення протікають завдяки наявності ненасичених ліпідів (фосфоліпідів): в мембранах мітохондрій, лізосом, плазматичних мембранах [131]. До продуктів перекисного окислення ненасичених жирних кислот відносять гідроперекиси ліпідів, альдегіди (зокрема – малоновий диальдегід), кетони, спирти [132].

Фізіологічною функцією перекисного окислення є регуляція поновлення та деградації ненасичених структурних ліпідів, проникності фосфоліпідів біологічних мембран. Активатором перекисного окислення ліпідів слугують вільнорадикальні форми кисню [133]. Кисневі радикали (супероксидний, гідроксильний, пероксидний), мають високу реакційну здатність, що прискорює процес перекисного окислення ненасичених жирних кислот [134,135].

У присутності оксидантів (навіть невеликої кількості) водень переходить до окислювача, що викликає ланцюжок реакцій, котрі змінюють структуру і функцію мембран [136]. У насичених жирних кислот енергія розриву С-Н-зв'язку становить близько 381,3 кДж/моль, у ненасичених жирних кислот за місцем подвійного зв'язку вона дорівнює 364,9 кДж / моль, тобто значно менше.

Найменшу енергію зв'язку має водень, який знаходиться в α -положенні по відношенню до подвійного зв'язку (-315,7 кДж / моль) [137]. Активні форми кисню здатні від'єднувати водень з груп $-\text{CH}_2-$ ненасиченої жирної кислоти, перетворюючи їх в вільнорадикальні групи $\text{HC}\cdot$. Радикал жирної кислоти легко приєднує молекулу кисню і перетворюється в перекисний радикал жирної кислоти [138]. Перекисний радикал може від'єднувати водень від іншої молекули жирної кислоти і відновлюватися в гідроперекис (за рахунок окислення цієї чи іншої молекули жирної кислоти у вільний радикал). Утворюється другий радикал, що аналогічно вступає в реакцію і

таким чином виникає ланцюгова хімічна реакція, що триває вже без ініціюючих речовин [139].

Перекисний радикал також може взаємодіяти з нейтральними молекулами жирних кислот і т.д [140, 141]. Подібним чином можуть окислюватися не тільки ненасичені жирні кислоти в фосфоліпідах мембран, а й вільні ненасичені жирні кислоти, залишки ненасичених жирних кислот [142, 143].

Однак є й інші погляди на проблему окислення ненасичених жирних кислот. Утворений ковалентними зв'язками скелет біомолекул стабільний при відсутності ферментів або припливу енергії [144,145].

Ненасичені жирні кислоти, як і насичені, піддаються впливу β -окислення. Положення і число подвійних зв'язків в молекулах ненасичених жирних кислот визначають особливості їх окислення [146]. Ненасичені ЖК окислюються як насичені до місця знаходження подвійного зв'язку. Якщо подвійний зв'язок має трансконфігурацію і розташування, як в еноіл-КоА, що утворюється при окисленні насичених жирних кислот, то далі окислення йде звичайним шляхом [147]. При відсутності цієї умови вступає в дію додатковий фермент, який переміщає подвійний зв'язок та змінює цис- в трансконфігурацію. Подвійний зв'язок може бути відновленим НАДФ • H_2 , однак, швидкість окислення ненасичених жирних кислот дуже висока: олеїнової кислоти в 11 разів, лінолевої – в 114, ліноленової – в 170, арахідонової – в 200 разів вище, ніж стеаринової [148].

У дослідженнях з олеїновою кислотою, міченої дейтерієм, було встановлено, що вона може редукувати, перетворюючись в стеаринову, а остання піддається β -окисленню [149]. Такий шлях допускають і для інших ненасичених жирних кислот. На першому етапі під дією ліпоксигенази відбувається дегідрування (відщеплення) одного атома водню і ЖК перетворюється на вільний радикал [150].

Таким чином, лінолева кислота перетворюється в залишки оцтової кислоти, які потім в циклі Кребса окислюються до CO_2 , O_2 і H_2O_2 [151].

Аналогічним чином (але з іншими проміжними продуктами) окислюються і інші ненасичені жирні кислоти: при окисленні ліноленової кислоти утворюється пропіонова, азелаїнова і дві молекули малонової кислоти, при окисленні арахідонової кислоти – капронова, глутарова і три молекули малонової кислоти [152].

Шляхом багатостадійного процесу лінолева кислота може спочатку перетворитися в арахідонову, яка потім піддається окисленню. Однак слід нагадати, що наведена вище як приклад окислення лінолева кислота використовується для синтезу арахідонової кислоти і в фосфоліпідах тканин міститься лише в невеликій кількості [153].

Окислення ненасичених ЖК контролюється ферментами. Той факт, що в організмі є нормальний фізіологічний рівень (фоновий) маленового діальдегіду (МДА), дієнових кон'югатів (ДК), інших продуктів перекисного окисленням ліпідів, свідчить про існування суворого контролю за окисленням ліпідів з боку всієї ієрархічної системи регуляції і в першу чергу ДНК [154]. Остання здійснює контроль за метаболізмом за допомогою синтезу ферментів і клітинних білків, тому твердження про існування в клітинах неконтрольованих вільнорадикальних реакцій в великих масштабах не обґрунтовано [155].

Фізіологічна роль реакцій окислення полягає в регуляції поновлення і проникності ліпідів біологічних мембран, взаємодії ейкозаноїдів – медіаторів (локальних гормонів) або сигнальних речовин, що грають важливу біологічну роль в організмі [156].

Такі найважливіші мембранні процеси, як перенесення електронів в дихальному ланцюзі, окисне фосфорилування, метилювання, гідроксилювання ряду субстратів ендogenous та екзогенного походження ферментними системами ендоплазматичної сітки, і, навіть, поділ клітин, супроводжуються змінами інтенсивності перебігу процесів переокислення ліпідів [157].

1.5.Участь електролітів в обміні речовин

Вода та електроліти входять до складу всіх біологічних структур і є середовищем, в якому здійснюються обмінні процеси [158]. У процесі обміну речовин вода з одного стану переходить в інший. Фізіологічне наповнення або зневоднення гідрофільних колоїдів також супроводжується переходом води з вільного стану в зв'язаний і навпаки [159]. Найбільшу інтенсивність і швидкість кінетики має вільна вода організму, найменшу – конститутивна [160].

Водне середовище організму (клітини, міжклітинний простір, судинне русло) відокремлені один від одного біологічними мембранами, які є проникними для води, низькомолекулярних молекул (сечовина) і не проникні для високомолекулярних речовин (білків) [161]. Водні компартменти організму відрізняються один від одного складом електролітів та інших речовин, які не є електролітами. У внутрішньосудинній рідині міститься більше білків (альбумін, глобулін, фібриноген), ніж в міжклітинній рідині [162].

Головними іонами внутрішньоклітинної рідини є іони калію, магнію і фосфат-іони [163]. В міжклітинній рідині переважають іони натрію, хлору, бікарбонату. Незважаючи на іонну асиметрію, сумарна кількість розчинених часток (іонів і молекул) в кожному секторі однакова, тому, однаковим має бути і осмотичний тиск [164]. Якщо в одному з секторів осмотичний тиск змінюється, вода переміщується із зони низького осмотичного тиску в зону більш високого (тобто у той компартмент, де більша концентрація речовин), поки не досягається осмотична рівновага [165].

Порушення концентрації електролітів може призвести до безладної електричної активності та інгібіції ферментів [166, 167]. Вважається, що мембрани листя страждають при температурі навколишнього середовища 5°C [168].

Даний фактор знижує частоту дихання і фотосинтезу, однак, забезпечує проходження води і електролітів з клітин: вода випаровується, але

електроліти концентруються на стінках [169,170]. Оскільки вода втрачається, настає стан зневоднення [171]. Внаслідок підвищення концентрації ферментів, пов'язаних з дефіцитом води у клітинах, спостерігається втрата фосфоліпідів [172].

Крім того, електролітичний баланс впливає на зміни активності відношення загальної кількості хлорофілів та каротиноїдів внаслідок дії холодового стресу. [173].

Ферментативні реакції дуже залежні від іонно-водного балансу (перехід АТФ в АДФ і навпаки, активація енолази, окиснювальне фосфорилування в мітохондріях, тощо), тому електроліти забезпечують сталість осмотичного тиску рідин організму [174]. При пошкодженні мембран відбувається порушення електролітичного балансу за рахунок руйнування компартментів клітини [175].

Проникність клітинних мембран є раннім показником порушень фізіологічних функцій рослинних організмів, тому її зміна може слугувати критерієм оцінки стійкості тканин рослин до абіотичних стресів [176].

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Вихідні генетичні конструкції

В роботі використовували ген *desC*, що кодує $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* [177] та ген *desA*, що кодує $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 [178], які були трансляційно злиті в одних рамках зчитування з оптимізованою версією *licBM3* [179] репортерного гена термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* [180].

Гібридні гени *desA::licBM3* та *desC::licBM3* клонували у вектори на основі pBISN (з селективним геном *nptII* та *bar* відповідно) під контролем 35S промотора ДНК вірусу мозаїки цвітної капусти (35S PHK CaMV) [181]. 5'-кінцева ділянка гена *desC::licBM3* була трансляційно злита в одній рамці зчитування з послідовністю (ген *ats1A Arabidopsis thaliana*), що кодує транзитний пептид малої субодиниці Rubisco для забезпечення сигналу транспорту у хлоропласти. Отриману рекомбінанатну молекулу *ats1A::desC::licBM3* клонували під контролем промотора 35S ДНК CaMV в бінарний вектор з селективним геном *bar*.

Також використовували ген *desA::licBM3*, який клонували у вектор на основі pBISN (з селективним геном *nptII*) під контролем холодоіндукованого промотора CBF1 [182]. В якості контролю використовували трансгенні рослини, з аналогічними векторними конструкціями, що містять замість гена десатурази (*desA* або *desC*) послідовність репортерного гена зеленого флюоресцентного білка медузи *Aequorea victoria (gfp)* [183].

Всі генетичні конструкції були клоновані та люб'язно надані к.б.н., н.с. відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України Герасименко І. М.

2.2. Рослинний матеріал.

Рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* були отримані та люб'язно надані для подальших досліджень д.б.н., с.н.с. Сахно Л. О.

Рослини орхідей *Dendrobium linguella*, що містять у своєму геномі та експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*, рослини картоплі *Solanum tuberosum*, що містять у своєму геномі та експресують гібридний ген *desA::licBM3* були отримані та люб'язно надані для подальших досліджень к.б.н., с.н.с., відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України Рудасом В. А.

2.3. Трансформація рослин *Agrobacterium tumefaciens*- опосередкованим методом.

Для трансформації рослинного матеріалу генетичними конструкціями застосовували метод “лишкових дисків”. Нічну культуру *A.tumefaciens* культивували в рідкому середовищі LB з додаванням карбеніциліну (50 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л) при 100-150 rpm та 26°C в темряві.

Суспензію бактерій осаджали за допомогою роторної центрифуги (Eppendorf Centrifuge 5415 R) при 5000g протягом 5 хв. Осад розчиняли в рідкому живильному середовищі MS, додавали ацетосеренгон в концентрації 100 мкМ/л та витримували дану суспензію в темряві при +25°C протягом 1,5 год для індукції *vir*-області агробактерії [184]

Як джерело листових експлантів використовували велике, нормально сформоване листя рослин віком 1-1,5 місяців. Листкові пластинки нарізали на експланти площею 1-1,5 см² та поміщали в бактеріальну суспензію.

Суспензію культивували одну годину в термостаті при +25°C в темряві. Потім відбирали експланти, звільняли їх від крапель середовища з резуспендованою бактеріальною культурою та переносили на середовище MS. Кокультивували з агробактерією протягом двох діб при 25°C (до появи зароста агробактерій).

Після кокультивування експланти відмивали в стерильній дистильованій воді, підсушували на стерильному фільтрувальному папері (10-15 хв) та переносили на середовище MS з додаванням фітогормонів BAP – 1 мг/л та NAA – 0,1 мг/л. Для припинення росту агробактерій додавали 700 мг/л цефатоксиму та селективний маркер канаміцин 100 мг/л або фосфінотрицин 5 мг/л залежно від селективного агенту.

Протягом 2-3 тижнів спостерігали за регенерацією потенційно трансгенних пагонів рослин. Витримували проростки в культиваційній *in vitro* за умов $25 \pm 1^\circ\text{C}$, при 16-годинному фотоперіоді, освітленості 100 мкмоль квантів/(м²с) [185].

2.4. Отримання рослин *Nicotiana tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують одночасно гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз.

Генетичну трансформацію проводили з рослинами *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*. Для трансформації використовували вектор на основі pBISN з селективним геном *nptII*, що містив ген десатурази трансляційно злитий з геном репортерного білка термостабільної ліхенази (*desA::licBM3*) під контролем 35S промотора ДНК ВМЦК. Генетичну трансформацію рослин проводили *Agrobacterium*-опосередкованим методом “листяних дисків” [186].

2.5. Умови культивування *N. tabacum in vivo*.

Для пророщування насіння *N. tabacum* отриманих трансгенних рослин, які містять у своєму геномі та експресують гени десатураз та рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортера (*gfp::licBM3*) використовували умови *in vitro*: температура $+25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, вологість 30-40%, у темряві протягом 1,5 – 2 тижнів. Після чого переносили проростки в умови культивування *in vivo* у теплицю, при

температурі 16-24°C, вологості 30-40%, світловий день 12 год. Аналізували рослини віком 3 місяці [181].

2.6. Полімеразна ланцюгова реакція

Рослинну ДНК виділяли за допомогою СТАВ-методу [188]. Концентрацію виділеної ДНК визначали вимірюванням оптичної густини розчину при довжині хвилі 260 нм за допомогою спектрофотометра BioPhotometer (Eppendorf, Німеччина).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфекаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). З використанням праймерів: *licBM3-1* (gtcgtaaatacgcctttgttgca) та *licBM3-2* (gttaggatagtattttcatattcg) для ампліфікації фрагменту гена *licBM3* довжиною 642 п.о.; *desC-1* (cctcaattggggcctttgtcttc) та *desC-2* (aactgtaccttggcggcaaga) для ампліфікації фрагмента гена *desC* довжиною 777 п.о.; *virD1-1* (atgtcgcaaggcagtaagccsa) та *virD1-2* (ggagtctttcagcatggagcaa) для ампліфікації фрагменту гена *virD1* довжиною 432 п.о.; *act-1* (tttgctggagatgatgc) *act-2* (cttgaatggcgacatac) для ампліфікації фрагменту гена актину тютюну довжиною 351 п.о. Ампліфікацію проводили в таких умовах: 5 хв 94°C; 30 циклів (30 секунд 94°C; 45 секунд 60°C; 45 секунд 72°C); 5 хв. 72°C.

Продукти ампліфікації розділяли шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі, використовуючи буфер TAE та візуалізували за допомогою бромистого етидію. В якості маркеру ДНК використовували O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва) [187].

2.7. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази

Екстракцію білків проводили в такому порядку: 100 мг рослинного матеріалу розтирали в ступці з 200 мкл 50 мМ Tris-HCl буфером, центрифугували 5 хв. (10000 g) і відбирали супернатант для аналізу.

Якісне визначення активності ліхенази проводили методом чашкового тесту [188, 189]. У чашки Петрі заливали розчин 2% агарози, що містить

0,05% ліхенану (“Sigma”, USA) в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), і формували лунки обсягом 60-80 мкл [190].

Чашки з розчином залишали на 30 хвилин, потім наносили в утворені лунки по 60-70 мкл підготовленого екстракту. Поміщали у сухожарову шафу 2Ш-0-01 при 65°C на 1 год., після чого діставали чашки з екстрактами та здійснювали двохкратне фарбування розчином 0,5% Congo-Red, залишали інкубувати на міні-шейкері Biosan MR-1 на 15 хвилин та проводили візуалізацію результатів.

2.8. Кількісне визначення активності термостабільної ліхенази

Активність ліхенази вимірювали використовуючи ліхенан (“Sigma”, USA) в якості субстрата. Концентрацію відновлюючих цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованим по глюкозі.

За одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлюючих цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 хв (в перерахунку на 1 мг білка) [191]. Питому активність розраховували на кількість розчинного білка. Для приготування екстрактів сумарного розчинного білка листові експланти гомогенізували в подвійному об’ємі буферу, що містив 0,1 М Tris – HCl (pH 8.0), 0,005М Na₂EDTA, 0,1 М NaCl та 0,01М β-меркаптоетанол. Концентрацію білка визначали за методом Bradford, використовуючи калібрувальну криву побудовану для стандартних розчинів БСА (“Fermentas”) [192].

500 мкл зразка готували таким чином: 10 мкл білкового екстракту + 100 мкл ліхенану (0,5% у воді), доводили водою до 500 мкл. Потім інкубували при 65-70° С 1 год, після чого додавали 500 мкл 1% розчину ДНС та 165 мкл К-Na-тартрату 40%, витримували на водяній бані 10 хв при 95-100 °С. Залишали охолоджуватись на льоду (при +4° С), потім 15-20 хв за кімнатної температури [193].

Вимірювати ОД при 510 нм.

2.9. Визначення активності фермента супероксиддисмутаза.

Аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза за методикою з використанням фотохімічного окислення нітросинього театразолію [194]. Рослинний матеріал (100 мг) поміщали в пробірку Eppendorf (1,5), розтирали з 1 мл 50мМ Tris-HCl буферу та центрифугували при 13000 g (4C) протягом 15 хв. Супернатант використовували для аналізу. Реакцію з нітросинім театразолієм проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалась із 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл 50мМ Tris-HCl буферу, 130 мкл 65 мМ метіоніну, 47мкл 630 мкМ нітроголубого театразолію, 12,5мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, іншу освітлювали протягом 5 хв. при 26°C лампою білого кольору (люмінесцентна лампа T5/G5 модель ELI – 230 A – T5 – 8W).

Вимірювали адсорбцію при 550 нм. Реакційну суміш, яка була витримана в темряві, використовували як фон для вимірювань зразків, що були витримані на світлі. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Нульова проба містила всі перелічені компоненти, за винятком рослинного екстракту, кількість буферу в реакційній суміші нульової пробі збільшували до 550 мкл.

$\text{СОД (од./мл сум)} = (\text{ОД 1} / \text{ОД 2} - 1) (\text{ФР}),$

де ОД 1 – оптична щільність нульової пробі ;

ОД 2 – оптична щільність експериментальної пробі ;

ФР – фактори розведення = об'єм реакційної суміші, мл / об'єм використаного рослинного екстракту, мл .

Активність СОД виражали в одиницях акт/мг білка .

2.10. Визначення рівня втрати електролітів.

З рослин відбирали висічки листкових експлантів масою приблизно 100 мг, обмивали в деіонізації, викладали у флакони по 20 мл та заповнювали їх 20 мл деіонізату. Потім інфільтрували 2 хв. двічі з інтервалом 1 хв. Закриті флакони витримували на шейкері протягом 1,5–2 год. Після чого

вимірювали загальну кількість виходу електролітів, потім повертали вміст назад до флакона, виставляли на водяну баню при 100°C на 30 хв. Після проварювань проб вимірювання повторювали [179]. Визначали втрату електролітів порівнюючи показники виходу електролітів після дії стресора та загальної кількості електролітів у пробі.

2.11. Визначення рівня накопичення малонового діальдегіду.

Малоновий діальдегід визначали за допомогою його здатності вступати в реакцію з тіобарбітуратом кислотою утворюючи червону флуоресцентну сполуку, що дозволяє проводити спектрофотометричний аналіз вмісту МДА. 100 мг рослинного зразку відбирали та розтирали в 1,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти, центрифугували при +4°C 10000 15 хв., після чого відбирали 300 мкл супернатанту та переносили в епіндорф із 1,2 мл 5 % тіобарбітуратом кислоти розчиненої в 20 % трихлороцтовій кислоті. Інкубували 30 хв. при 95°C. Центрифугували 15 хв. при 10000 та вимірювали ОД при 532 нм та 600 нм [195]. Розрахунки проводили за формулою:

$$C_x = (E_{532} - E_{600}) \cdot V_e \cdot 2 / k \cdot m_s \cdot V_a,$$

де C_x – вміст малонового діальдегіду, мкмоль/г сирової ваги; E_{532} – оптична густина розчину при вимірюванні проб за допомогою довжини хвилі 532 нм; E_{600} – оптична густина розчину при вимірюванні проб за допомогою довжини хвилі 600 нм; V_e – об'єм екстракту; V_a – об'єм екстракту взятий для аналізу, мл; k – коефіцієнт молярної екстинції МДА (156 мМ⁻¹·см⁻¹); m_s – маса зразку взята для екстракції, г.

2.12. Статистичний аналіз.

У всіх експериментах використовували 12 біологічних повторностей, аналітичних 1.

Середнє значення, стандартні відхилення та довірчий інтервал розраховували за допомогою програми Excel Microsoft Office 2010. Достовірність різниці між вибірковими середніми оцінювали за допомогою

парного t-теста Стьюдента. Значення p розраховували за допомогою програми Excel.

2.13. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії.

Всі рослини використані у дослідженнях були проаналізовані методом газової хроматографії та мас-спектрометрії разом з к.б.н. завідуючим центром колективного користування Остапчуком А. М. та к.б.н., н.с. Хархотою М.О. Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного.

Аналіз спектра ЖК здійснювали методом газової хроматографії та мас-спектрометрії. Виділення ЖК та утворення їх метилових ефірів для проведення газо-хроматографічних аналізів здійснювали одноетапно за модифікованою методикою:

Рослинний матеріал відбирали з верхніх розкритих листків (200 мг), нарізали знежиреними ножицями, поміщали у скляні пробірки. Готували реакційну суміш А – метанол: ортоксилол: оцтова кислота в об'ємному співвідношенні 44:20:2.

Реакційна суміш Б містила розчин внутрішнього стандарту гексадеканової кислоти в гептані. 10мг/мл та гептан у співвідношенні 1:84.

В кожную прпробірку додавали 3,3 мл реакційної суміші (А), а потім додавали 1,7 мл реакційної суміші (Б). Пробірки щільно закривали кришками з тефлоновими прокладками, витримували їх на водяній бані при 80°C протягом 2 год. Охолоджували за кімнатної температури, спостерігали розшарування суміші на дві фази.

Відбирали верхню фазу, в якій концентруються утворені метилові ефіри жирних кислот. Відібрані 300 мкл верхньої фази переносили у віалу з якої відбирався зразок для здійснення аналізу газової хроматографії та мас-спектрометрії.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3*

Дослідження проводили з рослинами тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гібридні гени *desA::licBM3* ціанобактерії *Synechocystis sp.* PCC 6803 або *ats1A::desC::licBM3* ціанобактерії *S. vulcanus*, слід відмітити, що досліджувані рослини не мали фенотипових відмінностей з контрольними рослинами (рис.3.1.).



Рис. 3.1 Досліджувані рослини: 1 – *N. tabacum*;
2,3 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*;
4,5 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*;
6,7 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Дані трансгенні рослини були отримані за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації методом “листяних дисків”[186]. та були перевірені методом мультиплексної ПЛР на наявність вставки гібридного гена (рис. 3.2) [178].

Для проведення реакції ПЛР було здійснено виділення ДНК за допомогою методу із використанням СТАВ буферу. Після чого проводили вимірювання концентрації ДНК та підбирали умови для реакції ПЛР, використовуючи ампліфікатор GeneAmp PCR 2700.

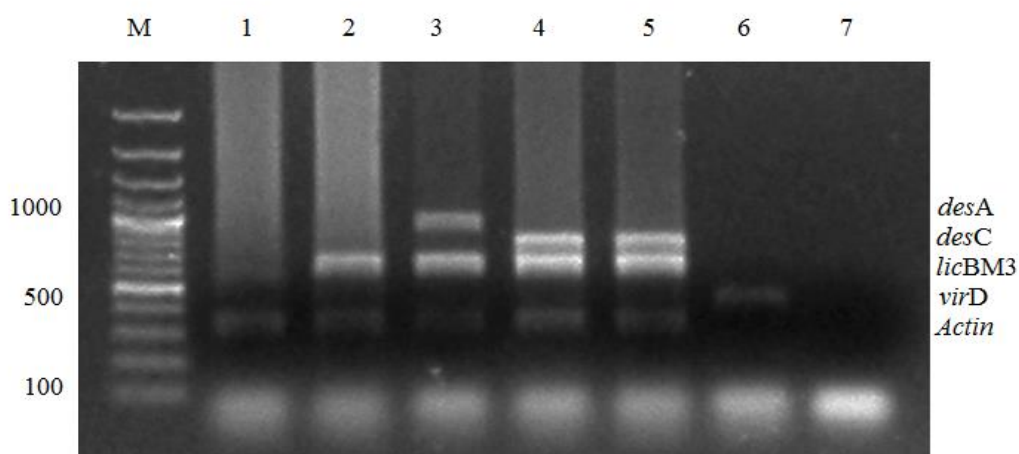


Рис. 3.2. Аналіз трансгенних ліній *N. tabacum* на виявлення рекомбінантних генів *licBM3*, *desA* та *desC* методом мПЛР: ампліфікація фрагмента гена актина слугує внутрішнім позитивним контролем; наявність гена *virD1* вказує на присутність *A. tumefaciens*; М – маркер розміру DNA ladder; 1 – ДНК рослини *N. tabacum* дикого типу; 2 – ДНК трансгенної рослини, що містить гібридний ген *gfp::licBM3*; 3 – ДНК трансгенної рослини, що містить ген *desA::licBM3*; 4,5 – ДНК трансгенних рослин, що містять ген *ats1A::desC::licBM3*; 6 – ДНК *A. tumefaciens* (1 нг); 7 – реакція без ДНК.

Лінії, які виявились позитивними за наявністю перенесених генів, перевіряли на наявність експресії перенесеного гена за активністю репортерного білка термостабільної ліхенази методом чашкового тесту [188] (рис. 3.3).

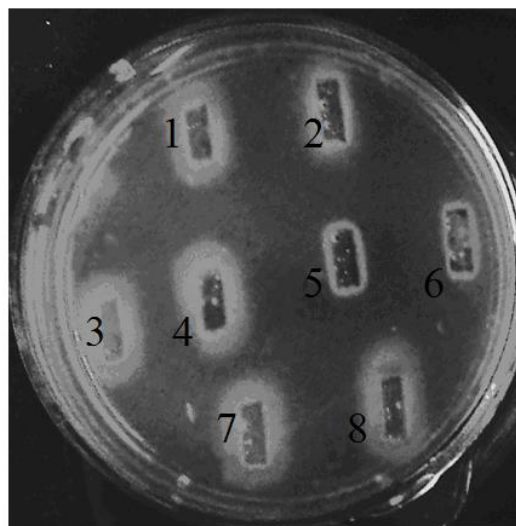


Рис. 3.3. "Чашковий тест" активності термостабільної ліхенази в білкових екстрактах листя *N. tabacum*: 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3,4 – ПЛР позитивні рослини тютюну, що містять у своєму геномі ген *ats1A::desC::licBM3*; 5,6 – не виявлено експресії перенесених генів у трансгенних рослин; 7,8 – ПЛР позитивні рослини тютюну, що містять у своєму геномі ген *desA::licBM3*.

Відібрали дві з п'яти трансгенних ліній, що експресують ген *desA::licBM3*, та п'ять з шести ліній, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3* [196].

Кількісний аналіз активності ліхенази проводили для того, щоб відібрати трансгенні лінії з максимальним накопиченням гібридних білків [197] (рис. 3.4). За результатами реакції відібрали дві лінії рослин тютюну, що експресують ген *desA::licBM3* та три лінії тютюну, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*.

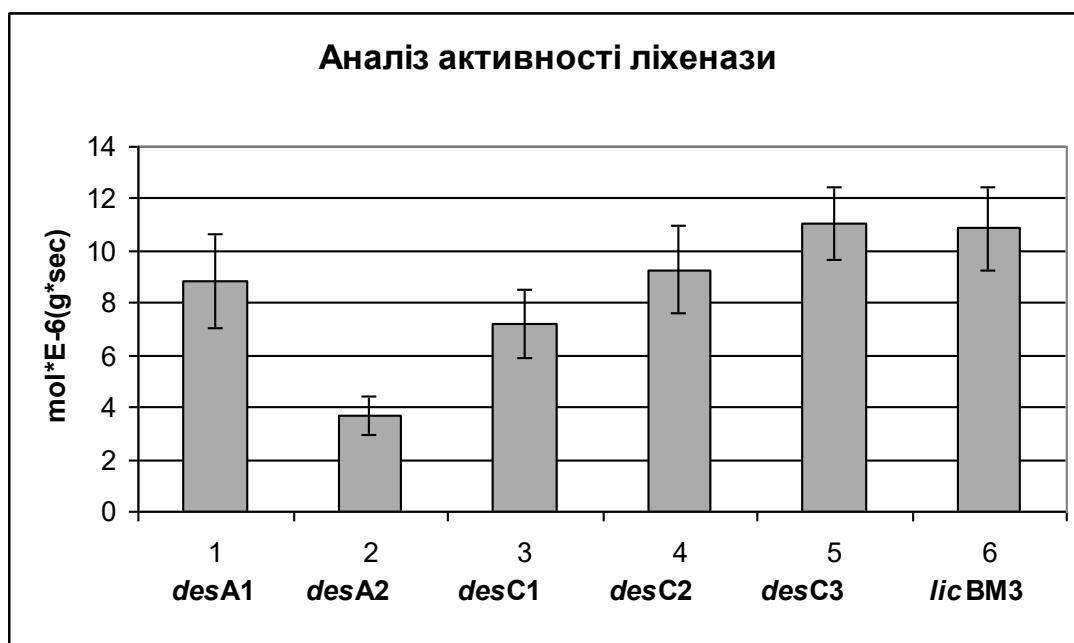


Рис. 3.4 Аналіз активності ліхенази за нормальних фізіологічних умов:

desA1 та *desA2* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*; *desC1*, *desC2*, *desC3* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*; *licBM3* – скорочена назва ліній *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*.

Аналіз ЖК складу ліпідів

За допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії у відібраних екстрактах ліпідів листя *N. tabacum* були досліджені ЖК, головними з яких виявились 16:0 – пальмітинова кислота (C16:0), 16:1 – пальмітоолеїнова кислота (C16:1), 16:2 – пальмітолінолева кислота (C16:2), 18:0 – стеаринова кислота (C18:0), 18:1 – олеїнова кислота (C18:1), 18:2 – лінолева кислота (C18:2) та C18:3 – ліноленова кислота (C18:3) [11] (табл 3.1).

З яких переважно були представлені C18:3, C16:0, C18:2.

Подібний склад ЖК ліпідів, отриманих з листя рослин тютюну, виявляли раніше і інші автори [198]. Слід зазначити, що статистично достовірних відмінностей в складі ЖК ліпідів мембран нетрансформованих і трансформованих рослин з геном біфункціонального репортера *gfp::licBM3* не виявили. Це дозволяє зробити висновок, що ліхеназа може розглядатися, як фізіологічно нейтральний репортер [199].

Таблиця 3.1. Склад ЖК ліпідів листя досліджуваних рослин тютюну, що містять у своєму геномі та експресують гени *gfp::licBM3*, *ats1A::desC::licBM3*, та *desA::licBM3* (мол. % $\pm$ SD)

Рослина	C16:0	C16:3	C18:0	C18:2	C18:3
WT	21,1 $\pm$ 18	1,6 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 5,5	57,6 $\pm$ 6,0
<i>gfp::licBM3/19</i>	20,9 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 1,4	17,5 $\pm$ 4,7	57,9 $\pm$ 3,7
<i>ats1A::desC::licBM3/3</i>	18,2 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,8	11,0 $\pm$ 2,3	67,3 $\pm$ 1,6
<i>ats1A::desC::licBM3/13</i>	19,6 $\pm$ 2,7	1,7 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,6	10,4 $\pm$ 3,2	67,6 $\pm$ 5,5
<i>ats1A::desC::licBM3/15</i>	19,7 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 2,8	64,7 $\pm$ 2,9
<i>desA::licBM3/9</i>	20,2 $\pm$ 1,9	1,0 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,8	35,3 $\pm$ 3,3	39,7 $\pm$ 2,8
<i>desA::licBM3/10</i>	19,7 $\pm$ 1,7	0,9 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,9	33,6 $\pm$ 3,3	41,0 $\pm$ 3,7

Примітка SD – стандартне відхилення.

* Також дослідили у складі незначну кількість ЖК 16:1, 16:2 і 18:1, масова доля кожної складала менше 0.5%.

Рослини, що містять у своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licBM3* (кодує Δ 9-ацил-ліпідну десатаразу з сигналом транспорту в хлоропласти), продемонстрували достовірне ($p \leq 0,05$) збільшення відносного вмісту α -ліноленової кислоти, яке супроводжувалося зменшенням рівня лінолевої кислоти C18:2, в той час як частка третьої головної ЖК, пальмітинової (16:0), залишалася незмінною.

Варто зазначити, що статистично достовірних відмінностей ($p > 0,05$) між середніми значеннями активності ліхенази у трансгенних рослин, що

експресували гени *ats1A::desC::licBM3* і *desA::licBM3*, відмічено не було: $9,2 \pm 2,1$ і $10,8 \pm 2,0$ мкмоль / (г·с) відповідно [11].

Експресія гена, що кодує рекомбінантну $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу (*desA::licBM3*), в рослинах сприяла достовірному збільшенню частки C(18:2) і зменшенню рівня C(18:3) ($P \leq 0,01$).

Крім цього, в ліпідах листя рослин цих ліній було відзначено і достовірне збільшення частки C(16:2), яке для *desA::licBM3* ліній (лінії 9 і 10) склало 2,1 і 1,6 мол.%, тоді як у контрольних не трансгенних рослин і трансгенних рослин, які експресують гібридний ген-репортер *gfp::licBM3* частка цієї ЖК не перевищувала 0,1 мол.%.

Слід зазначити, що не трансгенні і трансгенні рослини достовірно не відрізнялися один від одного за сумарним вмістом ліпідів (в розрахунку на етерифікованих ЖК) – від $1,9 \pm 0,3$ до $2,4 \pm 0,5$ мг/г сирої ваги у рослин з генами *ats1A::desC::licBM3* і *desA::licBM3* відповідно.

Індекс ненасиченості (ІН) ЖК для рослин, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3* ($\Delta 9$ десатураза з сигналом транспорту в хлоропласти), достовірно перевищував ($p \leq 0,05$) відповідний показник нетрансформованих і контрольних трансгенних рослин. При цьому для рослин, що експресували ген *desA::licBM3* ($\Delta 12$ десатурази), було відзначено достовірне ($p \leq 0,05$) зниження ІН ЖК [200].

3.1.1. Аналіз рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах знижених температур та заморозків.

Активність СОД за нормальних фізіологічних умов та за умов гіпотермічного стресу. Для дослідження аклімації рослин тютюну використовували умови стресу: температура $+0^{\circ}\text{C}$ 20хв, потім -5°C 80 хв.

Відомо, що СОД є важливим компонентом антиоксидантної системи рослин, індукція її активності необхідна для захисту клітин від пошкоджень

активними формами кисню [201]. Зниження активності СОД в стресових умовах можна спостерігати, якщо інтенсивність стресового чинника досягає порогового значення.

Збільшення активності СОД при культивування трансгенних рослин в умовах знижених температур, що експресують гени десатураз, вказує на наявність більш ефективної аклімації цих рослин до впливу гіпотермічного стресу.

Для того, щоб оцінити відповідь антиоксидантної системи рослин при впливі низьких температур, була виміряна активність СОД в екстрактах трансгенних рослин до та після дії гіпотермічного стресу.

Під час проведення аналізу за нормальних фізіологічних умов дослідили підвищення активності СОД у контрольних рослин (рис. 3.5). Після дії холодового стресу дослідження повторили та виявили підвищення активності СОД у рослин, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3* на 50%, а у рослин, що експресують ген *desA::licBM3* тенденцію до підвищення активності СОД на 25-30%.

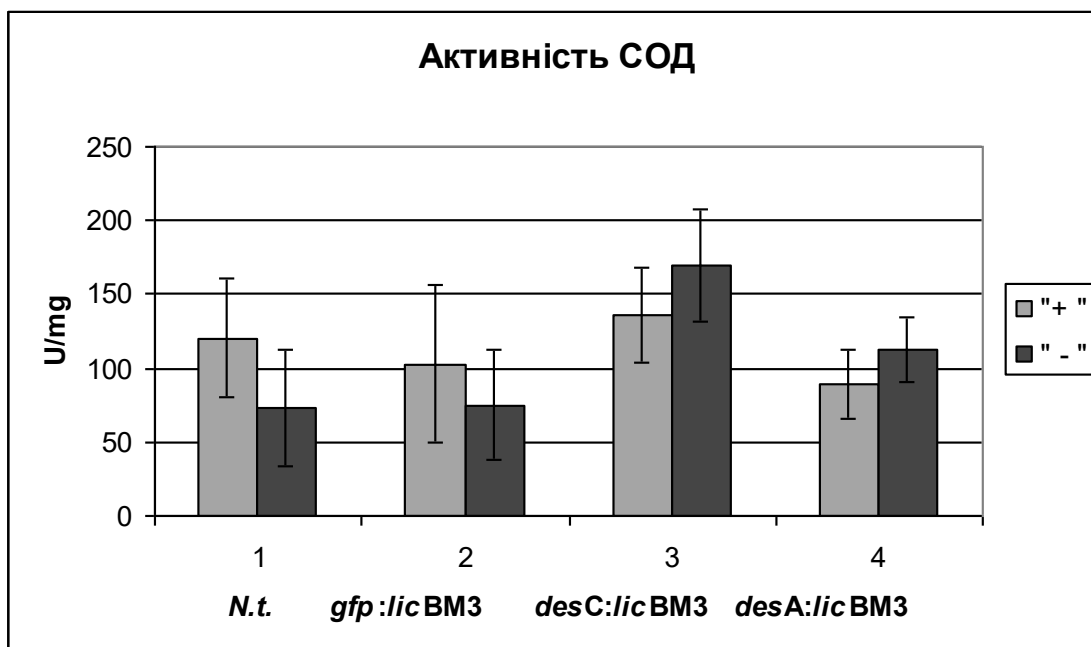


Рис. 3.5. Активність ферменту супероксиддисмутаза: *N.t.* – скорочена назва рослин *N. tabacum* дикого типу; *gfp::licBM3* – скорочена назва рослин *N. tabacum*, що експресують гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desC::licBM3* – скорочена назва рослин *N. tabacum*, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*; *desA::licBM3* – скорочена назва рослин *N. tabacum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3*.

Достовірної різниці активності СОД в екстрактах контрольних рослин дикого типу і контрольних трансгенних рослин з експресією гена *gfp::licBM3* не було відмічено.

Оскільки електроліти впливають на обмінні процеси між клітинами та між компартментами клітин, втрата електролітів слугує одним з параметрів пошкодження клітини. Перевіряли показники втрати електролітів після дії холодового стресу (рис.3.6.). Тенденцію до найбільшого числа виходу іонів мали контрольні трансгенні рослини. Показники тютюну дикого типу вказували на підвищення втрати іонів та не мали статистично достовірних даних по різниці з трансгенним контролем.

Рослини з відміченою експресією генів десатураз мали менший рівень виходу іонів порівняно з контролем. Статистично достовірних даних між трансгенними лініями з гетерологічною експресією десатураз не було відмічено.

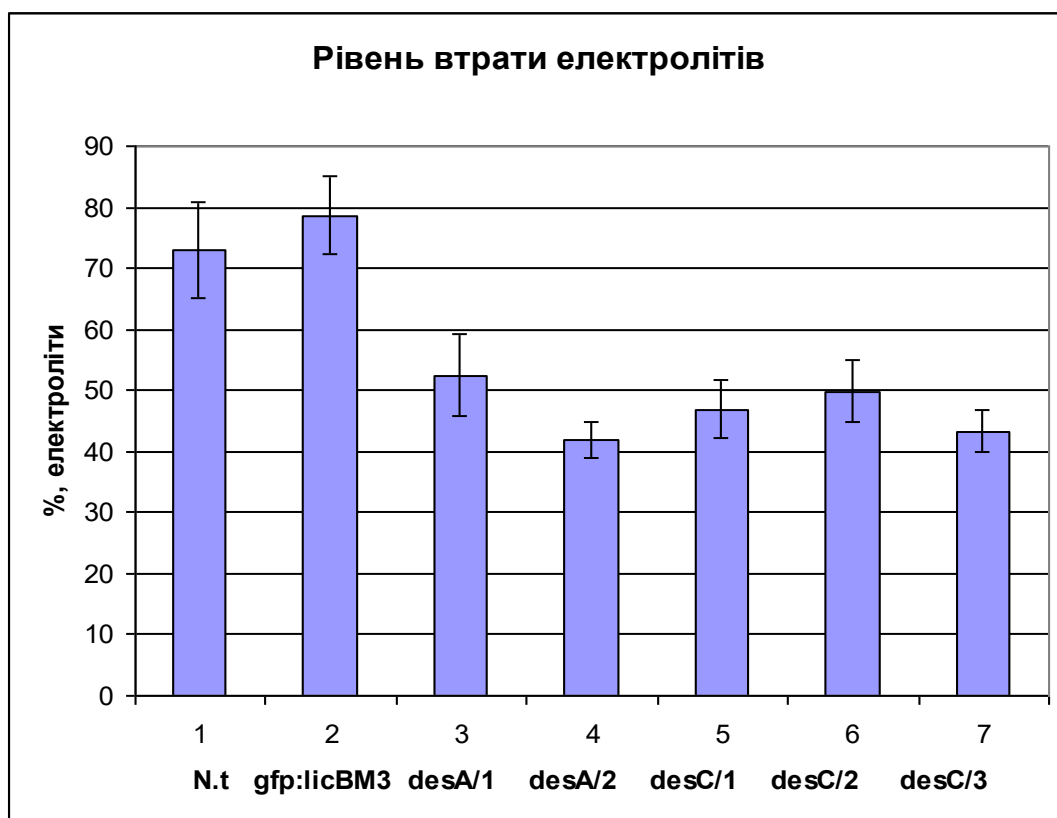


Рис. 3.6. Дослідження рівня втрати електролітів: *N.t.* – скорочена назва рослин *N. tabacum* дикого типу; *gfp::licBM3* – скорочена назва ліній *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/1* та *desA/2* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*; *desC/1*, *desC/2*, *desC/3* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*.

Малоновий диальдегід утворюється внаслідок деградації мембранних ліпідів та є маркером їх переокисного окислення. Вимірювали показники накопичення МДА після дії холодового стресу (рис 3.7.)

Найменший рівень накопичення даного альдегіду було досліджено у рослин *N. tabacum*, що експресують перенесені гени десатураз. Найвищий рівень накопичення МДА виявили у контрольних рослин тютюну, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортера.

Рівень накопичення МДА у рослин тютюну дикого типу був більший, ніж у рослин, що містять у своєму геномі та експресують гетерологічні гени десатураз. Статистично достовірної різниці між рослинами тютюну, що містять ген *desC* або *desA* відмічено не було.

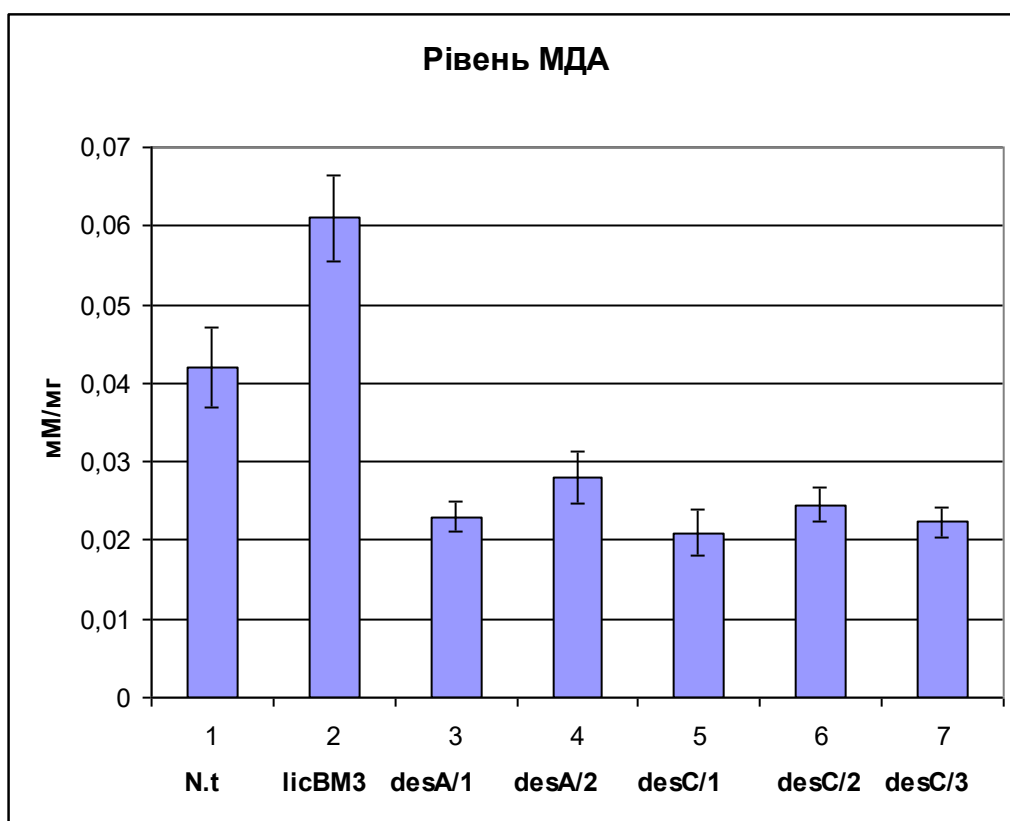


Рис.3.7. Рівень накопичення малонового диальдегіду (МДА): *N.t.* – скорочена назва рослин *N. tabacum* дикого типу; *gfp::licBM3* – скорочена назва ліній *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/1* та *desA/2* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*; *desC/1*, *desC/2*, *desC/3* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*.

Після дії холодового стресу визначали активність ліхенази методом кількісної ліхеназної реакції. [202](рис 3.8). Було досліджено підвищення ліхеназної активності, у рослин з генами десатураз ціанобактерій, проте, достовірної різниці між рослинами, що експресують ген *desA* або *desC* відмічено не було.

Отримані дані можуть вказувати на те, що під час дії холодового стресу у рослин починають експресувати гени багатьох ферментів, які впливають на підвищення процесів обміну речовин та збереження гомеостазу організму.

Також впливає той факт, що у дослідженнях було використано конститутивний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, а не холодоіндукований промотор (наприклад сімейство CBF).

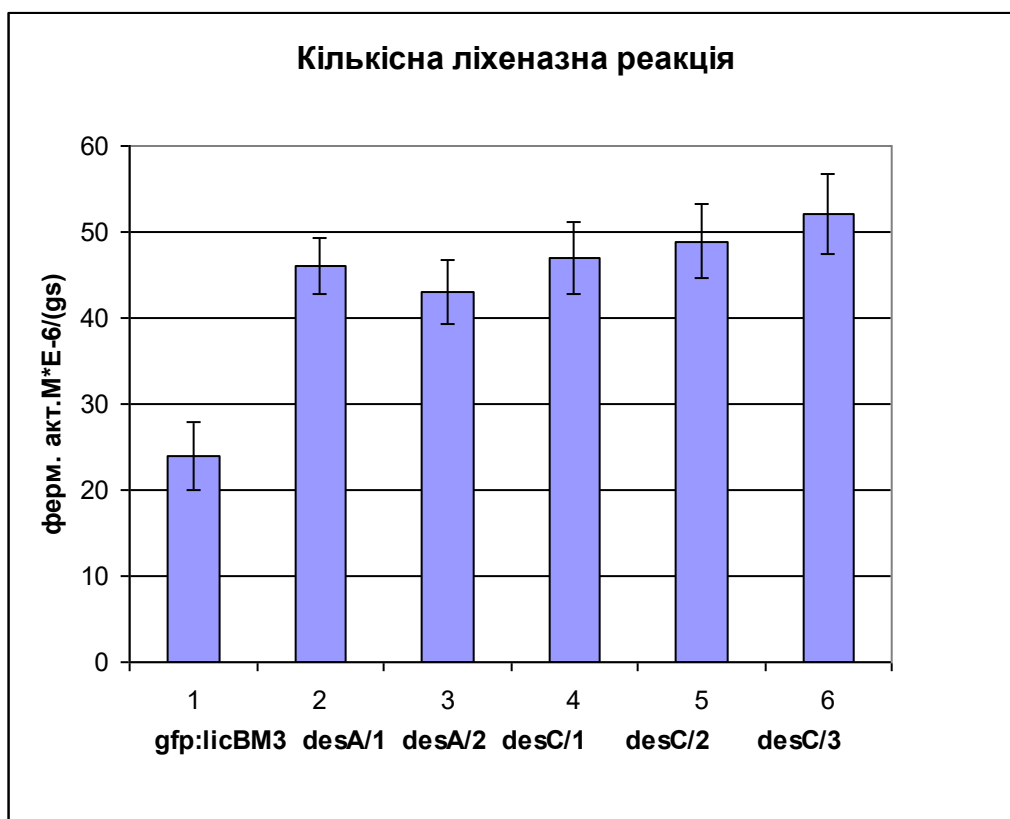


Рис.3.8. Кількісна ліхеназна реакція: *N.t.* – скорочена назва рослин *N. tabacum* дикого типу; *gfp::licBM3* – скорочена назва ліній *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/1* та *desA/2* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*; *desC/1*, *desC/2*, *desC/3* – скорочені назви ліній *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*.

Досліджуючи процеси аклімації рослин тютюну, що експресують гетерологічні гени десатураз та контрольних рослин тютюну, виявили кращі показники активності ферменту супероксиддисмутаза, рівня накопичення малонового діальдегіду та втрати електролітів у трансгенних тютюнів, що експресують гени десатураз.

3.1.2. Аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах підвищених температур.

В роботі використовували вище описані рослини тютюну (*N. tabacum*, сорт Winskonsin), які експресують гени *desC* ($\Delta 9$) *S. vulcanus* та *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803, трансляційно злиті в одній рамці зчитування з репортерним геном *licBM3* термостабільної ліхенази *C. thermocellum* під контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК [177]. Рослини вирощували на живильному середовищі MS протягом 3-4 тижнів. Контролем слугували нетрансформовані рослини тютюну та трансформанти, що містять у своєму геномі та експресують ген *gfp::licBM3*.

Дослідний тютюн культивували 36 годин в кліматичній камері WiseCube, при режимі: температура +42 °C, вологість 80%, світловий день 16 год (7.00-23.00).

Через 12 год дії стресу фенотипових у дослідних рослин відмінностей не було помічено (рис. 3.9)

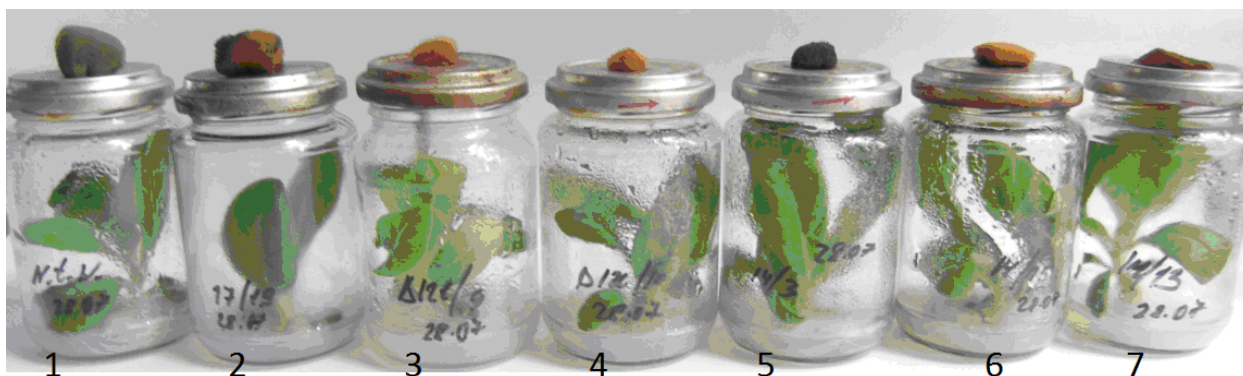


Рис. 3.9. Культивування рослин в умовах гіпотермічного стресу 12 год: 1 – *N. tabacum*; 2,3 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 4,5 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*; 6,7 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Після культивування рослин в умовах гіпотермічного стресу 36 год було помічено пожовтіння листя та втрата тургору. Слід відмітити, що більші зміни спостерігали у контрольних рослин (рис. 3.10).



Рис. 3.10. Культивування рослин в умовах гіпотермічного стресу 36 год
1 – *N. tabacum*; 2,3 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*;
4,5 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*;
6,7 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Дослідження рівня виходу електролітів здійснювали перевіряючи показники через 12 год та через 36 год. Суттєвої різниці між трансгенними та контрольними зразками не було відмічено (рис.3.11).

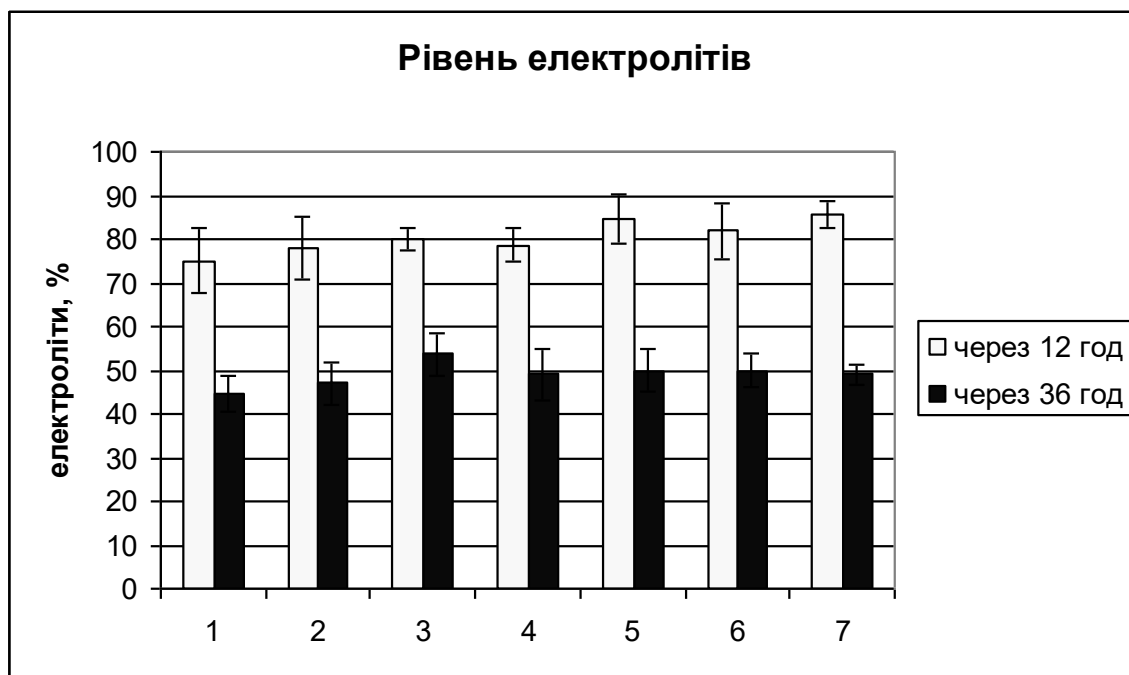


Рис.3.11. Рівень втрачених електролітів: 1 – контрольна нетрансформована рослина; 2 – рослина з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5,6,7 – рослина з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Електроліти забезпечують сталість осмотичного тиску рідин організму, ферментативні реакції дуже залежні від іонно-водного балансу (перехід АТФ

в АДФ і навпаки, активація енолази, окиснювальне фосфорилювання в мітохондріях, тощо) [174]. При пошкодженні мембран відбувається порушення електролітичного балансу за рахунок руйнування компартментів клітини. Порушення концентрації електролітів може призвести до безладної електролітичної активності та інгібування ферментів.

Вивченню супероксиддисмутази (СОД) приділяється багато уваги, оскільки цьому ферменту відводиться важлива роль в захисті клітин і тканин від окисної деструкції [203]. Активація СОД при несприятливих умовах оточуючого середовища є відповіддю на збільшення продукції радикалів супероксиду в цих умовах та забезпечує захист клітин і тканин від окисних пошкоджень [204].

Вимірювання активності СОД в даному дослідженні проводили через 12 год та через 36 год. Достовірної різниці в показниках активності ферменту СОД між дослідними та контрольними рослинами відмічено не було, ні через 12 год, ні через 36 год (рис. 3.12).

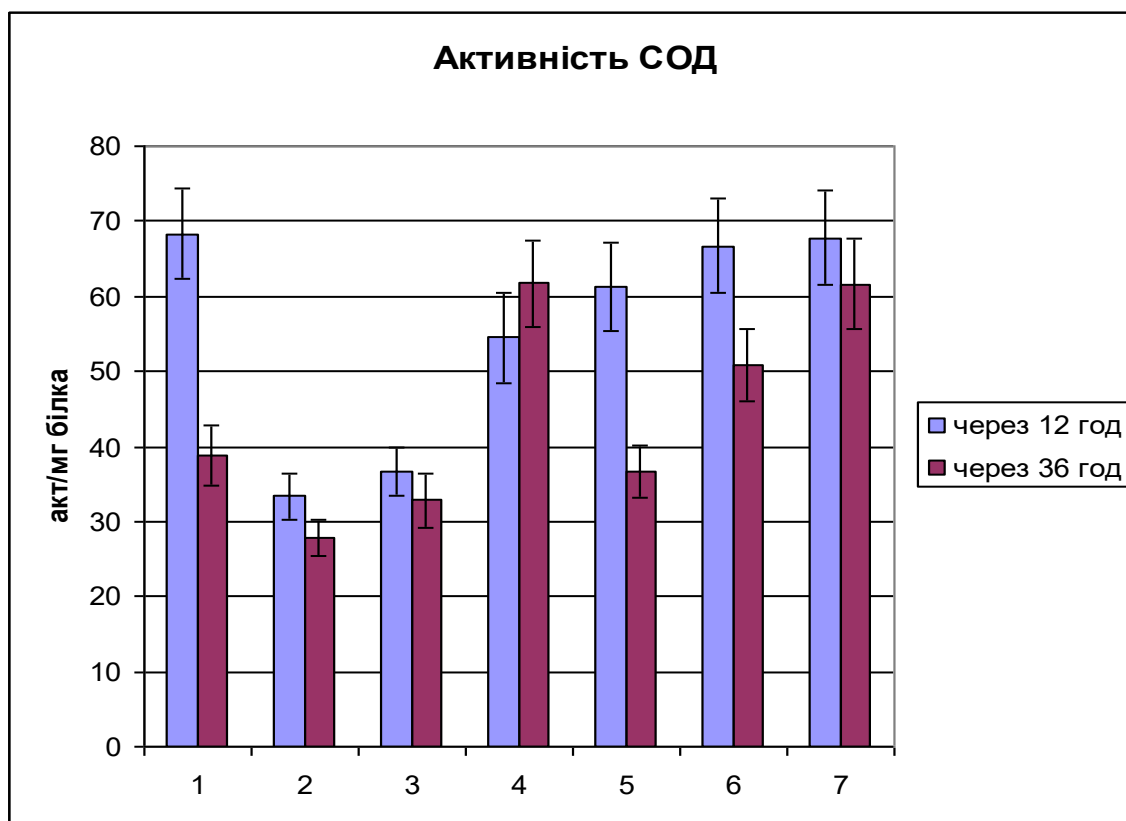


Рис.3.12. Активність ферменту супероксиддисмутаза: 1 – контрольна нетрансформована рослина; 2 – рослина з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5,6,7 – рослина з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Нейтралізація H_2O_2 ; $\text{O} \bullet -$; $^1\text{O}_2$ шляхом підвищення активності ферменту супероксиддисмутаза дозволяє запобігти сильному окисному стресу, що виникає внаслідок дії несприятливих факторів та забезпечує подальше нормальне функціонування рослинного організму [205].

Рівень накопичення МДА є одним з показників про стійкість організму до несприятливих умов навколишнього середовища, оскільки змінюється гомеостаз організму та антиоксидантний статус хлоропластів [138].

Аналізували рівень накопичення малонового діальдегіду через 12 год та 36 год дії стресових температур (рис. 3.13).

Виявили, що через 12 год рівень накопичення МДА був меншим у рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контрольними рослинами. Через 36 год дії стресових температур відмітили зменшення накопичення досліджуваного альдегіду між тютюном з генами десатураз та тютюном дикого типу, проте, достовірної різниці між досліджуваним тютюном та трансгеним контролем не було.

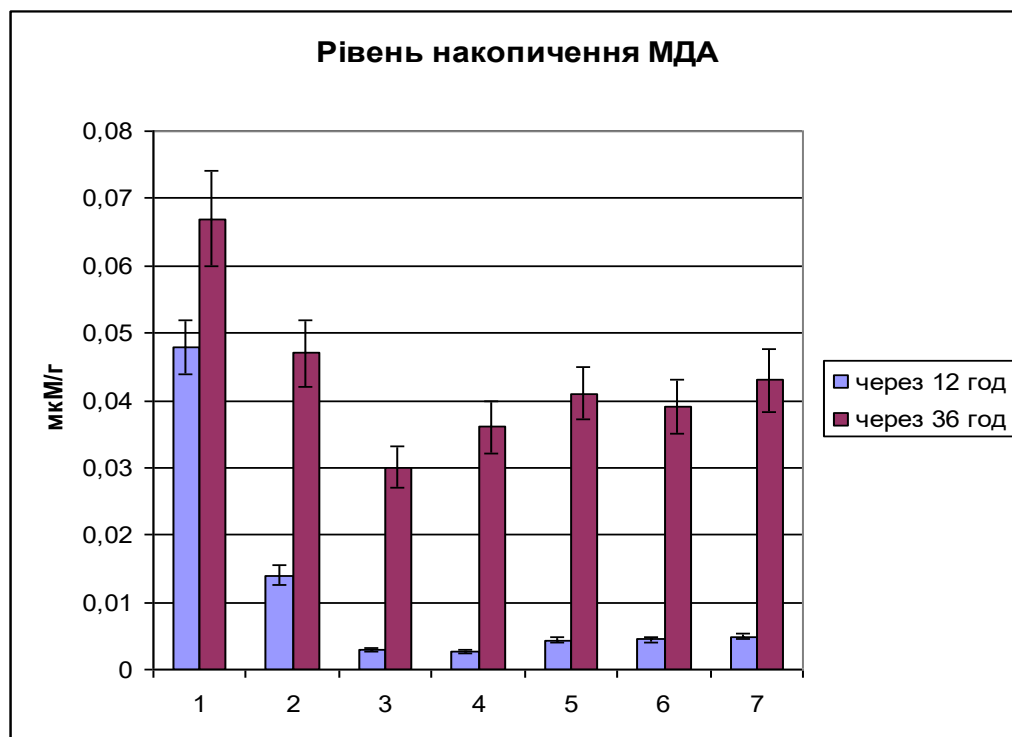


Рис.3.13.Рівень накопичення МДА: 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*; 2 – рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*; 5,6,7 – рослина *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Оскільки цільові гени *desA* та *desC* знаходились в одній рамці зчитування з геном репортерного білка термостабільної ліхенази було проведено кількісну ліхеназну реакцію для того, щоб опосередковано визначити рівень експресії генів десатураз за активністю ліхенази (рис 3.14).

Дослідили, що експресія генів підвищилась через 12 год дії стресу та знизилась через 36 год, тоді, коли експресія біфункціонального репортера підвищилась через 36 год. Це може вказувати на аклімацію рослин *N. tabacum*, що експресують гени десатураз порівняно з контролем.

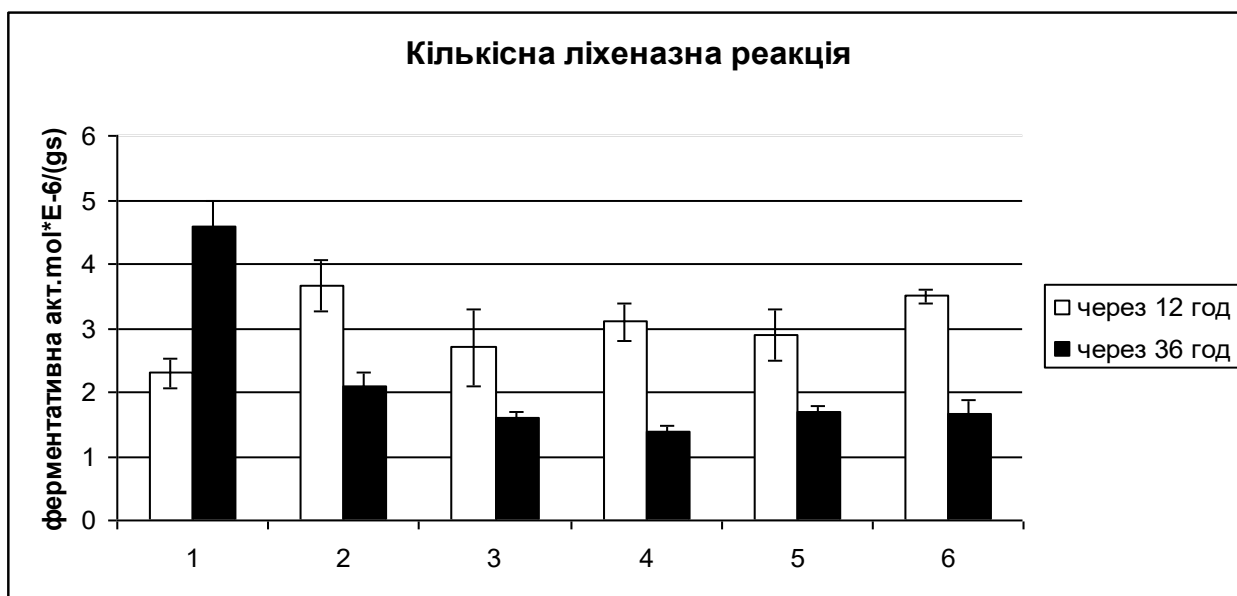


Рис. 3.14. Аналіз кількісної ліхеназної реакції: 1– трансгенна рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 2,3 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*; 4,5,6 – рослина *Nicotiana tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*

3.1.3. Дослідження рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах осмотичного стресу.

Плинність фосфоліпідів мембран разом зі збільшенням частки ненасичених ЖК в їхньому складі забезпечує захист рослин шляхом попередження механічних пошкоджень (тріщин та розривів) при втраті вологи у клітинних мембранах [206]. Це може відбуватись під час дії сильних вітрів (так зване “вивітрювання” вологи), під час підвищення температури навколишнього середовища, втрати вологи під час посухи та, можливо, при засоленості ґрунтів [207]. Десатурази ціанобактерій сприяють утворенню

подвійних зв'язків у ЖК та тим самим перетворюють насичені ЖК в ненасичені, що підвищує в'язкість мембран [208].

В даному дослідженні рослини *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* висаджували на середовище MS з додаванням манітолу. Манітол є речовиною осмотиком, що сприяє виходу води з цитоплазми клітини та міжклітинних проміжків. Даний стрес є універсальним осмотичним, оскільки манітол, на відміну від таких осмотиків як солі певних металів чинить вплив виключно за рахунок осмосу, а не фізіологічної дії іонів. Досліджувалися рослини віком 2 місяці. Використовувалися верхні розкриті листки.

У всіх експериментах кількість біологічних повторностей 12, аналітичних 1. Висаджували рослини на середовище MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ.

Вимірювали показники активності ферменту супероксиддисмутаза, рівень накопичення малонового діальдегіду та рівень експресії генів десатураз за активністю ферменту термостабільної ліхенази.

Порівнювали всі показники при вирощуванні рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ, а також при вирощуванні рослин на стандартному середовищі.

Культивування рослин протягом 2 місяців на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ показало збільшення приросту біомаси у трансгенних рослин тютюну, що експресують гени десатураз (рис 3.15).



Рис. 3.15. Культивування рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ: 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*; 2 – рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 3 – рослина *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*; 4 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*.

При дослідженні приросту біомаси достовірної різниці між контрольними рослинами дикого тютюну та трансгенними рослинами тютюну, що експресують ген *gfp::licBM3* виявлено не було (рис. 3.16).

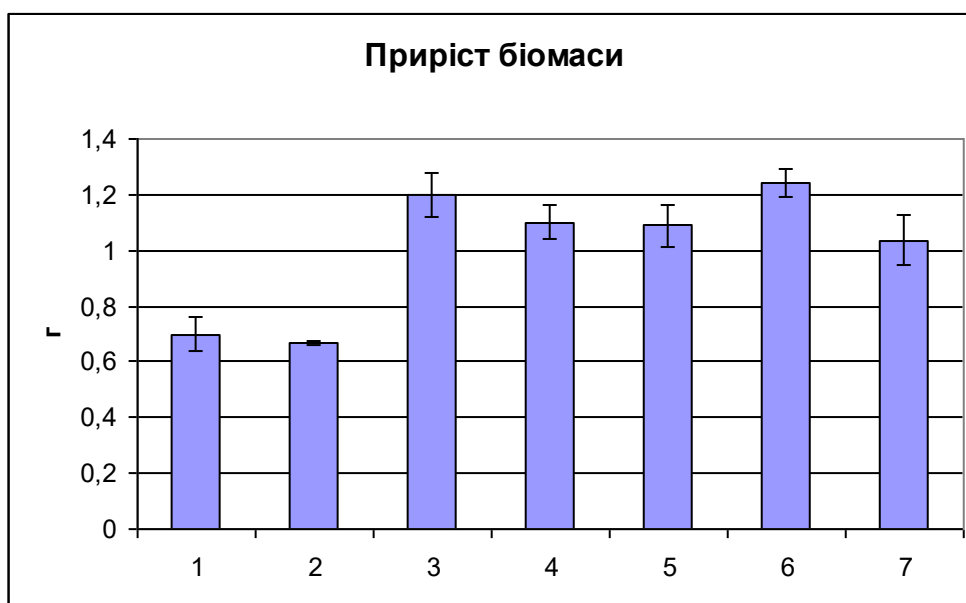


Рис. 3.16. Показники приросту досліджуваних рослин: 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*; 2 – рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 3, 4 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*; 5, 6, 7 – рослина *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Дослідження приросту біомаси рослин, що експресують гетерологічні гени десатураз не показало достовірної різниці між рослинами тютюну, що місять у своєму геномі та експресують ген *desA* або ген *desC*

Аналізуючи показники приросту біомаси, при культивуванні досліджуваних рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ, виявили збільшення приросту у рослин, що містять у своєму геномі та експресують гени десатураз (рис 3.17).



Рис. 3.17. Культивування рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ: 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*; 2 – рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*; 5,6 – рослина *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Достовірної різниці приросту біомаси між контрольними трансгенними рослинами, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортера та рослинами тютюну дикого типу не виявили. Різниці показників приросту біомаси рослин, що експресують ген *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* не виявили (рис 3.18.).

СОД приймає участь в каскаді реакцій ферментів антиоксидантної системи [128]. При вирощуванні рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ, було відзначено підвищення активності ферменту СОД у рослин, що експресують гетерологічні гени десатураз порівняно з контрольними рослинами – нетрансформованим тютюном та рослиною *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*. Достовірної різниці між показниками активності даного ферменту у рослин з експресією гена *desA* з рослинами тютюну, що експресують ген *desC* не було відмічено.

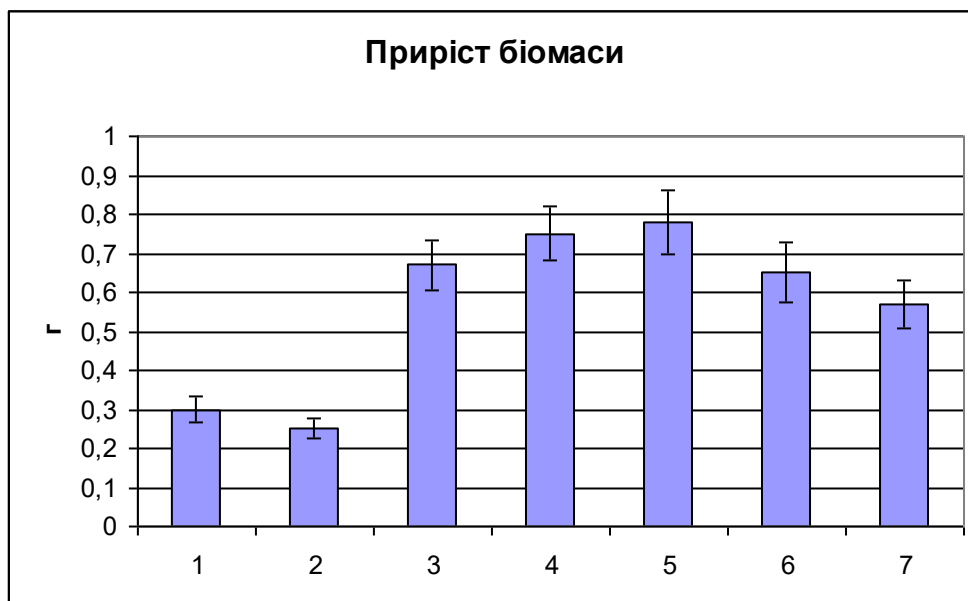


Рис. 3.18. Показники приросту досліджуваних рослин при культивуванні на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ:
 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*;
 2 – рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*;
 3,4 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*;
 5,6,7 – рослина *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

При вирощуванні рослин тютюну на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ найменшу активність СОД спостерігали у рослин тютюну дикого типу. Достовірної різниці між активністю СОД у контрольних трансгенних рослин та досліджуваних не було відмічено (рис. 3.19).

Отримані дані свідчать про кращу відповідь атиоксидатного ферменту супероксиддисмутаза у рослин тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ або $\Delta 12$ ацил-ліпідної десатурази порівняно з контрольними рослинами при культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням 100 мМ манітолу. Проте, штучно створений осмотичний стрес однаково згубно впливає на тютюн при культивуванні рослин з додаванням 200 мМ манітолу до середовища MS.

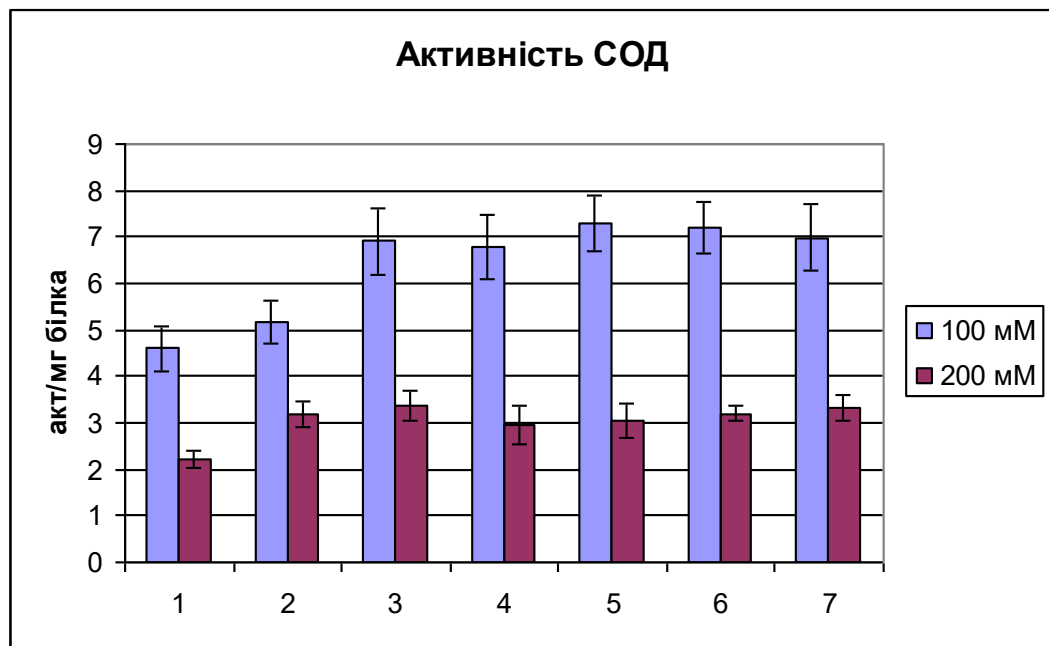


Рис.3.19. Аналіз активності ферменту супероксиддисмутаза:
 1- контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*;
 2 – рослина з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*;
 5,6,7 – рослина з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Рівень накопичення малонового діальдегіду при осмотичному стресі є показником, як механічного пошкодження у рослин, так і порушенням обміну речовин спричиненого дією стресора [139]. Вимірювали показники МДА при культивуванні рослин, як при 100 мМ, так і при 200 мМ концентрації манітолу (рис.3.20).

При культивуванні рослин з додаванням 100 мМ концентрації манітолу виявили збільшення рівня накопичення МДА у рослин тютюну дикого типу, при культивуванні рослин з додаванням 200 мМ концентрації манітолу було виявлено зменшення накопичення МДА у рослин, що експресують гени десатурази порівняно як з рослинами дикого типу, так і трансгеним контролем. Достовірної різниці накопичення МДА між рослинами, що експресують гени $\Delta 9$ - або $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз не було відмічено.

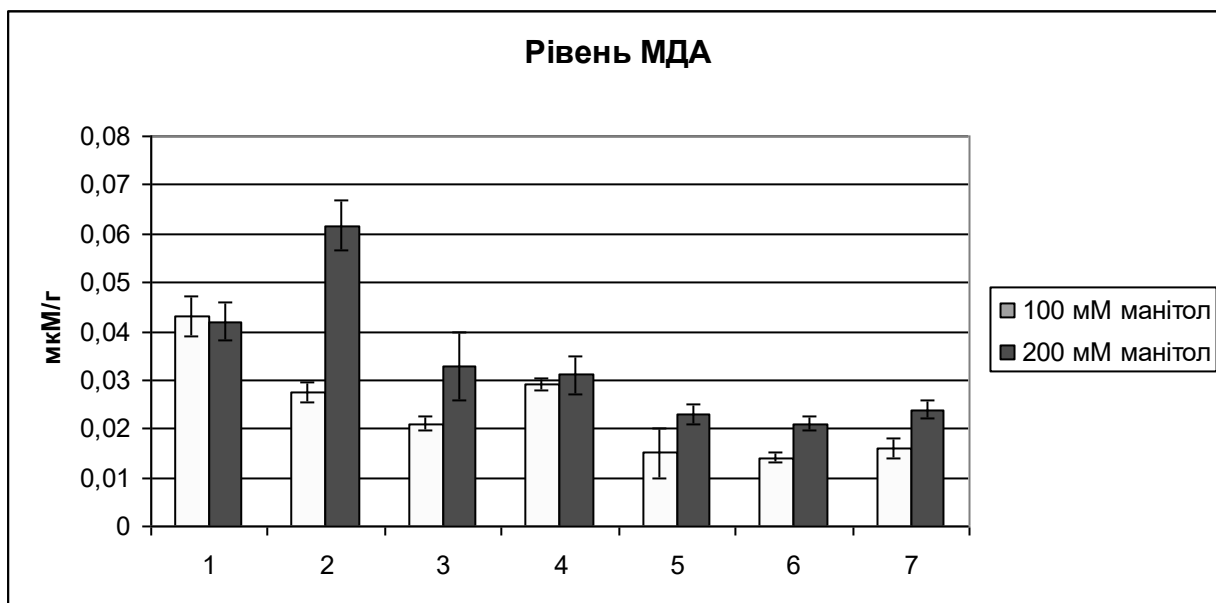


Рис.3. 20. Дослідження рівня накопичення малонового діальдегіду:
 1 – контрольна нетрансформована рослина *N. tabacum*; 2 – рослина з геном *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5,6,7 – рослина з геном *ats1A::desC::licBM3*

Під час проведення дослідження було виявлено збільшення накопичення МДА в умовах культивування на середовищі MS з додаванням манітолу у різних концентраціях у рослин дикого типу. Менший рівень МДА у рослин з гетерологічною експресією генів десатураз порівняно з контролем, спостерігали при культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням 100 мМ манітолу.

Це опосередковано може вказувати те, що під час дії стресу працює, так звана, механічна захистна система (перехід фосфоліпідів з однієї рідкокристалічної фази в рідку), дані перетворення відбуваються при дії стресових факторів.

Визначення активності ліхенази показало, що достовірної різниці між трансгенним контролем (рослини дикого типу не використовувались, оскільки вони не експресують даний фермент і дані їх реакції близькі нулю) і рослинами, що експресують гени десатураз відмічено не було (рис. 3.21).

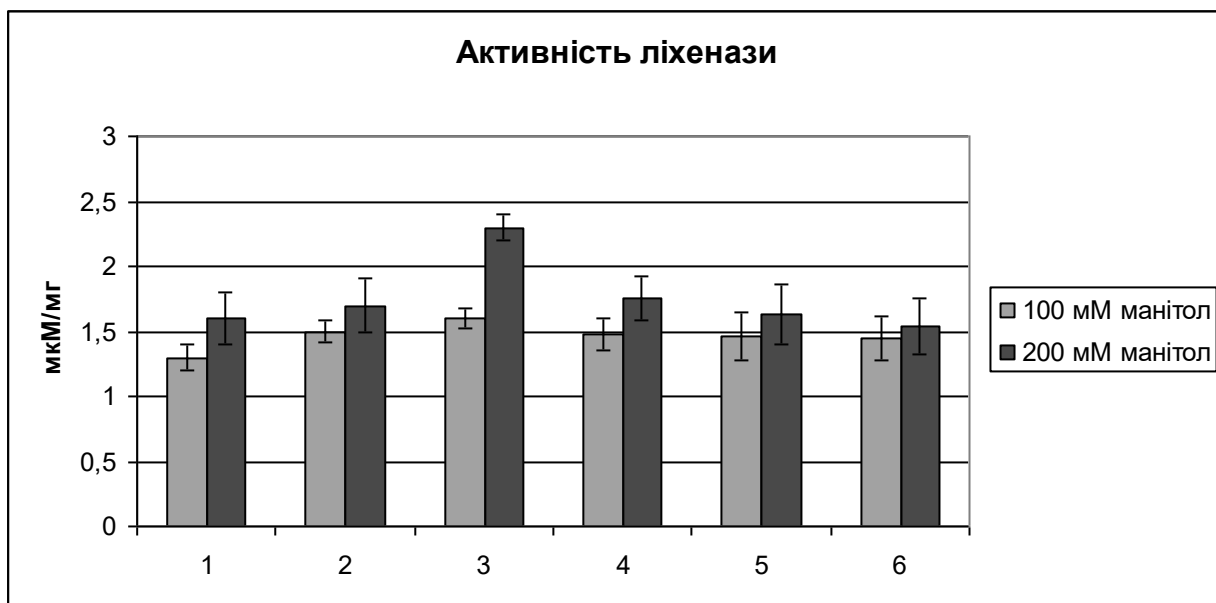


Рис. 3.21. Аналіз активності ліхенази:
 1 – контрольна рослина *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*;
 2,3 – рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM3*;
 4, 5,6 – рослини *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Однак, було відзначено підвищену ліхеназну активність в одній з ліній тютюну, що експресують ген *desA::licBM3* за умов вирощування на середовищі MS з додаванням 200 мМ манітолу, проте, ці дані не є достовірними.

Загалом, завдяки даному дослідженню, виявили кращі адаптивні характеристики порівняно з контрольними трансгенними рослинами та рослинами дикого типу тютюну у рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ або $\Delta 12$ ацил-ліпідної десатурази в умовах культивування їх на середовищі MS з додаванням манітолу.

3.2. Аналіз рослин *N. tabacum*, що експресують гени деаураз вирощені в умовах *in vivo*.

Для досліджень використовували три лінії *N. tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licBM3* та дві лінії рослин *N. tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3* [181]. Як контроль, використовували рослини *N. tabacum* дикого типу та трансформанти, що містять в своєму геномі та експресують ген *gfp::licBM3* того ж виду.

Дані рослини вирощували *in vitro* та були протестовані на стійкість до впливу низьких температур. Також було досліджено склад ЖК за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії. Виявили збільшення частки ліноленової кислоти у рослин, що експресують ген $\Delta 9$ десатурази, та лінолевої у рослин, що експресують ген $\Delta 12$ десатурази.

Проте, рослини, які культивуються в умовах *in vitro*, можуть відрізнятися своїми фізіолого-біохімічними показниками та процесами аклімації або адаптації від рослин, вирощених *in vivo* [209].

У роботі представлені результати досліджень рослин *N. tabacum*, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій та були вирощені в умовах ґрунту.

Відбирали рослини, віком 2–3 тижні, що вкорінились на середовищі MS в умовах *in vitro*. Переводили їх в ґрунт шляхом висаджування в пластикові стакани ємністю 500 мл, наповнені ґрунтом. Умови вирощування рослин *in vivo*: температурний режим $+16 - +25^{\circ}\text{C}$, освітлення 7 год (11–18), вологість 30–40%. Досліджували рослини після 2-х місяців культивування (рис 3.22.).

Для досліджень використовували верхні розкриті листки.

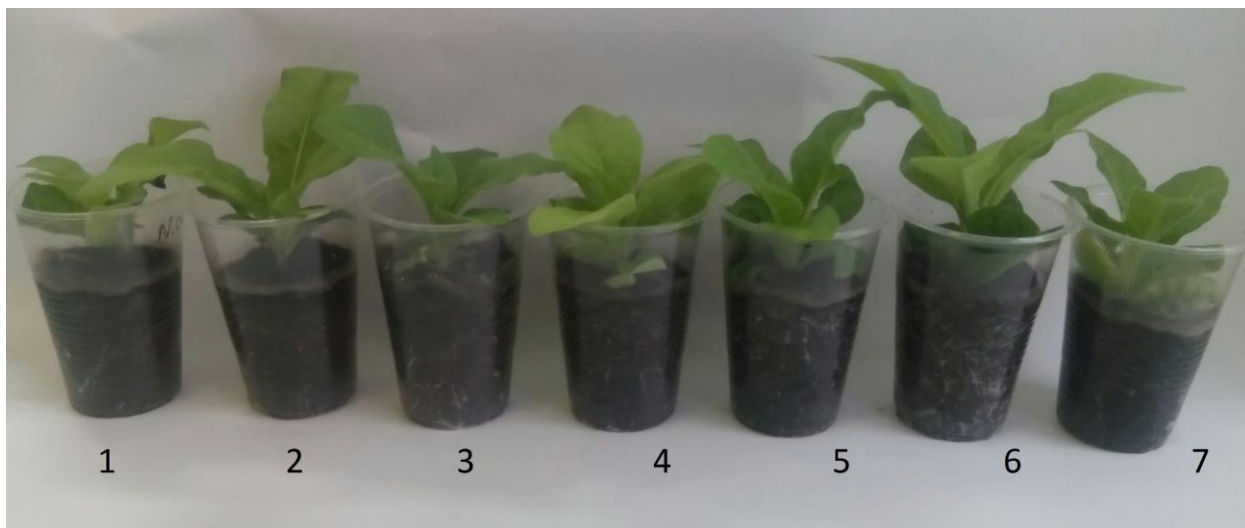


Рис 3.22. Досліджувані рослини: 1 – *N. tabacum*;
2,3 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *gfp::licBM3*;
4,5 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *desA::licBM*;
6,7 – трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ats1A::desC::licBM3*.

У всіх експериментах кількість біологічних повторностей 12, аналітичних 1.

Проникність клітинних мембран є першим показником зміни фізіологічних функцій рослинного організму, тому її порушення може слугувати, як маркер стійкості тканин рослин до абіотичних стресів [162]. Енергетична функція мембран визначається акумуляцією і трансформацією енергії. Найбільш ефективно вона здійснюється в мембранах мітохондрій і хлоропластів, де синтез АТФ поєднаний з утворенням електрохімічного мембранного потенціалу іонів H^+ .

Аналізуючи рівень втрати електролітів, внаслідок пошкоджень мембран, дослідили, що за даним показником виявлено більше пошкоджень у контрольних рослинах. Рослини, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій показали нижчий рівень виходу електролітів (рис. 3.23.).

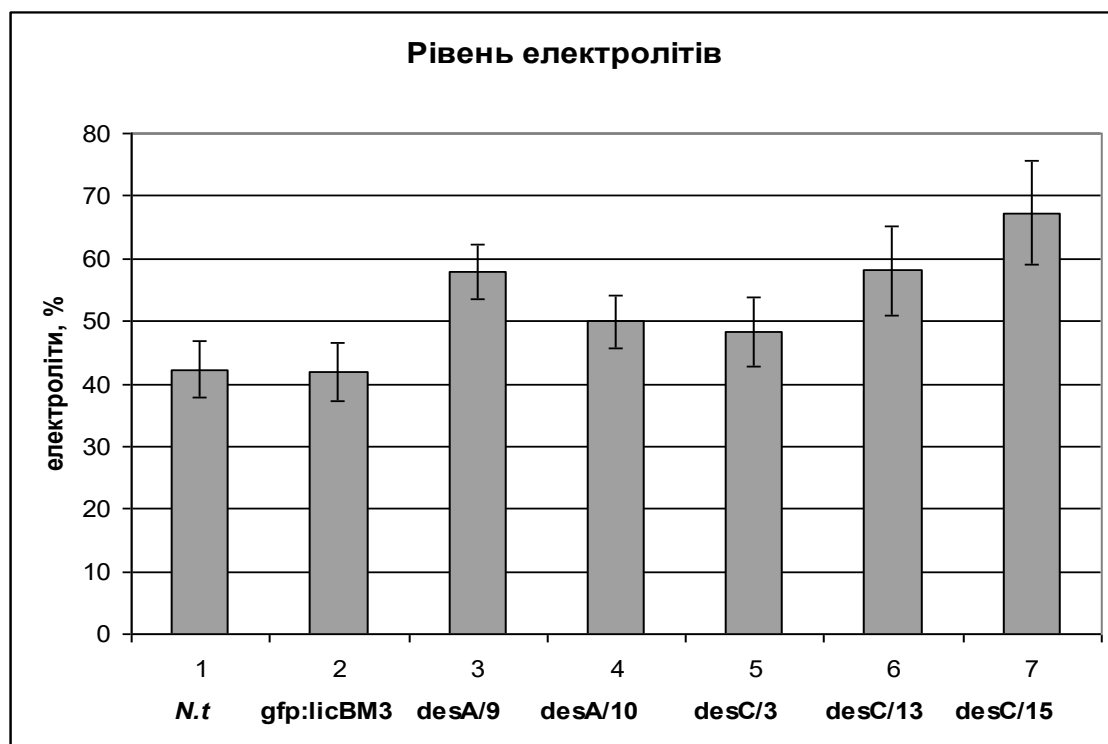


Рис. 3.23. Рівень втрати електролітів у досліджуваних рослин:

N.t. – контроль, не трансгена рослина *N.tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N.tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/9* – рослина тютюну, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 9; *desA/10* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 10; *desC/3* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 3; *desC/13* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 13; *desC/15* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 15

Для захисту від окислювального стресу рослинні клітини індукують кон'юговані ферменти, наприклад, супероксиддисмутаза (СОД), яка знешкоджує окисні радикали та є системою компонентів антиоксидантного захисту, що сприяє інгібуванню та знешкодженню вільних радикалів, підтримання нормального рівня вільнорадикальних процесів і перекисного окислення ліпідів в тканинах [210].

Рослини реагують на дію абіотичних факторів утворенням активних форм кисню, що супроводжується розвитком у рослин ознак окисного стресу [211]. Він ініціюється вільними радикалами оксигена та призводить до різноманітних проявів холодового ушкодження. Тобто, активність антиоксидантної системи є одним з механізмів захисту рослин від несприятливих чинників навколишнього середовища [212].

При дослідженні рослин вирощених в умовах *in vivo*, дослідили підвищення активності СОД у рослин тютюну з гетерологічною експресією генів десатураз порівняно з контролем (рис. 3.24.).

Достовірної різниці між активністю СОД у контрольних рослин дикого типу та контрольних трансгенних рослин з експресією гена біфункціонального репортера не було відмічено. Різниці в активності СОД між трансгенними рослинами з експресією гена *desA* та *desC* не дослідили.

Оцінити інтенсивність перекисного окислення ліпідів можна по накопиченню в тканинах одного з кінцевих продуктів цього процесу – малонового діальдегіду. Даний біфункціональний альдегід здатний утворювати сполуки з аміногрупами білків, та бути у ролі зшиваючого агенту [213].

Встановлено, що однією з головних причин низькотемпературного пошкодження рослин є порушення структури клітинних мембран, а основним процесом деградації мембранних ліпідів є ПОЛ, який утворюється внаслідок інтенсивної генерації АФК [140]. Одним з показників активності ПОЛ прийнято вважати рівень МДА [153].

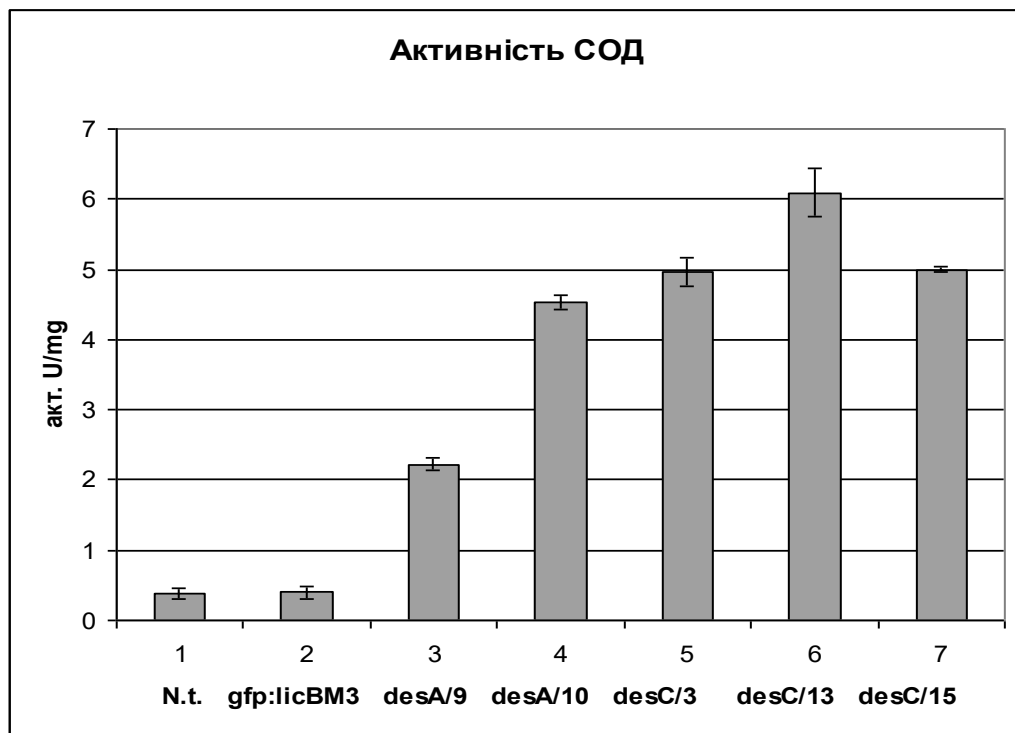


Рис. 3.24. Активність СОД у досліджуваних рослин:

N.t. – контроль, не трансгена рослина *N. tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/9* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 9; *desA/10* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 10; *desC/3* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 3; *desC/13* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 13; *desC/15* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 15

Щодо рівня накопичення МДА – спостерігали зниження даного показника у трансгенних рослин, що експресують гени десатураз. У тютюну дикого типу виявили найвищий рівень пошкоджень за показниками накопичення даного альдегіду. Різниці між показниками накопичення МДА у рослин з гетерологічною експресією генів десатураз не було досліджено (рис. 3.25).

Кількісну ліхеназну реакцію в даному випадку використовували як маркер експресії генів десатураз ціанобактерій [215], оскільки ген даного ферменту знаходиться в одній рамці зчитування з генами ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій.

Вимірювали показники активності ліхенази після дії заморозків та виявили збільшення активності цього ферменту у трансгенних рослин, що експресують ген *desA* або *desC*. (рис. 3.26).

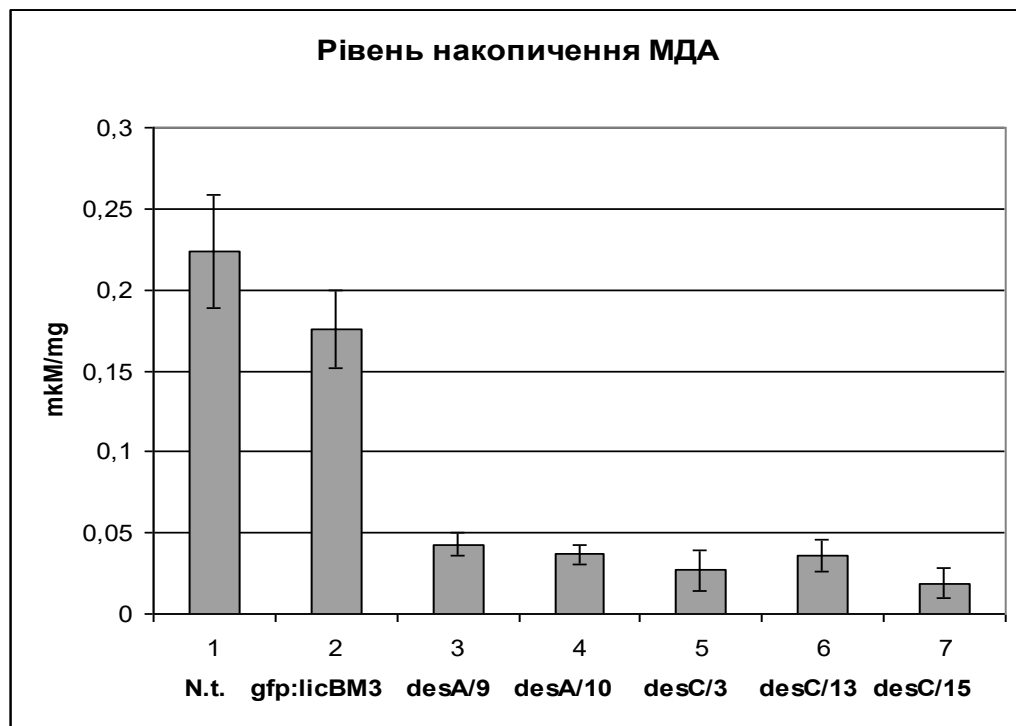


Рис.3.25. Рівень накопичення малонового діальдегіду у досліджуваних рослин: *N.t.* – контроль, не трансгена рослина *N.tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N.tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/9* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 9; *desA/10* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 10; *desC/3* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 3; *desC/13* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 13; *desC/15* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 15.

Підсумовуючи отримані результати стосовно рівня виходу електролітів, активності ферменту супероксиддисмутаза, рівня накопичення малонового діальдегіду та експресію гена за активністю репортерного білка термостабільної ліхенази, можна зробити висновок, що рослини *N. tabacum*, трансформовані генами ацил-ліпідних десатураз, мають кращі показники адаптації до умов заморозків порівняно з контрольними рослинами.

Рівень пошкоджень у рослин, що експресують додаткові гени десатураз, набагато нижчий ніж в контрольних рослин. Це забезпечується завдяки активності ферменту СОД, який зв'язує вільні кисневі радикали, про що свідчить рівень накопичення малонового діальдегіду. Вирощування рослин тютюну в умовах *in vivo* не має суттєвого впливу на експресію генів десатураз та характер пошкоджень внаслідок дії низьких температур у досліджуваному діапазоні.

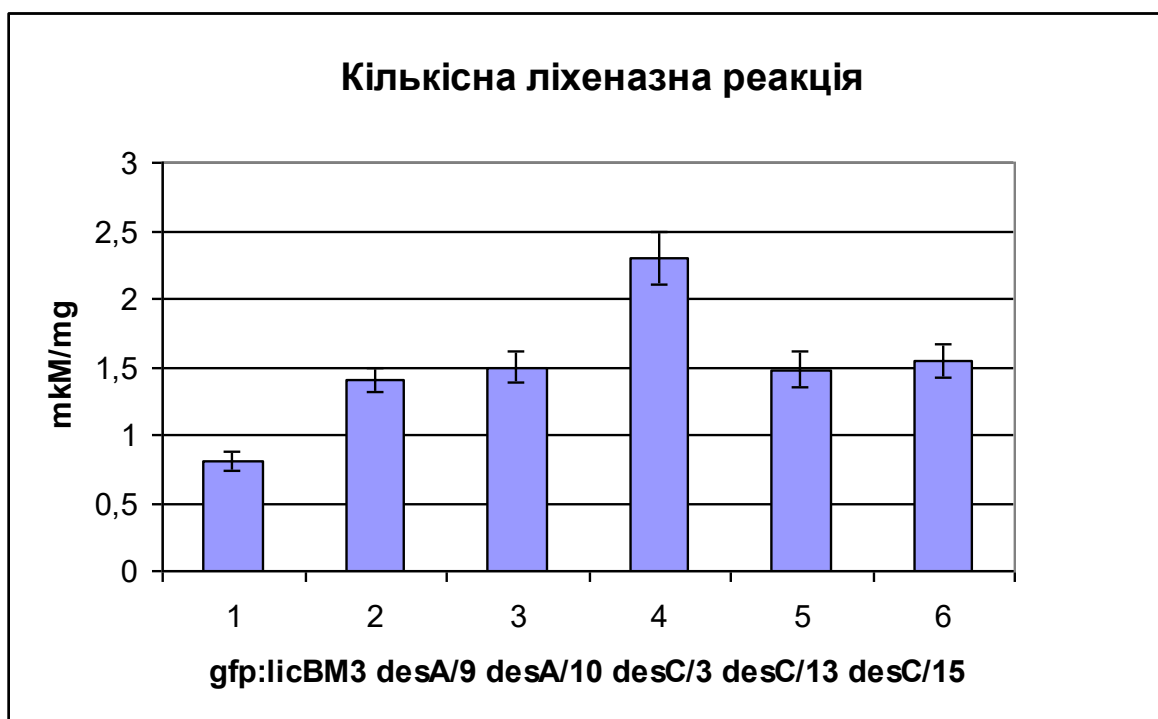


Рис. 3.26. Активність ліхенази досліджуваних рослин: *N.t.* – контроль, не трансгенна рослина *N.tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N.tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; *desA/9* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 9; *desA/10* – рослина, що експресує ген *desA::licBM3*, лінія 10; *desC/3* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 3; *desC/13* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 13; *desC/15* – рослини з генами *ats1A::desC::licBM3*, лінія 15.

3.3. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *desC::licBM3* T1 покоління.

Дослідження рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* показало підвищену адаптацію цих рослин до абіотичних стресів (критично високі температури, зниженні та заморозки а також дію осмотичного стресу) [11, 188, 215].

Проте, для подальшого використання цієї моделі підвищення стресостійкості рослинних організмів, потрібно дослідити успадкування перенесених генів на стійкість до стресових чинників рослин покоління T1. Для цього, пророщували насіння *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3*, використовували умови *in vitro*: температура 25°C, вологість 30-40% у темряві протягом двох

тижнів з додаванням у середовище MS селективного агенту (канаміцину або фосфінотріцину).

Після чого переносили проростки в умови *in vivo* у теплицю, при температурі 16-24°C, вологості 30-40%, світловий день 12 год. Аналізували рослини через 2-3 місяці культивування.

Пророщували насіння трьох ліній рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licBM3* (рис.3.27) та насіння рослин двох ліній, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3* (рис. 3.28).

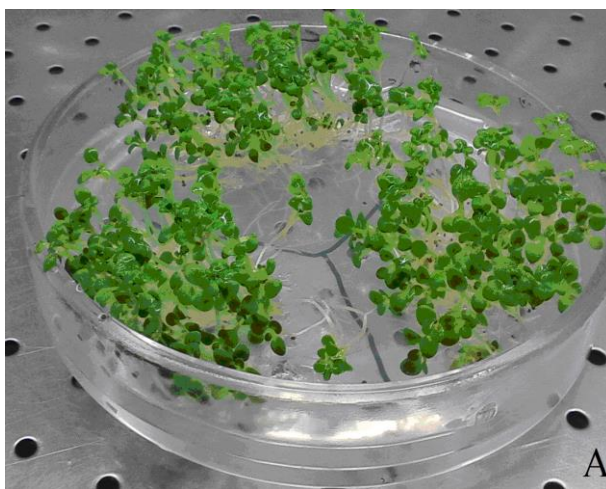


Рис.3.27.Культивування насіння рослин тютюну *N. tabacum* покоління T1, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*.



Рис. 3.28. Пророщування рослин *Nicotiana tabacum* покоління T1, що експресують ген *desA::licBM3*.

З кожної лінії відбирали для досліджень приблизно 50-60 насінин з трьох рослин однакової лінії.

Після того, як проросло насіння та було нарощену необхідну біомасу здійснювали реакцію мПЛР для того, щоб пересвідчитись в наявності успадкованих гібридних генів (3.29.).

Було проаналізовано 30 рослин покоління T1, що містять у своєму геномі ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази та 30 рослин покоління T1, що містять у своєму геномі ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази. Досліджено, що у 20% рослин, що мали б успадкувати ген *ats1A::desC::licBM3* дослідили успадкування гена *desC* або *licBM3* (рис. 3.29.). У 40% рослин, що мали б успадкувати ген *desA::licBM3* виявили успадкування гена *desA* або *licBM3*(рис. 3.30.).

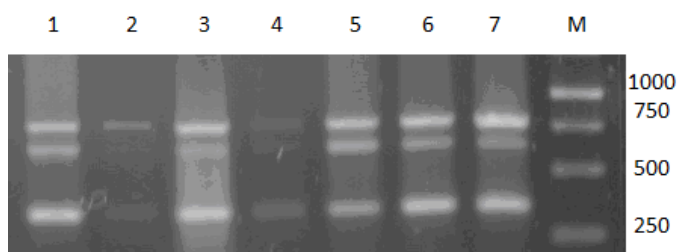


Рис.3.29. Аналіз трансгенних ліній *N. tabacum* на виявлення рекомбінантних генів *licBM3*, та *desC* методом мультиплексної ПЛР: Ампліфікація фрагмента гена актина слугує внутрішнім позитивним контролем; наявність гена *virD1* вказує на присутність *Agrobacterium tumefaciens*; М – маркер розміру DNA ladder; 1-7 – ДНК трансгенних рослин *N. tabacum*, що несуть ген *ats1A::desC:: licBM3*.

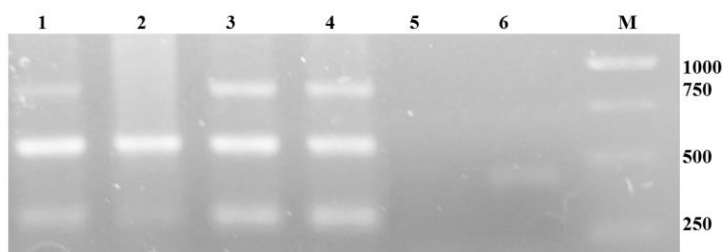


Рис.3.30. Аналіз трансгенних ліній *N. tabacum* на виявлення рекомбінантних генів *licBM3*, та *desA* методом мультиплексної ПЛР: Ампліфікація фрагменту гена актина слугує внутрішнім позитивним контролем; наявність гена *virD1* вказує на присутність *Agrobacterium tumefaciens*; М – маркер розміру DNA ladder; 1,3,4 – ДНК трансгенних рослин *N. tabacum*, що містять ген *desA::. licBM3*; 2 - ДНК трансгеної рослини *N. tabacum*, що містить ген *licBM3*; 5- реакція без ДНК; 6 - ДНК *A. tumefaciens* (1 нг).

Після проведення мультиплексної ПЛР було здійснено аналіз чашкового ліхеназного тесту, для того, щоб опосередковано визначити рівень експресії генів десатураз (рис. 3.31).

Це пов'язано з тим, що репортерний білок термостабільної ліхенази трансляційно злитий в одній рамці зчитування з досліджуваними.

Перевірка експресії генів показала, що ліхеназна активність була відмічена у тих рослин, які успадкували злиті гібридні гени *desA::licBM3* (3.31) або *ats1A::desC::licBM3* (рис 3.32).



Рис. 3.31. Дослідження експресії генів десатураз за активністю репортерного білка термостабільної ліхенази: 1 – позитивний контроль, 7 – негативний контроль, 2-6- ліхеназна реакція з екстрактами рослин тютюну, що експресують ген *desA::licBM3*.



Рис.3.32. Дослідження експресії генів десатураз за активністю репортерного білка термостабільної ліхенази: 1- позитивний контроль; 8 – негативний контроль; 2-6 – ліхеназна реакція з екстрактами рослин тютюну, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*.

Оскільки гени десатураз впливають на зміни в спектрі жирних кислот для рослин тютюну було проведено аналіз газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл. 3.2.).

В рослин, що містять у своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази було відмічено збільшення частки ліноленової кислоти, а у рослин, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази – лінолевої кислоти. Це відповідає попереднім дослідженням рослин спектру жирних кислот рослин тютюну, що експресують перенесені гени десатураз ціанобактерій [216].

Таблиця 3.2. Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну покоління T1, що експресують гени $\Delta 9$ - або $\Delta 12$ - ацил-ліпідних десатураз (мол. % $\pm$ SD).

Рослина	C16:0	C16:3	C18:0	C18:2	C18:3
<i>N.tabacum</i>	18,1 $\pm$ 1,8	1,7 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 3,5	58,6 $\pm$ 6,0
<i>gfp::licBM3/19</i>	21,9 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,4	15,5 $\pm$ 2,7	56,9 $\pm$ 3,7
<i>ats1A::desC::licBM3/1</i>	19,1 $\pm$ 1,8	3,1 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,3	12,0 $\pm$ 3,1	68,4 $\pm$ 1,9
<i>ats1A::desC::licBM3/2</i>	17,9 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 0,67	0,6 $\pm$ 0,07	11,01 $\pm$ 1,2	69,1 $\pm$ 6,4
<i>ats1A::desC::licBM3/3</i>	19,3 $\pm$ 1,2	1,56 $\pm$ 0,7	0,89 $\pm$ 0,2	14,1 $\pm$ 3,2	66,5 $\pm$ 2,4
<i>desA::licBM3/1</i>	21,02 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,67	34,8 $\pm$ 2,4	40,5 $\pm$ 3,3
<i>desA::licBM3/2</i>	18,9 $\pm$ 1,8	0,87 $\pm$ 0,36	1,9 $\pm$ 0,71	33,9 $\pm$ 2,8	42,01 $\pm$ 4,7
<i>desA::licBM3/3</i>	19,4 $\pm$ 1,8	0,92 $\pm$ 0,53	3,1 $\pm$ 1,1	32,7 $\pm$ 3,6	41,3 $\pm$ 3,6

3.3.1. Аналіз рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* T1 покоління.

Для визначення стійкості рослин до стресу знижених температур та заморозків рослини піддавали дії холодового стресу 0°C – 20 хв, потім -5 °C – 80 хв. Після чого досліджували показники втрати електролітів, рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза.

Електроліти є важливим показником обміну речовин в організмі. Вони беруть участь в активації енолази, перехід АТФ в АДФ і навпаки [174].

Ферментативні реакції дуже залежні від концентрації електролітів. Визначили меншу втрату електролітів у рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контролем. Багато важливих ферментів, що відіграють ключову роль в підтриманні рослинного гомеостазу залежні від концентрації певних електролітів, наприклад, Na, Cl, K, Mg та інші.

Перевіряючи рівень електролітів, що залишилися в рослині після дії холодового стресу, виявили найменшу втрату іонів у тютюнів, що містять у своєму геномі та експресують додаткові гени десатураз (рис 3.33.)

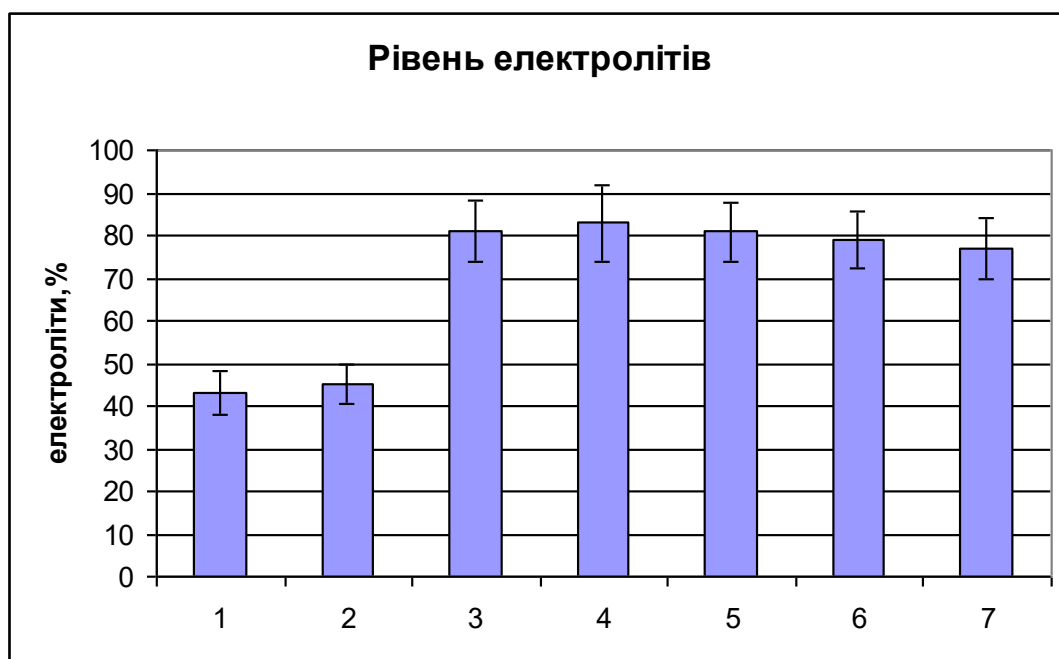


Рис. 3.33. Дослідження рівня електролітів, що залишилися у мембранах рослин: 1 – рослина тютюну *N.tabacum* дикого типу; 2 – рослина тютюну *N.tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5,6,7 – рослини з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Статистично достовірної різниці показників тютюну, що експресують ген *desC* або *desA* не виявили. Щодо рівня втрати електролітів у контрольних рослинах, то достовірної різниці між трансгенним контролем і не трансгеним не було відмічено.

Аналізуючи показники ферменту супероксидисмутази, виявили збільшення активності у трансгених рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контролем після холодового стресу (рис. 3.34).

Проте, при нормальних фізіологічних умовах, достовірної різниці між досліджуваними рослинами та контрольними не спостерігали, навіть, можна, відмітити тенденцію до підвищення активності СОД у контрольних рослин за нормальних фізіологічних умов. Різниці у показників активності СОД у рослин, що експресують ген *desA* або *desC* не дослідили.

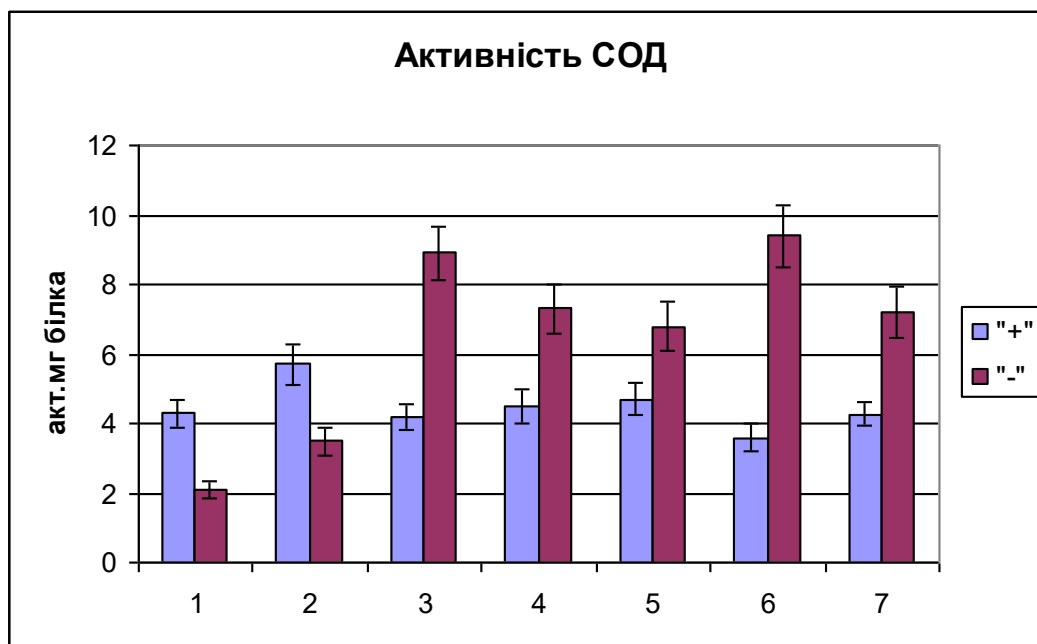


Рис. 3.34. Дослідження активності ферменту супероксиддисмутаза: 1 – рослина тютюну *N.tabacum* дикого типу; 2 – рослина тютюну *N. tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*; 3,4,5 – рослини з геном *desA::licBM3*; 6,7,8 – рослини з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Рівень накопичення малонового діальдегіду вказує на ступінь окисної деструкції саме ненасичених ЖК. Досліджували накопичення малонового діальдегіду у рослин після дії холодового стресу (рис. 3.35).

Хоча, у трансгенних рослин тютюну, що експресують гени десатураз частка ненасичених ЖК збільшена, проте, було виявлено підвищення накопичення даного альдегіду у контрольних досліджуваних рослин [214]. Статистично достовірної різниці показників накопичення МДА трансгенних контрольних рослин (*gfp::licBM3*) та тютюну дикого типу не було відмічено.

Рослини, що експресують гени десатураз не мали достовірної різниці у накопиченні МДА, незважаючи на різну субстатну специфічність.

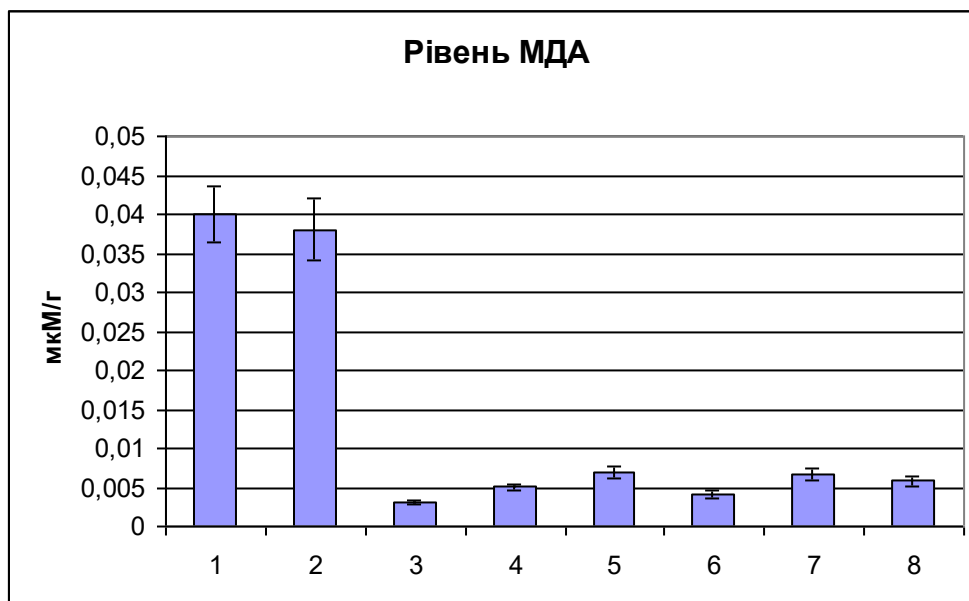


Рис. 3.35. Дослідження рівня накопичення МДА після дії холодового стресу:
 1 – рослина тютюну *N.tabacum* дикого типу;
 2 – рослина тютюну *N.tabacum*, що експресує ген *gfp::licBM3*;
 3,4 – рослини з геном *desA::licBM3*;
 5,6,7 – рослини з геном *ats1A::desC::licBM3*.

Загалом, менший рівень малонового діальдегіду вказує на менший вплив супероксидних радикалів, що викликають окисну деструкцію.

Досліджуючи рослини тютюну *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* покоління T1 було виявлено успадкування лише частин злитих гібридних генів у 30% рослин, що містили у своєму геномі ген *ats1A::desC::licBM3* та у 40% рослин, що містили у своєму геномі ген *desA::licBM3*.

За допомогою аналізу спектру жирних кислот було виявлено збільшення частки лінолевої кислоти у рослин, що успадкували цілий ген *desA::licBM3* та підвищення частки ліноленової кислоти у рослин, що успадкували цілий ген *ats1A::desC::licBM3*.

Аналіз рослин, що експресують гени десатураз після дії холодового стресу показав підвищення їх адаптації до дії стресора порівняно з контрольними рослинами.

3.4. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3* під холодоіндукованим промотором CBF1.

Холодоіндукований промотор у багатьох рослин відіграє ключову роль в акліматизації до холоду [217]. У рослин *Arabidopsis*, адаптація до холоду включає в себе відповідь на дію низьких температур шляхом активації промотора CBF [218].

Протягом 15 хв впливу низьких температур на рослини, накопичуються транскрипти сімейства генів, що обумовлюють експресію генів CBF1, CBF2 і CBF3 (або DREB1b, DREB1c і DREB, відповідно). Ці фактори транскрипції пов'язують з холодо- і дегідративно-адаптивним ДНК регуляторним елементом EPT, який присутній в промоторах COR і багатьох інших холодоіндукованих генах, що стимулюють транскрипцію певних генів у відповідь на дію температурного стресу [219].

Встановлено, що промотори генів CBF починають взаємодіяти з ДНК-полімеразою та, тим самим забезпечують експресію генів за низьких температур [217].

В роботі використовували конструкцію на основі вектора pNPB0110, що містила ген *desA* ($\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази) трансляційно злитий в одній рамці зчитування з репортерним геном термостабільної ліхенази *licBM3* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1. Як селективний агент використовували ген *nptII*, що обумовлює стійкість трансформантів до канаміцину.

Генетична трансформація рослин відбувалась за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації методом "листяних дисків". Через 1,5-2 тижні культивування експлантів на селективному середовищі із додаванням агента канаміцина було виявлено місця інтенсивного зеленого кольору та пожовтіння деяких ділянок експлантів. В подальшому із зелених ділянок почали утворюватися пагони, з яких розвивалися трансгенні рослини (рис.3.36.)



Рис. 3.36. Регенерація проростків на середовищі MS із додаванням селективного агента канаміцина.

Для підтвердження вставки гібридного гена було здійснено мПЛР (рис 3.37.). Таким чином, було підтверджено, що внаслідок *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було отримано 13 ліній трансформантів, що містила у своєму геномі ген *desA::licBM3*.

Для того, щоб перевірити експресію генів використовували якісний ліхеназний “чашковий” метод. Оскільки, досліджувані гени знаходяться під контролем холодоіндукованого промотора дану реакцію проводили після дії холодового стресу.

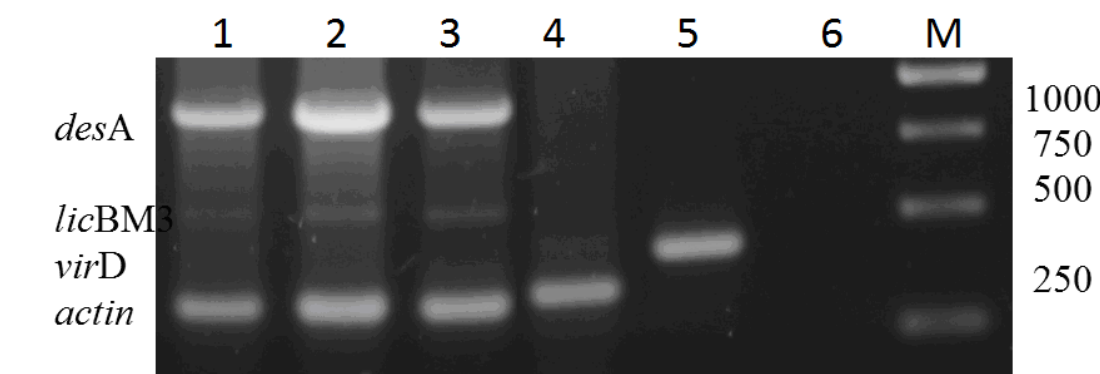


Рис. 3.37. Мультиплексна ПЛР з екстрактами рослин тютюну *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3* під холодоіндукованим CBF1 промотором:
 1 – *N. tabacum* (*desA::licBM3*); 2 – *N. tabacum* (*desA::licBM3*);
 3 – *N. tabacum* (*desA::licBM3*); 4 – *actin*; 5 – *virD*; 6 – контроль H₂O;
 М – маркер розміру ДНК.

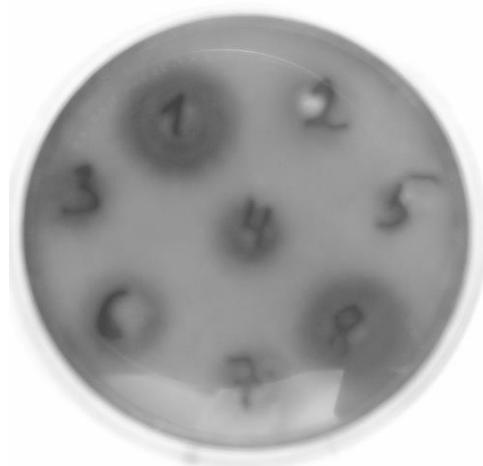


Рис 3.38. Якісна ліхеназна реакція після дії холодового стресу:

1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль;

3,4,6,7,8 – рослини, що містять ген *desA::licBM3*, позитивні за репортерним білком;

5 – рослина, що містять ген *desA::licBM3*, негативна за репортерним білком.

Чашковим методом було визначено наявність експресії перенесених генів у 12 лініях. Для подальших досліджень використовували рослини трьох ліній.

Аналіз спектру жирних кислот проводили методом газової хроматографії та мас-спектрометрії після дії холодового стресу (табл 3.3.)

Таблиця.3.3. Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну, що експресують гени *desA::licBM3* та *gfp::licBM3* після дії холодового стресу.

Рослина	C16:0(%)	C16:1(%)	C18:0(%)	C18:2(%)	C18:3(%)
Контроль <i>N. tabacum</i>	21,1±0,8	1,6±0,8	1,1± 0,5	18,5±5,3	57,5±5,7
Контроль <i>N. tabacum</i> (<i>gfp::licBM3</i>)	20,9±2,6	1,6±0,8	1,8±0,3	17,5±4,7	57,9±3,2
<i>N. tabacum</i> (<i>desA::licBM3</i>)№5	18,3±0,7	1,3±0,06	3,4±0,06	33,5±1,03	58,3±1,6
<i>N. tabacum</i> (<i>desA::licBM3</i>)№7	20,7±0,9	1,2±0,05	2,7±0,05	32,7±0,9	60,6±1,4
<i>N. tabacum</i> (<i>desA::licBM3</i>) №9	19,9±1,1	0,9±0,04	2,2±0,04	24,5±0,8	59,8±0,8

За допомогою цього дослідження було виявлено збільшення частки лінолевої кислоти у рослин тютюну, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії та незначне підвищення ліноленової кислоти.

Як контроль використовували рослини тютюну *N. tabacum*, дикого типу та рослини тютюну *N. tabacum*, що експресують ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3* під холодоіндукованим *CBF1* промотором. У контрольних рослин склад жирних кислот у досліджуваних зразках суттєво не відрізнявся.

3.4.1. Аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3* під холодоіндукованим промотором *CBF1* в умовах короткострокових заморозків.

Для того, щоб визначити адаптацію рослин до холодowego стресу перевіряли рівень накопичення малонового діальдегіду, активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень втрати електролітів та рівень експресії генів по репртерному білку після дії холодowego стресу (0°C – 20 хв, -5 °C – 80 хв.).

Активність ферменту СОД перевіряли, як за кімнатної температури, так і за умов холодowego стресу (рис.3.39).

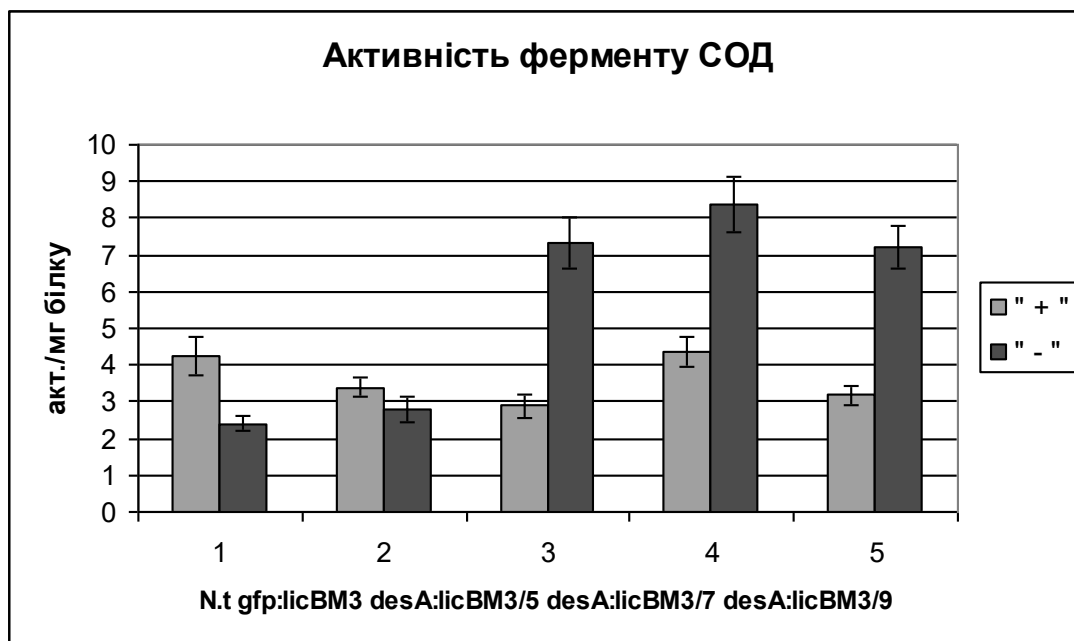


Рис. 3.39. Дослідження активності ферменту супероксиддисмутаза у рослин тютюну за нормальних фізіологічних умов та після дії холодowego стресу:

N.t. – рослина *Nicotiana tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA::licBM3/5* – скорочена назва лінії №5 рослин *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*; *desA::licBM3/7* – скорочена назва лінії №7 *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*; *desA::licBM3/9* – скорочена назва лінії №9 *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*.

Виявили збільшення активності даного ферменту після дії стресора у рослин, що експресують ген десатурази, порівняно з контрольними рослинами. Стосовно різниці між лініями тютюну, що експресують ген *desA*, слід відмітити лінію №7 у якої було відмічено підвищення активності СОД до, та після дії холодового стресу.

При визначенні активності даного ферменту при нормальних фізіологічних умовах та після дії холодового стресу достовірної різниці між контрольними рослинами дикого типу та трансгенним контролем, що експресує ген біфункціонального репортеру не було відмічено.

Дослідження рівня накопичення малонового діальдегіду проводили після дії холодового стресу (рис. 3.40).

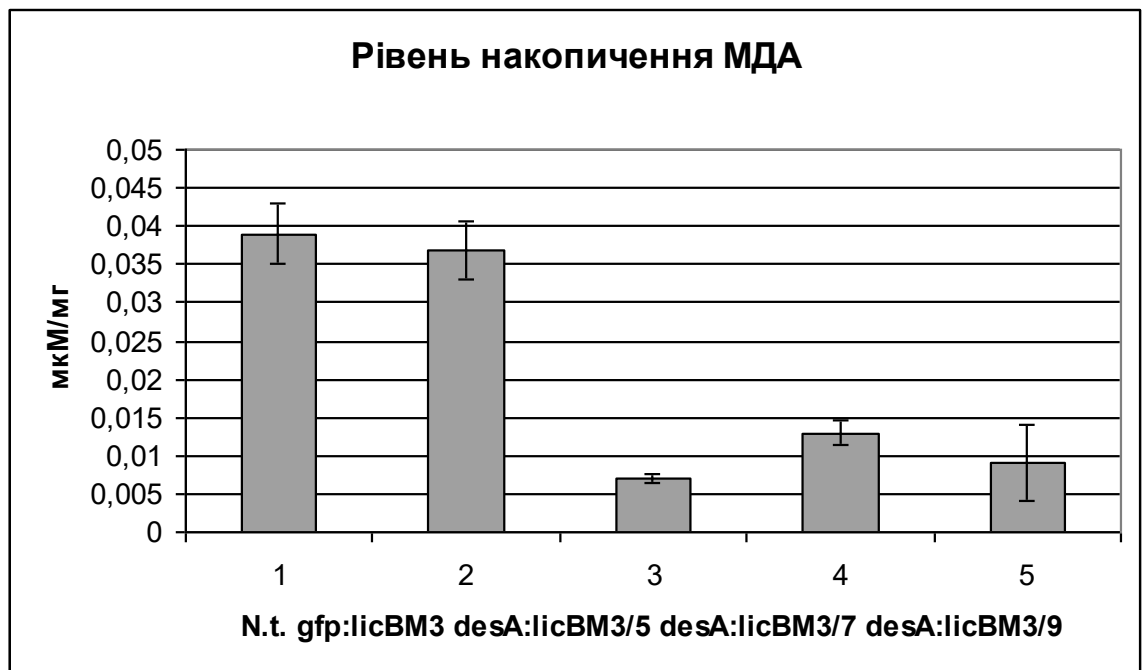


Рис 3.40. Рівень накопичення малонового діальдегіду після дії холодового стресу:

N.t. – рослина *Nicotiana tabacum*;

gfp::licBM3 – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*;

desA::licBM3/5 – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*;

desA::licBM3/7 – скорочена назва лінії №7 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*;

desA::licBM3/9 – скорочена назва лінії №9 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*.

Виявили зменшення накопичення даної речовини у рослин, які експресують ген десатурази порівняно з контрольними рослинами тютюну дикого типу та трансгенним контролем. Це вказує на менше переокисне окислення ненасичених жирних кислот, та, як наслідок, меншу окисну деструкцію.

Достовірної різниці між досліджуваними контрольними рослинами не було відмічено. Різниці між рівнем накопичення МДА у ліній отриманого трансгенного тютюну теж не було відмічено.

Під час дії холодового стресу доцільним є перевірка експресії досліджуваного гена [217]. Рівень експресії гена визначали за активністю продукту гена репортерного білка термостабільної ліхенази (3.41). Вимірювання проводились після дії стресору. Виявили збільшення експресії у трансгенних рослин тютюну, що експресують ген десатурази.

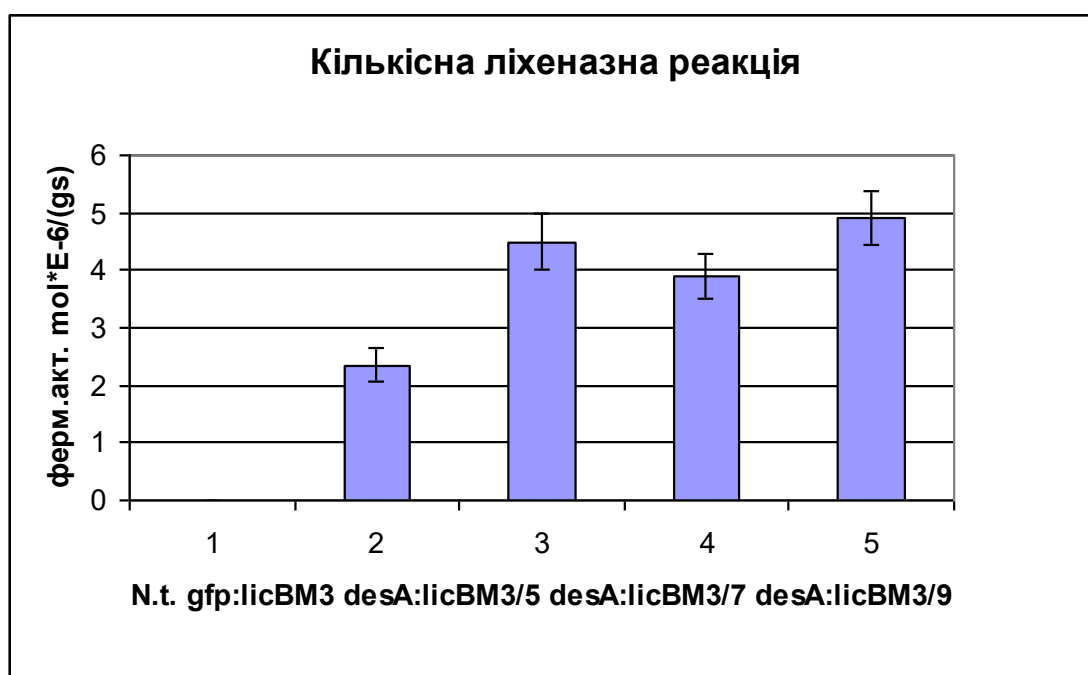


Рис.3.41. Дослідження рівня експресії генів десатураз за активністю репортерного білка термостабільної ліхенази: *N.t.* – рослина *Nicotiana tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *Nicotiana tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA::licBM3/5* – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*; *desA::licBM3/7* – скорочена назва лінії №7 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*; *desA::licBM3/9* – скорочена назва лінії №9 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*.

Після впливу холодового стресу в даних рослин дослідили збільшення активності ферментів ліхенази, що розчиняють складні вуглеводи до простих. Виявили збільшення активності експресії генів порівняно з контрольними трансгенними рослинами, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортеру *gfp::licBM3*.

Даний результат вказує на те, що адаптація рослин до дії холодового стресу супроводжується підвищенням експресії гена $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази.

Досліджуючи рівень електролітів можна дослідити рівень пошкоджень мембран, що супроводжуються втратою важливих для підтримання гомеостазу іонів (рис 3.42.).

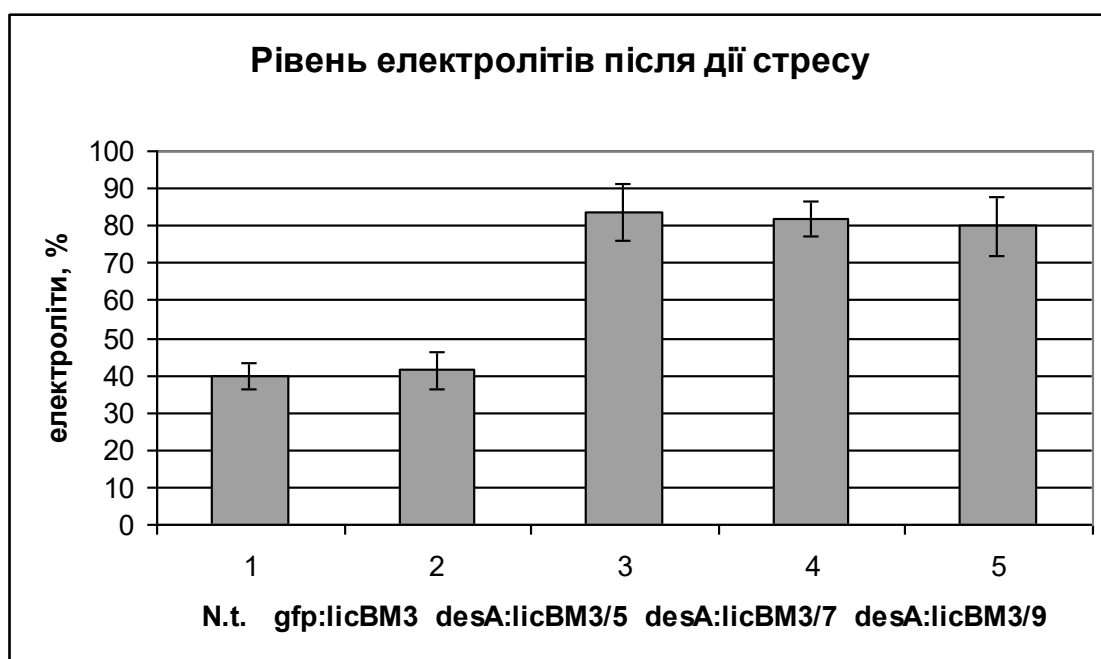


Рис.3.42. Визначення загального рівня електролітів після дії холодового стресу:

N.t. – рослина *N. tabacum*;

gfp::licBM3 – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*;

desA::licBM3/5 – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*;

desA::licBM3/7 – скорочена назва лінії №7 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*;

desA::licBM3/9 – скорочена назва лінії №9 рослини *N. tabacum*, що експресує ген *desA::licBM3*.

В даному дослідженні перевіряли загальний вміст електролітів [161]. Визначали кількість іонів, що залишилась у листку після дії холодового стресу. Однією з причин загибелі рослин від впливу критично низьких температур є механічне пошкодження мембран – тріщини, розриви та інші пошкодження [166]. Внаслідок цього мембрани рослин втрачають іони важливих електролітів, які є надзвичайно важливими для обміну речовин як всередині клітин так і між клітинами [167].

Дослідили, що рослини тютюну з експресією генів десатураз характеризуються меншим рівнем втрати іонів, порівняно з контрольними рослинами. Достовірної різниці у показниках втрати електролітів між лініями отриманих рослин не було відмічено.

Різниці між показниками втрати іонів у контрольних трансгенних рослин та контрольних рослин дикого типу не виявили.

Підсумовуючи аналіз рослин тютюну *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1, можна зробити висновок про кращу адаптацію цих рослин порівняно з контролем після дії холодового стресу.

3.5. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що одночасно експресують гібридні гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*

Генетичну трансформацію рослин *N. tabacum* було здійснено за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації методом “листяних дисків”. Експланти культивували *in vitro* на середовищі MS з додаванням селективного агенту канаміцину. Після селекції всі відібрані клони переносили на регенераційне середовище з тими ж селективними агентами, проте, з додаванням фітогормонів (цитокінів та ауксинів).

Після події генетичної трансформації через 1,5 – 2 тижня на частині відібраних калюсів утворювались інтенсивно-зелені осередки регенерації, з яких при подальшому культивуванні утворювались проростки [220].

Із 16 відселектованих ліній, які було трансформовано вектором *pNPB14* (*desA::licBM3*) 14 ліній показали наявність в геномі копії трансгену і не містили агробактеріальної контамінації. Слід зазначити, що отримані регенеранти не відрізнялись від контрольних рослин за фенотипом (рис.3.43.)

Наявність вставки генів було доведено методом мультиплексної ПЛР за наявністю ампліконів *desC* – 949 п.о., *desA* – 777 п.о., *licBM3* – 642 п.о (рис.3.44).

Таким чином було отримано 14 ліній рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно два гени ацил-ліпідних десатураз *desC* ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та *desA* *Synechocystis* sp.PCC 6803.

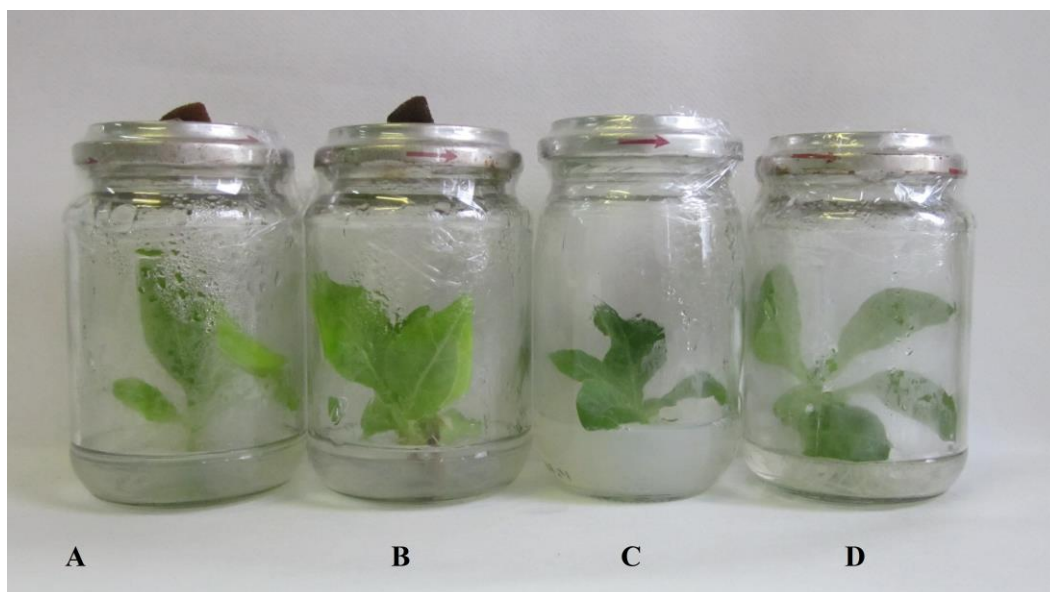


Рис. 3.43. Рослини, що використовувались у дослідженні:

A – контрольна рослина *N. tabacum*;

B – контрольна рослина, що експресує ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*;

C,D – рослини, що одночасно експресують гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*

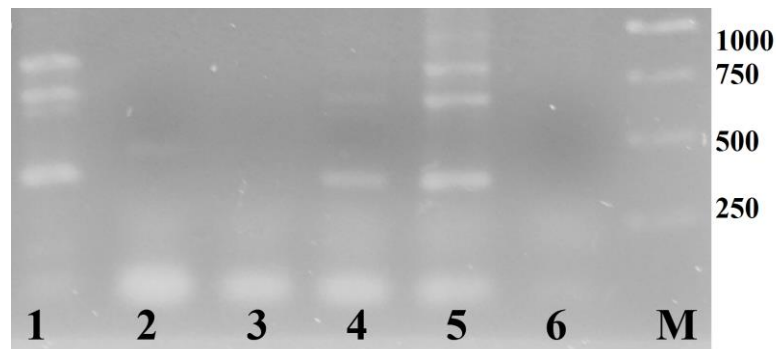


Рис.3.44. Аналіз трансгенних ліній *N. tabacum* на виявлення рекомбінантних генів *licBM3*, *desA* та *desC* методом мультиплексної ПЛР: ампліфікація фрагмента гена актина слугує внутрішнім позитивним контролем; наявність гена *virD1* вказує на присутність *Agrobacterium tumefaciens*; М – маркер розміру DNA ladder;
 1 – ДНК трансгенної рослини *N. tabacum* що експресує ген *desA::licBM3*;
 2 – ДНК *A. tumefaciens* (1 нг);
 3 – ДНК трансгенної рослини, що несе ген *desA::licBM3*;
 4,5 – ДНК трансгенної рослини, що несе гени *ats1A::desC::LicBM3* та *desA::licBM3*
 6 – реакція без ДНК.

Експресію генів перевіряли опосередковано за активністю продукту експресії репортерного білка, проводячи кількісну ліхеназну реакцію. Якісну ліхеназну реакцію не здійснювали, оскільки, матеріалом для генетичної трансформації були рослини тютюну, які містили у своєму геномі та експресували ген *ats1A::desC::licBM3*.

З попередніх досліджень можна зробити висновок, що рослини, які синтезують додаткові ферменти десатураз змінюють таким чином склад ЖК мембранних ліпідів [216]. Це відбувається за рахунок збільшення частки ненасичених ЖК.

Взагалі десатурація жирних кислот розпочинається з положення $\Delta 9$. В рослин, що експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази спостерігається збільшення частки ліноленової кислоти, оскільки субстратом даного ферменту є стеаринова кислота, яка в подальшому забезпечує збільшення частки олеїнової та лінолевої кислоти [88]. А у рослин, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази спостерігається збільшення лінолевої кислоти, оскільки субстратом даного ферменту є олеїнова кислота.

Дуже важливим фактором є також послідовність десатурації ЖК: спочатку утворюються подвійні зв'язки між атомами карбону (C=C) в положенні $\Delta 9$, потім в положенні $\Delta 12$, а вже потім в положеннях $\Delta 6$ та $\omega 3$ [5].

Утворення тієї чи іншої кислоти залежить не тільки від рівня експресії відповідного ферменту, а й від наявності субстрату необхідного для певного ферменту, тому досить важливим в корегуванні складу мембранних ліпідів є передбачення наявних субстратів в забезпеченні функціонування відповідних ферментів [6].

Виходячи з попереднього досвіду отримання трансгенних рослин з експресією додаткових генів десатураз для отриманих трансгенних рослин було здійснено аналіз спектру жирних кислот за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії [12].

У подвійних трансформантів, що одночасно містять два гетерогічних гени десатураз ціанобактерій було досліджено достовірне збільшення частки лінолевої (C18:2) та ліноленової кислот (C18:3) (табл. 3.3)

Як контроль у дослідженні використовували рослини *N. tabacum* дикого типу та рослини *N. tabacum*, що містять у своєму геномі ген біфункціонального репортера *gfp:licBM3*. Достовірної різниці в аналізі ЖК контрольних рослин не було відмічено.

Таблиця.3.3. Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну, що одночасно містять у своєму геномі та експресують гени *desA* і *desC*.

Рослина	C16:0 (%)	C16:1(%)	C18:0(%)	C18:2(%)	C18:3(%)
Контроль <i>N. tabacum</i>	21,1 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,5	18,5 $\pm$ 5,3	57,5 $\pm$ 5,7
Контроль <i>N.tabacum (gfp:licBM3)</i>	20,9 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 1,8	1,8 $\pm$ 0,3	17,5 $\pm$ 4,7	57,9 $\pm$ 3,2
<i>N.tabacum</i> (<i>desA+desC:licBM3</i>)№5	20,2 $\pm$ 1,9	1,4 $\pm$ 0,05	2,3 $\pm$ 0,07	38,3 $\pm$ 0,05	68,5 $\pm$ 0,7
<i>N. tabacum</i> (<i>desA+desC:licBM3</i>)№6	19,7 $\pm$ 1,8	0,9 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,08	37,9 $\pm$ 0,9	73,6 $\pm$ 1,3
<i>N. tabacum</i> (<i>desA+desC:licBM3</i>)№15	19,3 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,04	1,8 $\pm$ 0,03	36,4 $\pm$ 0,8	76,8 $\pm$ 1,3

3.5.1. Аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3* в умовах знижених температур та заморозків.

В отриманих рослин дослідили збільшення частки, як лінолевої (C18:2), так і ліноленової (C18:3) кислот. Для трансгенних рослин, що експресують додатковий ген десатурази (*desA* або *desC*), було відмічено підвищену адаптацію до дії холодового стресу [84]. Тому подвійні трансформанти були теж проаналізовані в умовах знижених температур.

Перевіряли адаптацію рослин за такими показниками: активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень накопичення малонового діальдегіду, загальний відсоток втрати електролітів та експресію гена за ферментативною активністю репортерного білка термостабільної ліхенази методом кількісної ліхеназної реакції. В даному дослідженні як контроль використовували рослини *N. tabacum* дикого типу та трансгенні рослини *N. tabacum*, що експресують ген *gfp::licBM3*.

Дослідження ліхеназної активності показало підвищення активності експресії генів десатураз по репортерному білку після дії холодового стресу показало підвищення експресії порівняно з трансгенним контролем на 23-51% (рис 3.45.).

Рослини дикого типу не містять у своєму геномі ген ліхенази, але використовували у дослідженні, оскільки, відомо, що при стресових умовах активність ферментів зростає.

Різниці між отриманими трансгенними лініями тютюну, що містять у своєму геномі та експресують гетерологічні гени десатураз відмічено не було.

Досліджуючи втрату електролітів, виявили менший рівень втрати у трансгенних рослин, що містять у своєму геномі два гени десатураз порівняно з контрольними (3.46.).

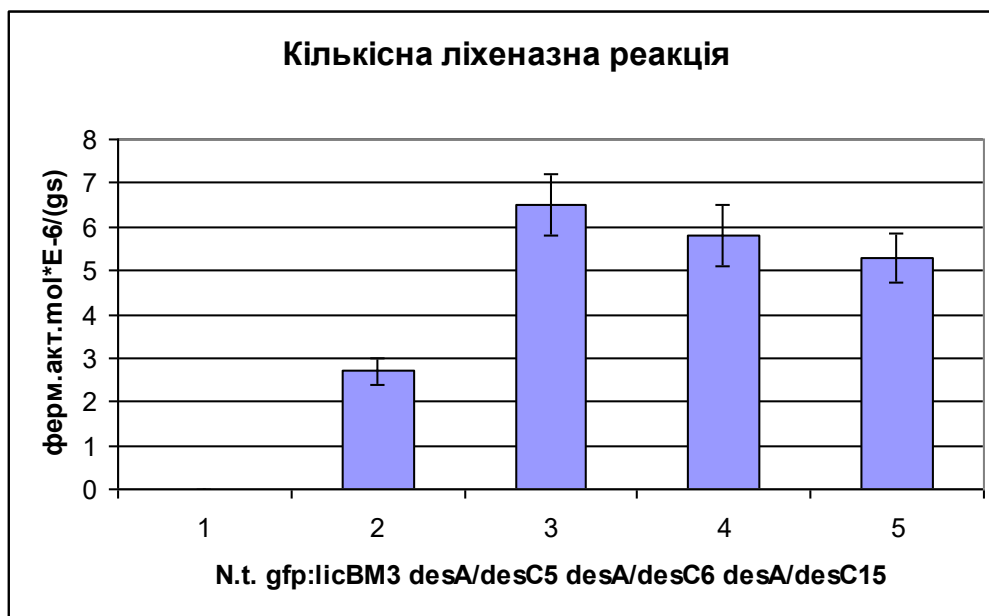


Рис. 3.45. Аналіз активності ліхенази після дії холодового стресу:

N.t. – рослина *N. tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA/desC5* – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC6* – скорочена назва лінії №6 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC15* – скорочена назва лінії №15 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*.

Суттєвої різниці між трансгенним контролем, що експресує ген біфункціонального репортера та рослинами дикого типу виявлено не було.

Достовірної різниці між трансгенними рослинами, що місять у своєму геномі та експресують одночасно два гени десатураз не виявили.

Рівень накопичення малонового діальдегіду вказує на ступінь окисної деструкції ненасичених жирних кислот [134]. Хоча рослини одночасно експресують два гени десатураз, та показники результатів хроматографічного аналізу спектру ЖК вказують на підвищення частки ненасичених ЖК в спектрі цих рослин, однак рівень накопичення малонового діальдегіду в них набагато менший ніж такий у контрольних рослинах.

Досліджуючи показники накопичення МДА достовірної різниці між рослинами тютюну дикого типу та трансгенним контролем відмічено не було.

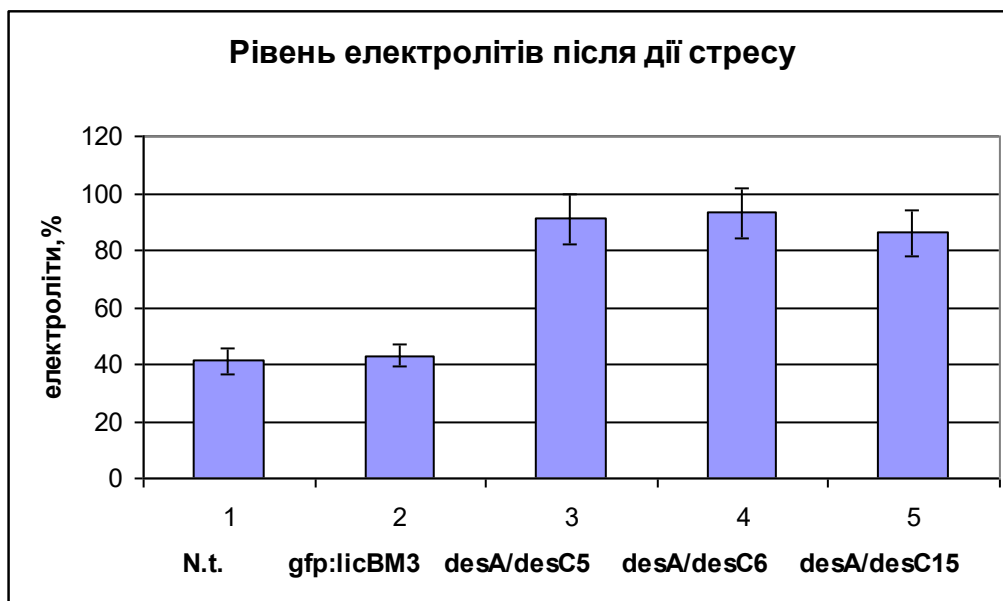


Рис. 3.46. Дослідження рівня електролітів, що залишились в мембранах: *N.t.* – рослина *N. tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA/desC5* – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC6* – скорочена назва лінії №6 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC15* – скорочена назва лінії №15 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*.

Аналіз показників накопичення МДА у трьох ліній, що містять у своєму геномі та експресують одночасно два гетерологічних гени десатураз, показав, що достовірних даних різниці накопичення МДА не було (рис 3.47.).

Перевіряли активність ферменту супероксиддисмутаза за нормальних фізіологічних умов (+25°C) та після дії умов холодового стресу [120].

При культивуванні рослин за нормальних фізіологічних умов достовірної різниці між контрольними та трансгенними рослинами не було відмічено. Проте, після дії холодового стресу відмітили підвищення активності ферменту СОД у рослин, що містять у своєму геномі та експресують гени десатураз.

Під час дослідження було відмічено незначне підвищення активності СОД у рослин тютюну дикого типу за нормальних фізіологічних умов та незначне підвищення активності СОД у рослин тютюну, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортера після дії холодового стресу.

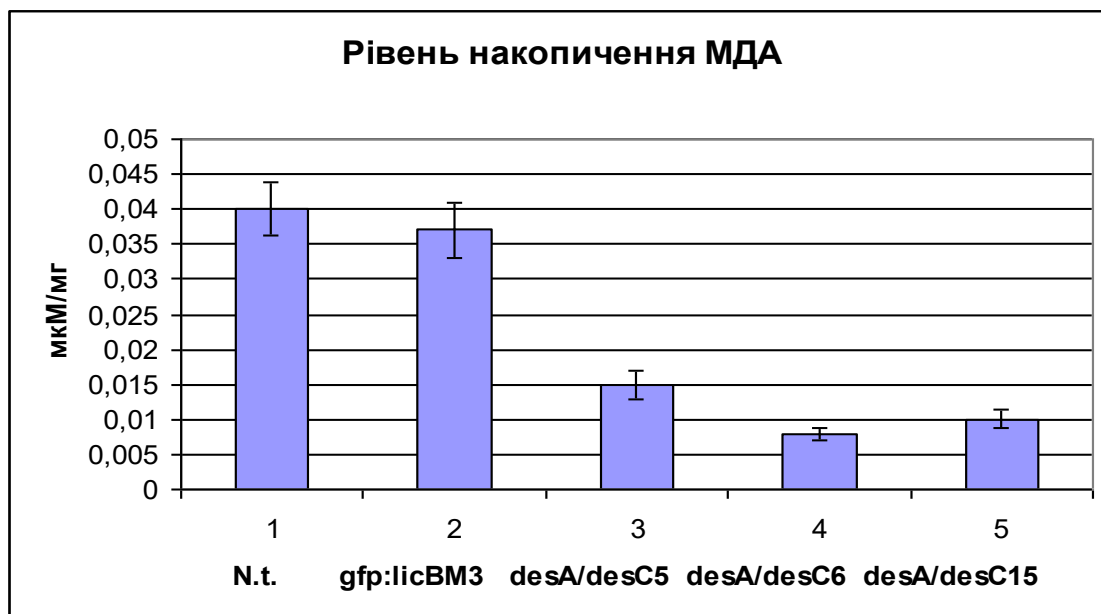


Рис.3.47. Дослідження рівня накопичення МДА після дії холодового стресу: *N.t.* – рослина *N. tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA/desC5* – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC6* – скорочена назва лінії №6 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC15* – скорочена назва лінії №15 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*

Значної різниці показників активності СОД в отриманих трансгенних лініях, що експресують гени десатураз не було відмічено (рис 3.48.).

Отже, було отримано регенеранти *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно 2 гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. Це сприяє збільшенню частки ненасичених жирних кислот в складі мембранних ліпідів, що було доведено аналізом газової хроматографії та мас-спектрометрії. При дослідженні рослин до дії холодового стресу, виявили менший ступінь пошкоджень та кращу адаптацію порівняно з контрольними рослинами.

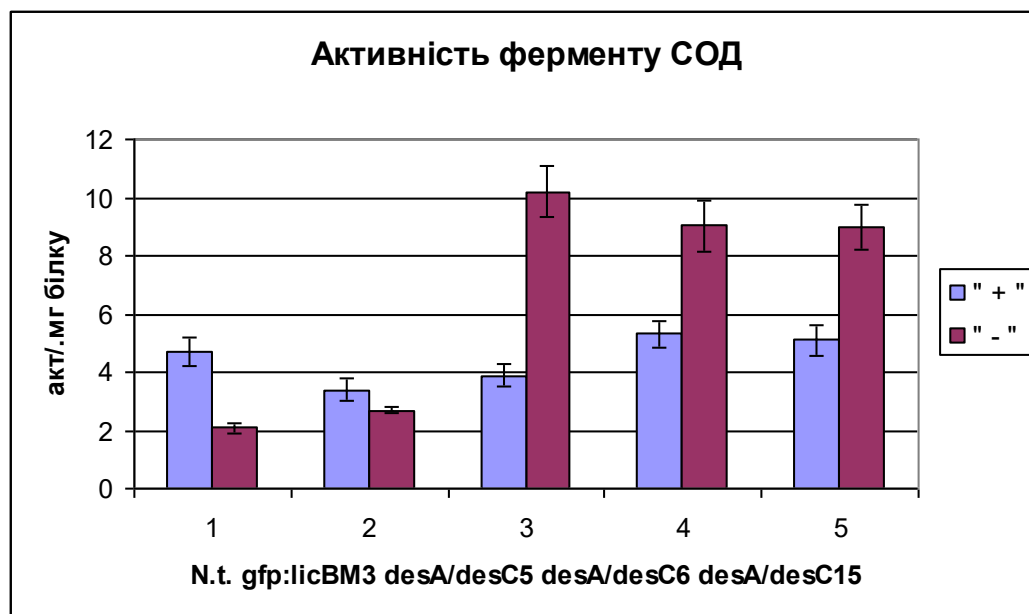


Рис 3.48. Дослідження рівня накопичення МДА після дії холодового стресу: *N.t.* – рослина *N. tabacum*; *gfp::licBM3* – рослина *N. tabacum*, що експресує гібридний ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desA/desC5* – скорочена назва лінії №5 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*; *desA/desC6* – скорочена назва лінії №6 рослини *N. tabacum*, що експресує гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*;

3.6. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Solanum tuberosum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3*

Картопля є однією з важливих сільськогосподарських рослин, що має широке застосування у промисловості (кормовій, харчовій, технічній, тощо) [221,222]. Неприятливі чинники навколишнього середовища, такі як різкі граничні температурні коливання, засоленість ґрунтів або посуха знижують врожайність даної культури.

Південні області України потерпають від посух, що припадають на період вегетації бульб картоплі. Адаптація рослин до несприятливих чинників залежить від адаптаційної здатності мембран, зокрема їх жирнокислотного складу, тому, генетична трансформація даних рослин генами десатураз дозволить отримати лінії стійкі до абіотичних стресів [216].

Шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації методом “листяних дисків” було отримано рослини картоплі сортів української селекції (3.49.)



Рис.3.49. Рослини *S. tuberosum*, сортів української селекції, які використовувались для досліджень: 1 – Не трансгенна рослина *S. tuberosum*, контроль; 2 – трансгенна рослина *S. tuberosum*, сорт Лугівська, лінія №2; 3 – трансгенна рослина *S. tuberosum*, сорт Слов'янка, лінія №1; 4 – трансгенна рослина *S. tuberosum*, сорт Серпанок, лінія №2.

Слід зазначити, що отримані трансгенні рослини фенотипово не відрізнялися від вихідних рослин. Для підтвердження вставки трансгену (*desC::licBM3*) було проведено реакцію ПЛР (рис. 3.50.) а описаним раніше протоколом.

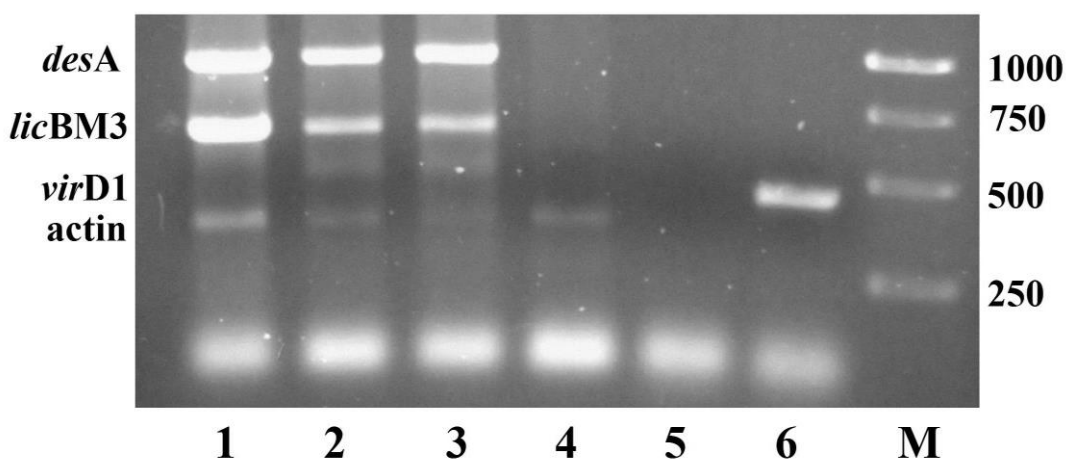


Рис 3.50. Аналіз трансгенних рослин *S. tuberosum* L для визначення гібридних генів *desA* і *licBM3* методом мультиплексної ПЛР: 1 – ДНК трансгенної картоплі сорту «Серпанок 2»; 2 – ДНК трансгенної картоплі сорту «Слов'янка»; 3 – ДНК трансгенної картоплі сорту «Лугівська 2»; 4 – не трансгенна рослина; 5 – контроль контроль H₂O; 6 – ДНК *A. tumefaciens*; М – 100 bp DNA маркер.

Для підтвердження експресії гібридних генів було здійснено аналіз активності ферменту ліхенази за допомогою якісного чашкового ліхеназного тесту, оскільки ген репортерного білка термостабільної ліхенази знаходився в одній рамці зчитування з досліджуваним геном ферменту десатурази.

Даний метод оснований на тому, що в чашки Петрі заливається суміш, яка містить 0,05% ліхенану. Ліхеназа розщеплює ліхенан, який розчиняється в середовищі до простих цукрів. Оскільки фарбник взаємодіє тільки з негідролізованим ліхенаном, навколо лунок, що містять активну ліхеназу спостерігали зони, що не профарбувались та вказують на гідроліз ліхенану [177] (рис. 3.51).

Для визначення рівня експресії по активності репортерного білка термостабільної ліхенази здійснювали кількісну ліхеназну реакцію (рис. 3.52).

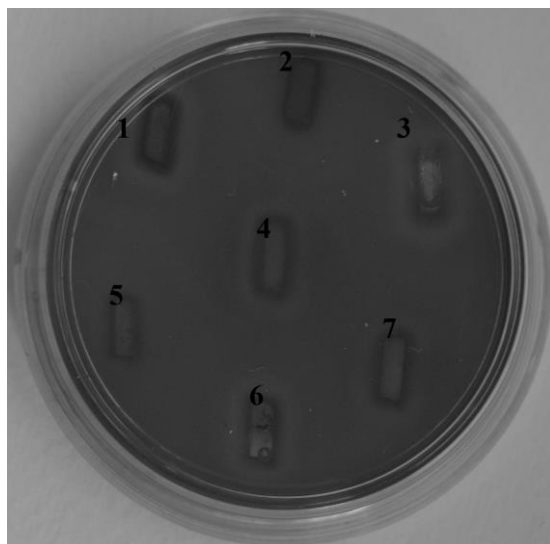


Рис. 3.51. Якісний аналіз активності термостабільної ліхенази: 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3 – екстракт рослини *S. tuberosum* сорт «Серпанок 2», що експресує ген *desA::licBM3*; 4 – екстракт рослини *S. tuberosum* сорт «Слов'янка 1», що експресує ген *desA::licBM3*; 6 – екстракт рослини *S. tuberosum* сорт «Лугівська 2», що експресує ген *desA::licBM3*.

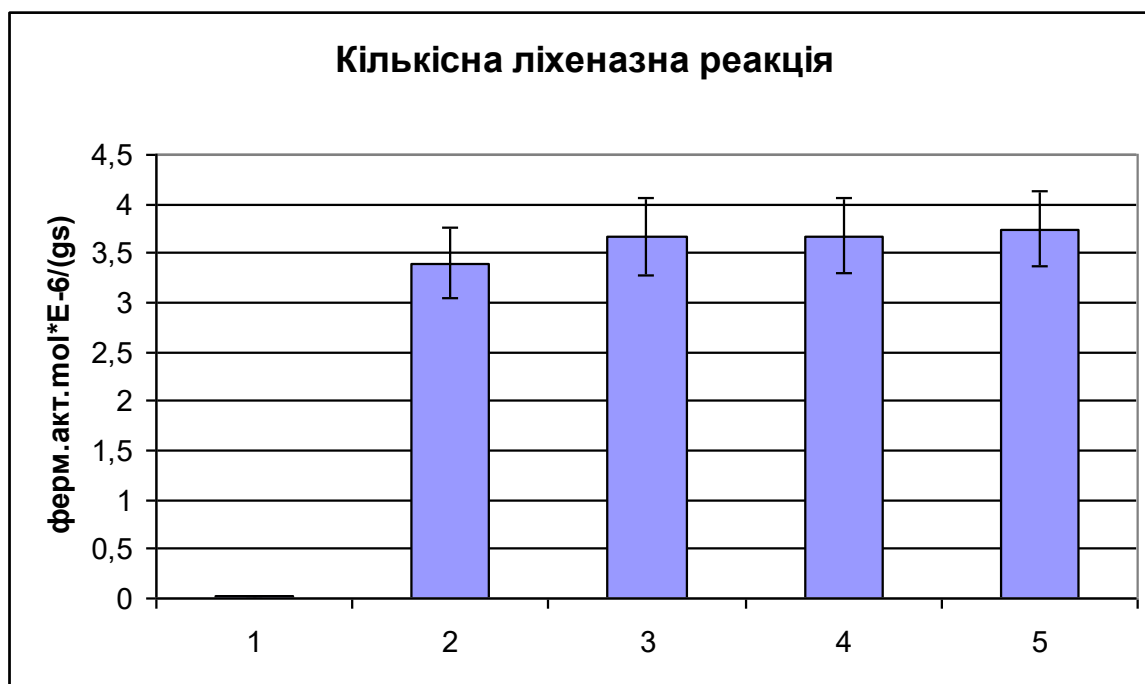


Рис.3.52. Кількісна ліхеназна реакція 1 – контрольна рослина *S. tuberosum*; 2 – картопля сорту “Слов’янка” лінія №1, що експресує ген *desA::licBM3*; 3 – картопля сорту “Серпанок” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*; 4 – картопля сорту “Лугівська” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*; 5 – картопля сорту “Незабудка” лінія №7, що експресує ген *desA::licBM3*.

З отриманих рослин відбирали матеріал та проводили аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл.3.5.). Виявили збільшення частки лінолевої кислоти у всіх трансгенних лініях.

Таблиця 3.5. Аналіз спектру ЖК рослин картоплі(мол. % $\pm$ SD)

Рослина	C16:0	C16:1	C18:0	C18:2	C18:3
Контроль <i>S. tuberosum</i>	31,6 $\pm$ 2,8	3,7 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,3	28,5 $\pm$ 3,6	46,9 $\pm$ 5,2
Сорт Лугівська1 (<i>desA::licBM3</i>)	31,2 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,09	35,2 $\pm$ 2,2	40,5 $\pm$ 1,5
Сорт Слов’янка1 (<i>desA::licBM3</i>)	27,6 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,04	3,1 $\pm$ 0,05	32,06 $\pm$ 0,4	26,3 $\pm$ 0,2
Сорт Серпанок1 (<i>desA::licBM3</i>)	35 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,04	40,5 $\pm$ 0,7	41,4 $\pm$ 1,7

Разом зі збільшенням частки лінолевої кислоти було досліджено зменшення частки пальмітинової та пальмітоолеїнових кислот, це пояснюється тим, що вони було використанні в якості субстрату в ланцюгу перетворень для накопичення C 18:2 ненасиченої кислоти.

3.6.1. Аналіз рослин *Solanum tuberosum*, що експресують гібридний ген *desA::licBM3* в умовах осмотичного стресу

Глобальні зміни клімату і/та неузгоджене з довкіллям удобрення певними речовинами, сприяє підвищенню солоності ґрунту, що на даний час охоплює 45 мільйонів гектарів зрошуваних земель. Сольовий стрес знижує врожайність та характеризується накопиченням катіонів (Na^+ , K^+ , Mg_2Ca_2) і аніонів (Cl^- , SO_2HCO_2), що утворюються з водорозчинних солей, таких як Na_2SO_4 , NaHCO_3 , MgCl_2 , а також менш водорозчинних солей, таких як CaSO_4 , MgSO_4 , CaCO_3 . Також солі накопичуються в результаті таких факторів, як ерозія мінералів і зрошення сільськогосподарських культур мінералізованою, або морською водою [54].

Високі концентрації солей в ґрунті викликають гіпераніонний і гіперосмотичної стреси у внутрішньоклітинному середовищі. На початкових стадіях сольового стресу висока концентрація розчиненої речовини зменшує потенціал клітинної води, що в кінцевому підсумку призводить до втрати тургору і плеiotропних фізіологічних реакцій, включаючи закриття устичок, інгібування росту, зниження фертильності пилку, пригнічення фотосинтетичної ферментативної активності, накопичення сахарози [61].

Довгостроковий сольовий стрес призводить до гіперакумуляції Na^+ , що впливає на зниження ферментативної активності, збільшення H_2O_2 і перекисного окислення ліпідів, що в кінцевому підсумку призводить до старіння та загибелі листя [137].

У нормальних умовах цитозоль містить 100-200 мМ K^+ і 1-10 мМ Na^+ [175]. Надлишок NaCl є найбільш частою причиною сольового стресу у рослин і викликає перенакопичення Na^+ і Cl^- та виснаження іонів K^+ в клітині. Цей дисбаланс у співвідношенні $\text{Na}^+:\text{K}^+$ є результатом конкуренції між іонами для транспорту в клітину і, як вважають, викликає шкідливі зміни осмотичного потенціалу, обмеженості поживних речовин і іонної токсичності.

Рослини протидіють цим ефектам, використовуючи кілька стратегій, які включають виробництво осмолітов, таких як розчинні цукри, органічні кислоти, вільні амінокислоти, і накопичення іонів калію, обмеження поглинання Na^+ в коренях і листі, зміна структури мембран, індукування антиоксидативних ферментів і зменшення провідності устичок. Крім того, рослинні клітини швидко накопичують активні форми кисню (АФК) у відповідь на сольові та інші стреси [176].

В даний час в умовах вирощування рослин на полях у південних областях поля картоплі потерпають від умов посухи спричиненої дією високих температур. Тому, попередньо було визначено актуальність дослідження трансгенних сортів картоплі української селекції, що експресують ген десатурази в умовах осмотичного стресу.

Контрольні та отримані трансгенні рослини висаджували на середовище MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ, а також на стандартне середовище MS (нормальні фізіологічні умови).

Вирощували дані рослини протягом двох місяців та аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза, рівень накопичення малонового діальдегіду та, опосередковано, рівень експресії генів десатураз за репортерним білком термостабільної ліхенази. Слід зазначити, що фенотипових відмінностей між контрольними та досліджуваними рослинами не було відмічено.

Дослідження активності ферменту СОД показало підвищення активності даного ферменту при культивуванні рослин на стандартному середовищі MS у контрольних не трансгенних рослин (рис.3.53).

При вирощуванні рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ виявили підвищення активності СОД у всіх досліджуваних рослин. При культивуванні картоплі на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ виявили підвищення активності даного ферменту у ліній рослин сортів “Серпанок” лінія №2, “Лугівська”

лінія №2 та “Незабудка” лінія №7. Лінія картоплі сорту “Слов’янка” лінія №1 не мала відмінностей показників СОД з контрольними рослинами.

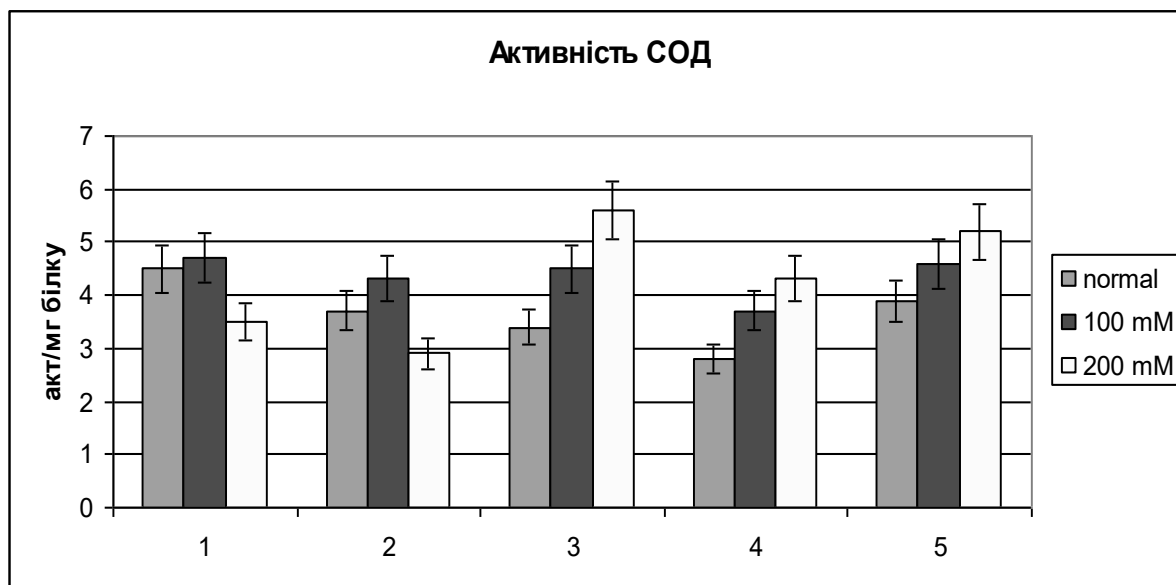


Рис.3.53. Дослідження активності СОД рослин картоплі:

- 1 – контрольна рослина *S. tuberosum*;
- 2 – картопля сорту “Слов’янка” лінія №1, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 3 – картопля сорту “Серпанок” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 4 – картопля сорту “Лугівська” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 5 – картопля сорту “Незабудка” лінія №7, що експресує ген *desA::licBM3*.

Рівень накопичення малонового діальдегіду перевіряли, як показника окисної деструкції клітин (рис. 3.54).

При культивуванні рослин на стандартному середовищі MS, рівень накопичення МДА у всіх рослин не мав суттєвих відмінностей. Дослідження картоплі після культивування на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ показало статистично достовірне підвищення накопичення МДА у рослин сорту “Слов’янка”. Аналіз рослин після культивування на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 200 мМ показав, що найбільше МДА утворилося у рослин сорту “Слов’янка” та контрольних рослин. Найменший рівень накопичення МДА спостерігали у ліній сортів “Серпанок”, “Незабудка” та “Лугівська”.

Дослідження експресії генів десатураз за активністю репортерного білка можна лише опосередковано. Ліхеназа є білком однієї субодиниці та має кілька структурних доменів. Для того, щоб поліпшити експресію даного

білка в злитті з білками-мішенями, послідовність *licV* було модифіковано. Даному *licBM3* білку не вистачає 31 N-терміналу та 71 С-кінцевих залишків показує високу активність та термостабільність. Цей варіант позбавлений клітиннозв'язуючого домена та краще підходить для гетерологічної експресії в злитті з іншими послідовностями, ніж повнорозмірний фермент [189].



Рис. 3.54. Дослідження рівня накопичення малонового діальдегіду після дії стресу знижених температур:

- 1 – контрольна рослина *S. tuberosum*;
- 2 – картопля сорту “Слов’янка” лінія №1, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 3 – картопля сорту “Серпанок” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 4 – картопля сорту “Лугівська” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 5 – картопля сорту “Незабудка” лінія №7, що експресує ген *desA::licBM3*.

В даному дослідженні активність ліхенази за нормальних фізіологічних умов у трансгенних рослин не відрізнялась. Оскільки рослини картоплі містять багато протеаз у контрольних рослин теж була відмічена незначна активність, проте, її показники менше 0,5.

При культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентрації 100 мМ не було виявлено достовірних відмінностей між трансгенними сортами, проте, було досліджено незначне підвищення активності. Після культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням

манітолу у концентрації 200 мМ виявили підвищення ліхеназної активності у трансгенних рослин сортів “Серпанок”, “Незабудка” та “Лугівська” (3.55).

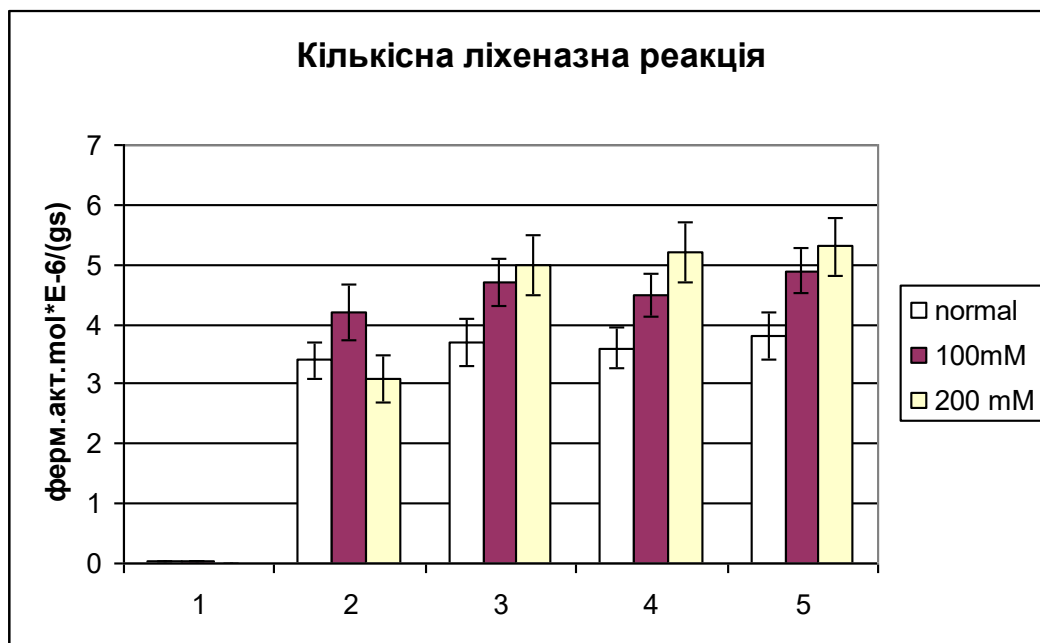


Рис. 3.55. Аналіз активності ліхенази:

- 1 – контрольна рослина *S. tuberosum*;
- 2 – картопля сорту “Слов’янка” лінія №1, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 3 – картопля сорту “Серпанок” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 4 – картопля сорту “Лугівська” лінія №2, що експресує ген *desA::licBM3*;
- 5 – картопля сорту “Незабудка” лінія №7, що експресує ген *desA::licBM3*.

При культивуванні рослин на середовищі МС з додаванням 200 мМ манітолу відзначали збільшення експресії генів десатураз за репортерним білком у ліній № 2 сорту “Серпанок”, №2 сорту “Лугівська”, №7 сорту “Незабудка”, проте, у рослин картоплі сорту “Слов’янка” лінія №1 не було виявлено підвищення експресії. Дані результати вказують на те, що здатність трансгенних рослин адаптуватись однакова у всіх рослин на середовищі MS з додаванням 100 мМ манітолу, проте, адаптація рослин до осмотичного стресу при вирощуванні на середовищі MS з додаванням 200 мМ манітолу не однакова. Лінія сорту “Слов’янка 1” відрізняється зниженою адаптацією при підвищеному осмотичному стресі.

3.7. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Dendrobium linguella*, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*

Представників роду орхідних, завдяки наявності досконалої форми квітки, широко використовують в оформленні інтер'єрів. В умовах енергетичної кризи підвищення холодостійкості рослин дозволить знизити температуру культивування даних рослин у приміщеннях [223].

Створення орхідей, які будуть стійкими до низьких температур та заморозків є досить актуальним завданням. Стійкість рослин залежить від жирнокислотного складу їх мембран [5]. Експресія генів десатураз дозволяє змінити спектр жирних кислот мембранних ліпідів [86]. У вищих рослин синтез ненасичених C-16 і C-18 жирних кислот починається з введення подвійного зв'язку в позиції $\Delta 9$ і локалізується в пластидах, хоча існують повідомлення про клонування генів ацил-ліпідних $\Delta 9$ -десатураз ймовірно не пластидної локалізації [89]. Наступні реакції десатурації можуть відбуватися або в пластидах, або в ендоплазматичному ретикулюмі [90].

Оскільки, саме біосинтез мононенасичених жирних кислот грає ключову роль у зміні спектра мембранних ліпідів, забезпечуючи субстрат для подальшої десатурації, можна припустити, що дана реакція визначає і адаптацію клітин до холодового стресу [93].

В даній роботі було використано ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* [11]. З метою вивчення механізмів біосинтезу жирних кислот і отримання холодостійких рослин була проведена генетична трансформація *D. linguella* – популярного для оранжерейного і кімнатного вирощування виду, що відноситься до сімейства орхідних (*Orchidaceae*) вектором на основі pBISN (з селективним геном *bar*) під контролем 35S промотора (рис 3.57.). Наявність вставки перенесених генів було доведено методом мультиплексної ПЛР (рис 3.58.).

Використання експресійно-репортерної системи, що забезпечує злиття гена десатурази в одній рамці зчитування з геном репортерного білка термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* (*licBM3*) [189], дозволило відібрати лінії, в яких відбувається експресія цільового гена. Для того, щоб

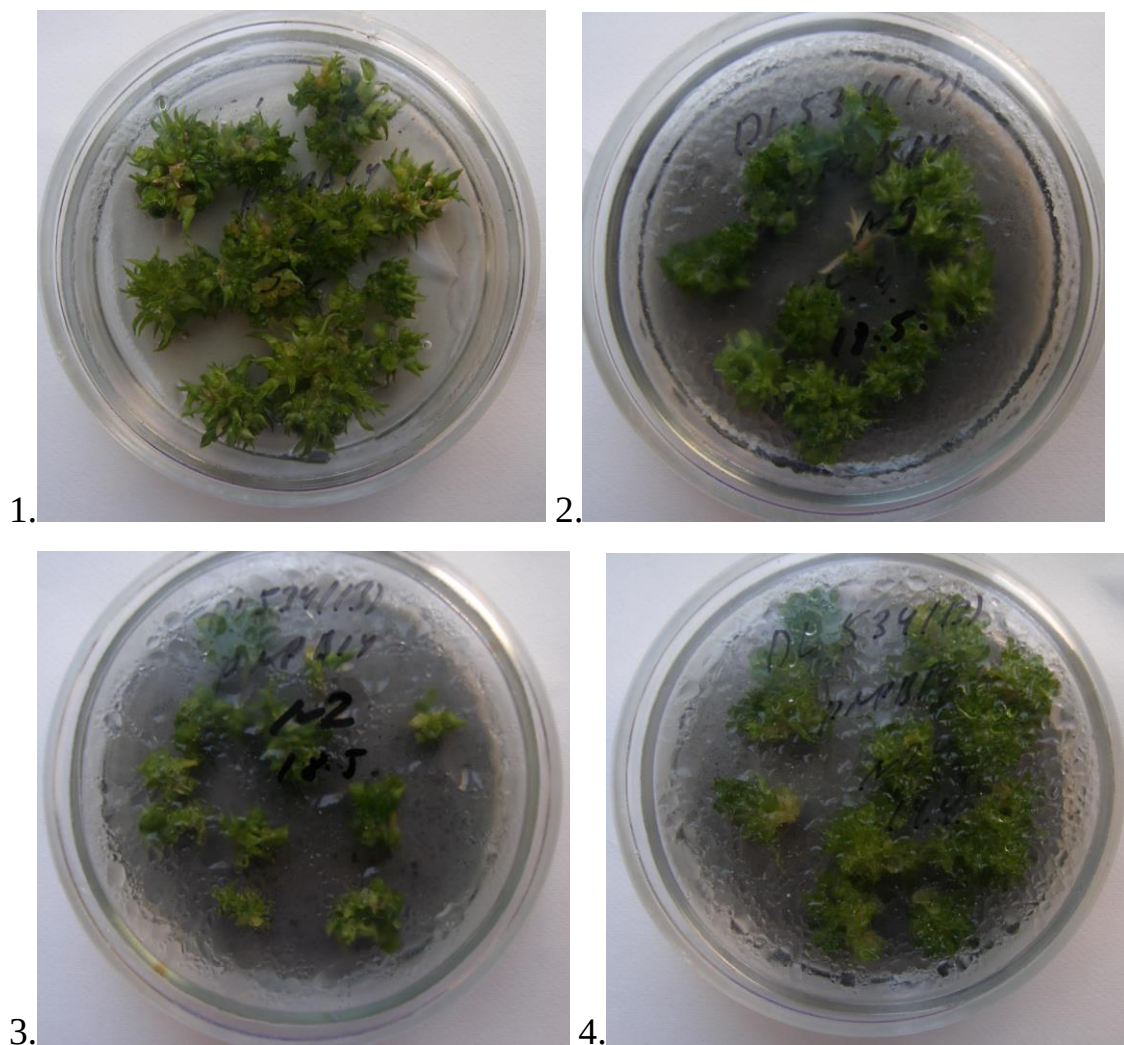


Рис. 3.57. Рослини, що використовувались в роботі.:

- 1 – досліджувана лінія №3;
- 2 – досліджувана лінія №9;
- 3– досліджувана лінія №2;
- 4– досліджувана лінія №24.

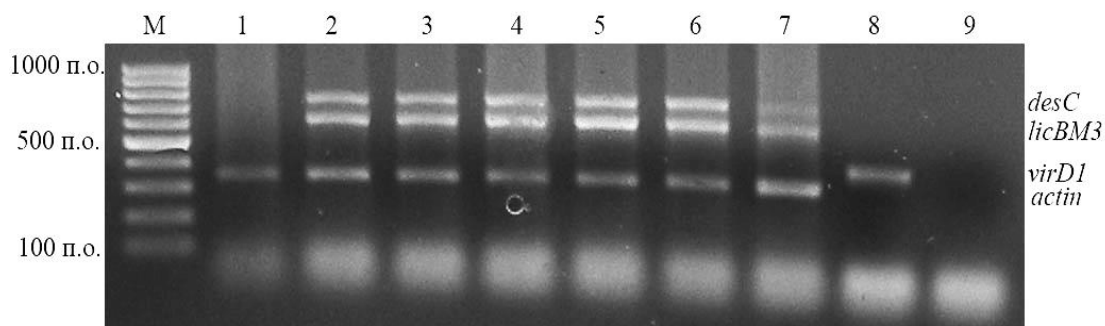


Рис. 3.58. Результати МПЛР з ДНК орхідей DL534(13), які були трансформовані рNPB14, з використанням чотирьох пар праймерів (специфічних до *desC*, *licBM3*, *virD1* та актина). 1 – ДНК не трансформованої орхідеї; 2-6 - ДНК орхідей, трансформованих рNPB14; 7 - ДНК *Nicotiana tabacum*, трансформованої рNPB14; 8 – ДНК *Agrobacterium tumefaciens*

Використання експресійно-репортерної системи, що забезпечує злиття гена десатурази в одній рамці зчитування з геном репортерного білка термостабільної ліхенази *C. thermocellum* (licBM3) [188], дозволило відібрати лінії, в яких відбувається експресія цільового гена.

Для того, щоб проаналізувати активність ферментів ліхенази використовували якісну та кількісну ліхеназні реакції (рис 3.59).

Таким чином було підтверджено експресію злитого гена та визначено рівень активності ферментів. Для подальшої роботи відбирали лінії отриманих трансгенних рослин, які відрізнялись підвищеним рівнем ліхеназної активності.

Аналіз спектру жирних кислот проводили методом газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл. 3.5.).

У відібраних лініях виявили зменшення частки насиченої пальмітинової кислоти та збільшення частки ненасиченої C18:3 ліноленової кислоти, що свідчить про фізіологічну активність гетерологічної десатурази в клітинах орхідей.

Отриманим трансгеним рослинам було проведено аналіз жирних

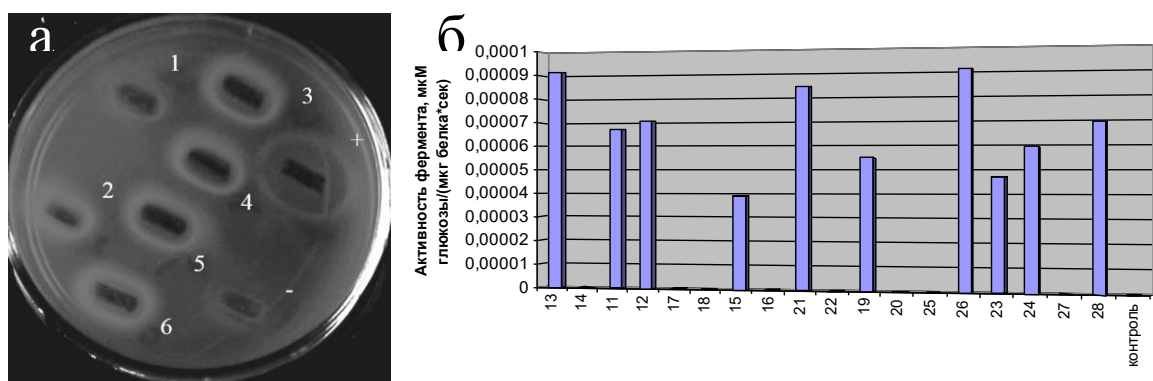


Рис. 3.59 Результати якісної (а) та кількісної (б) реакції активності термостабільної ліхенази у відселектованих лініях рослин. а) 1 – екстракт контрольної (не трансгенної) рослини *D. linguella*; 2-6) екстракт ліній рослин відібраних після трансформації рослин; "+" – *N. tabacum*, що експресує ген термостабільної ліхенази; "-" – буфер для екстракції. Світлі ділянки навколо лунок на чашці свідчать про гідроліз ліхенану. б) На графіку показана активність термостабільної ліхенази у трансгенних лініях *D. linguella*, що визначається по кількості звільненого із субстрату (ліхенан) глюкози на 1 мг суммарних розчинних білків за 1 секунду. "Контроль" – екстракт контрольної (не трансгенної) рослини *D. linguella*.

кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії. У двох трансгенних лініях (№1 та №2) було відмічено появу в складі мембранних ліпідів частку C19:0 (нондеканова кислота). У ліній №9 та №4 було відмічено збільшення частки ліноленової кислоти, що відповідає отриманим результатам попередніх дослідників [216]. Лінія №3, у якої було підтверджено наявність вставки гена та активності ферменту десатурази, не мала достовірних змін у спектрі ЖК.

Таблиця 3.6. Аналіз жирних кислот рослин орхідей, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*

Лінії рослин	C 16:0	C 18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C19:0
<i>D. linguella</i>	24,4±1,3	5,8±0,36	2,7±0,18	15,8±2,4	13,4±2,06	0
<i>D. linguella</i> (<i>gfp::licBM3</i>)	30,9 ±0,9	8,4±0,3	6,6±0,25	26,01±1,8	10,3±0,91	0
<i>D. linguella</i> (<i>desC::licBM3</i>)№1	28,5±1,99	23,8±1,7	6,28±0,73	20,8±1,29	14,6±1,26	7 ±2,1
<i>D. linguella</i> (<i>desC::licBM3</i>)№2	25,99±0,4	8,7±0,5	4,9±0,3	16,07±0,5	16,7±0,98	6,2±0,4
<i>D. linguella</i> (<i>desC::licBM3</i>)№3	25,2±0,8	6,8±0,3	5,6±0,5	22,9±2,8	10,3±1,5	0
<i>D. linguella</i> (<i>desC::licBM3</i>)№9	25,2±0,6	7,3±0,2	4,8±0,3	13,1±0,5	16,3±1,1	0
<i>D. linguella</i> (<i>desC::licBM3</i>)№24	23,4±0,9	7,9±0,6	4,6±0,3	11,1±0,3	14,7±1,2	0

3.7.1. Аналіз рослин *Dendrobium linguella*, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3* в умовах знижених температур.

Для того, щоб дослідити отримані рослини на стійкість до холодового стресу підібрали умови: 20 днів у холодильній камері при температурі 0°C, освітленості 8 год (7.00 – 19.00), вологості 50-60%.

Перевіряли активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень експресії генів за репортерним білком та рівень накопичення малонового діальдегіду під час дії холодового стресу першого дня, на четвертий день, на одинадцятий день, на чотирнадцятий день та на двадцятий день.

Досліджуючи показники ферменту СОД виявили збільшення активності у контрольних не трансгенних рослин на одинадцятий та двадцятий дні (рис 3.60.).

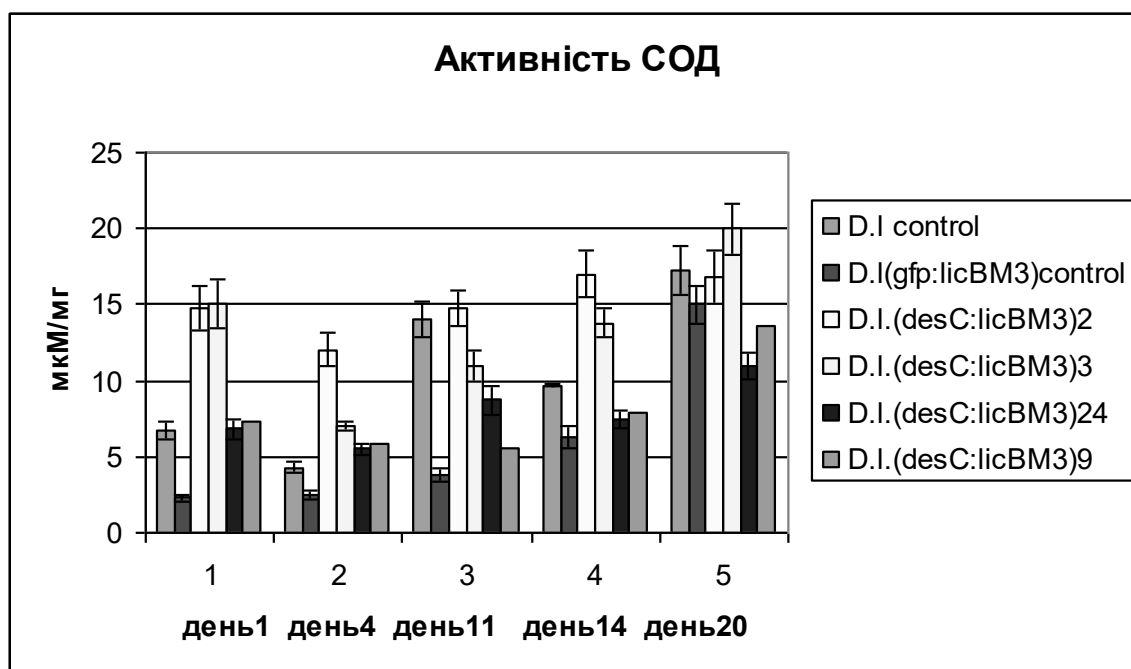


Рис.3.60. Дослідження активності ферменту супероксиддисмутаза:
D.l. control – не трансгенна рослина *D. linguella*, використовувались як контроль;
D.l. (gfp::licBM3) control – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *gfp::licBM3* використовувалась як контроль; *D.l. (desC::licBM3)2* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №2; *D.l. (desC::licBM3)3* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №3; *D.l. (desC::licBM3)24* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №24; *D.l. (desC::licBM3)9* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №9.

Контрольні трансгенні рослини відрізнялись найменшим рівнем активності СОД протягом всього експерименту за винятком показників двадцятого дня (дослідили підвищення активності). Лінія №2 – дослідили підвищення активності СОД протягом всього експерименту за винятком двадцятого дня – незначне зниження. Лінія №3, в якій не відмічали суттєвих змін у спектрі ЖК, показала підвищення активності ферменту першого та на двадцятий дні. Лінії №24 та №9 в яких були подібні результати аналізу ЖК не відрізнялись підвищеною активністю досліджуваного ферменту, спостерігали незначне підвищення на двадцятий день.

За показниками накопичення МДА досліджують ступінь окисної деструкції [136], найвищий рівень накопичення МДА відмічали у контрольних рослин, це може пояснювати підвищення активності ферменту СОД, який утворюється у відповідь на збільшення оксидних радикалів (рис.3.61).

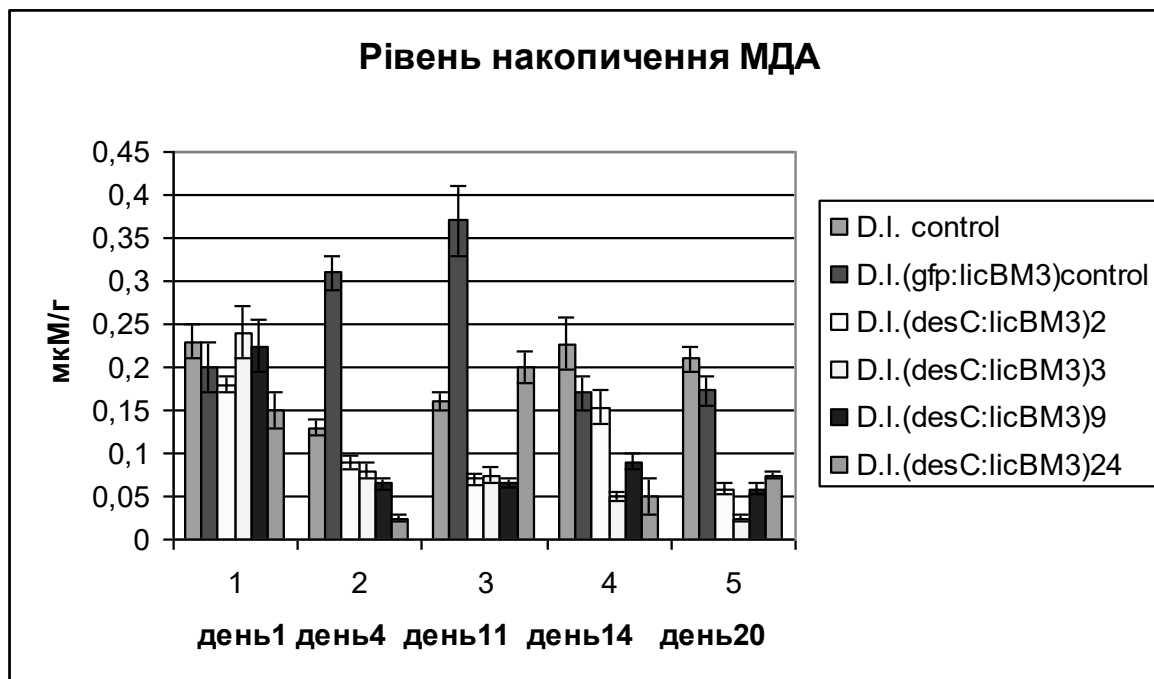


Рис.3.61 Аналіз рівня накопичення малонового диальдегіду:

D.l. control – не трансгенна рослина *D. linguella*, використовувались як контроль;
D.l. (gfp::licBM3) control – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *gfp::licBM3* використовувалась як контроль; *D.l. (desC::licBM3)2* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №2; *D.l. (desC::licBM3)3* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №3; *D.l. (desC::licBM3)24* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №24; *D.l. (desC::licBM3)9* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №9.

У рослин, що експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази було відмічено тенденцію до зниження утворення МДА протягом всього експерименту.

Для опосередкованого визначення рівня експресії генів використовували кількісну ліхеназну реакцію (рис 3.62.).

Протягом експерименту було відмічено підвищену активність першого дня та третього у рослин орхідей, що експресують ген десатурази ціанобактерії. Трансгенний контроль незначне підвищення активності ферменту ліхенази на одинадцятий день та на двадцятий день експерименту, проте, ці дані не були достовірними.

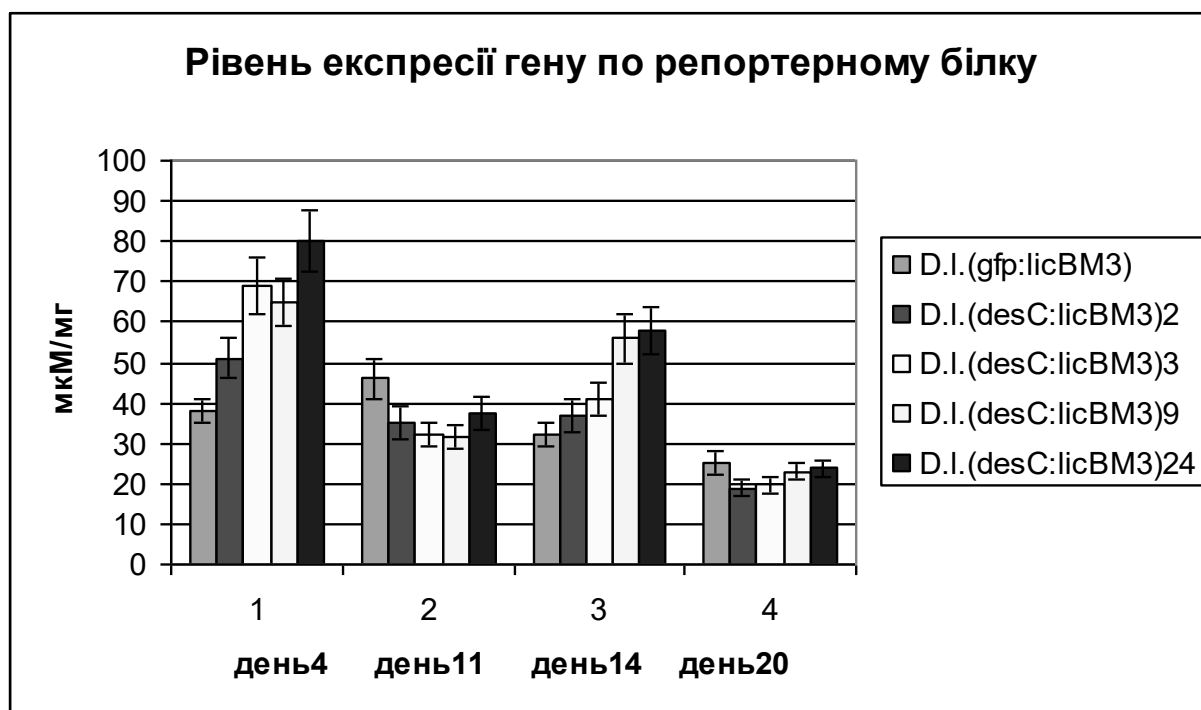


Рис.3.62. Порівняльна характеристика експресії генів за репортерним білком термостабільної ліхенази: *D.l. control* – не трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, використовувались як контроль; *D.l. (gfp::licBM3) control* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *gfp::licBM3* використовувалась як контроль; *D.l. (desC::licBM3)2* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №2; *D.l. (desC::licBM3)3* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №3; *D.l. (desC::licBM3)24* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №24; *D.l. (desC::licBM3)9* – трансгенна рослина *Dendrobium linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №9.

Зміни в спектрі жирних кислот є результатом експресії перенесеного гена десатурази ціанобактерії. Проте, експресія генів під промотором 35S в однодольних рослин може спричиняти не такі передбачувані результати, як у дводольних.

Досліджуючи адаптацію рослин орхідей до стресу знижених температур було виявлено підвищення активності ферменту супероксиддисмутази, менший рівень накопичення малонового діальдегіду у рослин, що експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази порівняно з контрольними рослинами. Щодо експресії генів десатураз то її перевіряли за допомогою репортерного гену термостабільної ліхенази кількісним методом, було виявлено підвищення експресії генів десатураз на 4 та 14 дні порівняно з трансгенним контролем це пояснює також підвищення активності ферменту СОД в цей же період, оскільки реакція десатурації, як і активність СОД

посилюється у відповідь на підвищення концентрації кисневих радикалів у клітинах.

Це пояснює результати по визначенню накопичення МДА: на четвертий день та чотирнадцятий день дослідили зниження даної речовини порівняно з контролем.

Можна підсумувати результати, що експресія гену десатурази сприяє стійкості рослин орхідеї до стресу знижених температур.

ВИСНОВКИ

Експресія десатураз ціанобактерій у вищих рослинах дозволяє змінювати спектр жирних кислот та збільшувати частки ненасичених ЖК у складі мембранних ліпідів, що забезпечує підвищення адаптаційної функції мембран до осмотичного та температурного стресів.

1. Отримані трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що експресують гібридні гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3*, характеризуються кращою адаптацією до дії високих та знижених температур, а також заморозків та осмотичного стресу за показниками рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза, втрати електролітів.
2. Трансгенні рослини тютюну, які експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 під контролем холодоіндукованого промотора CBF1, характеризуються підвищеною стійкістю до холодового стресу порівняно з контрольними рослинами за показниками рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза, втрати електролітів.
3. Подвійні трансформанти рослин тютюну *N. tabacum*, що одночасно експресують два гени десатураз (*desA* та *desC*) характеризуються збільшенням частки ненасичених жирних кислот порівняно з трансформантами, які містять у своєму геномі та експресують лише ген *desA* або ген *desC*.
4. Трансгенні рослини орхідеї *D. linguella*, що містять у своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *S. vulcanus*, характеризуються збільшенням частки ненасичених жирних кислот та підвищеною стійкістю до стресу знижених температур за показниками рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза, рівня втрати електролітів.

5. Збільшення частки ненасичених ЖК у рослин картоплі *S. tuberosum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA::licBM3*, призводить до підвищення адаптації до дії осмотичного стресу порівняно з контрольними рослинами.
6. Виявлено, що успадкування злитих генів *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3* внаслідок процесів рекомбінації та кросинговеру не завжди відбувається повністю.

Література

1. Дідух, Я. "Екологічні аспекти глобальних змін клімату: причини, наслідки, дії." *Вісник Національної академії наук України* 2 (2009): 34-44.
2. Rieu I., David T., and Nurit F. "Pollen Development at High Temperature: From Acclimation to Collapse." *Plant Physiology* 173.4 (2017): 1967-1976.
3. Блюм, Я., та інші "Нова хвиля хвиля зеленої революції: перспективи застосування в Україні досягнень молекулярної біотехнології та геноміки." *Вісник Національної академії наук України* 3 (2006): 21-31.
4. Murakami, Yuuki, et al. "Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature." *Science* 287.5452 (2000): 476-479.
5. Лось Д. А. "Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений." *Вестник Российской академии наук* 75.4 (2005): 338-345.
6. Миронов, К. С., и др. "Обратная связь между текучестью мембран и транскрипцией гена *desB*, кодирующего 3-десатуразу жирных кислот у цианобактерии *Synechocystis*." *Молекулярная биология* 46.1 (2012): 147-147.
7. Лось, Д. А. "Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот." *Успехи биологической химии* 41 (2001): 163-198.
8. Bredow M., Vanderbeld B., and Walker V. "Ice - binding proteins confer freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*." *Plant Biotechnology Journal* 15.1 (2017): 68-81.
9. Лось, Д. А. "Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений." *Вестник Российской академии наук* 75.4 (2005): 338-345.
- 10.. Кирпа Т. М., и др. "Экспрессия в *Nicotiana tabacum* генов ацил-липидных десатураз цианобактерий без сигналов транспорта в хлоропласты". // Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада, (2012):267-268

11. Кирпа Т. Н., и др. "Особенности жирнокислотного состава мембранных липидов растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гены дельта-9- и дельта-12-ацил-липидных десатураз цианобактерий". Тезисы матер. 17-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", 21 – 26 апреля, (2013): 339.
12. Гра О.А., и др. "Экспрессия гетерологических генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам". Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых Петрозаводск: Карельский научный центр РАН (2015): 143.
13. Ntambi J., et al. "Regulation And Function Of Fatty Acid Desaturases." *The FASEB Journal* 30.1 Supplement (2016): 504.
14. Mahajan, Shilpi, and Narendra Tuteja. "Cold, salinity and drought stresses: an overview." *Archives of biochemistry and biophysics* 444.2 (2005): 139-158.
15. Thakur, Prince, et al. "Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview." *Environmental and Experimental Botany* 67.3 (2010): 429-443.
16. Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja. "Polyamines and abiotic stress tolerance in plants." *Plant signaling & behavior* 5.1 (2010): 26-33.
17. Medina, Joaquín, Rafael Catalá, and Julio Salinas. "The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate." *Plant Science* 180.1 (2011): 3-11.
18. Fay, Laura, and Xianming Shi. "Environmental impacts of chemicals for snow and ice control: state of the knowledge." *Water, Air, & Soil Pollution* 223.5 (2012): 2751-2770.
19. Storlien, Leonard H., et al. "Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and ω -3 fatty acids in muscle phospholipid." *Diabetes* 40.2 (1991): 280-289.

20. Monroig O., et al. "Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in octopus vulgaris: molecular cloning and functional characterisation of a stearyl-CoA desaturase and an elongation of very long-chain fatty acid 4 protein." *Marine Drugs* 15.3 (2017): 82.
21. Manni A., et al. "Stearyl-CoA desaturase-1, a novel target of omega-3 fatty acids for reducing breast cancer risk in obese postmenopausal women." *European Journal of Clinical Nutrition* (2017): 45-74.
22. Zhang, Zhe. "Use of chlorine dioxide for Legionella control in hospital water systems". Diss. University of Pittsburgh. (2007): 143
23. Лось Д. А. "Десатуразы жирных кислот." *Научный мир, М* (2014): 465.
24. Kreps Joel A., et al. "Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress." *Plant physiology* 130.4 (2002): 2129-2141.
25. Chinnusamy V., and Zhu J.-K. "Epigenetic regulation of stress responses in plants." *Current opinion in plant biology* 12.2 (2009): 133-139.
26. Heinz, Ernst, et al. "Plants expressing $\Delta 6$ -desaturase genes and oils from these plants containing PUFAS and method for producing unsaturated fatty acids." U.S. Patent No. 9,611,441. 4 Apr. 2017.
27. Lau, Cher Chien, et al. "Effects of disrupted omega-3 desaturase gene construct on fatty acid composition and expression of four fatty acid biosynthetic genes in transgenic *Chlorella vulgaris*." *Algal Research* 26 (2017): 143-152.
28. Schubert, Hendrik, et al. "Physiological adaptations." *Biological Oceanography of the Baltic Sea*. Springer Netherlands, (2017): 255-278.
29. Prasad, PV Vara, R. Bheemanahalli, and SV Krishna Jagadish. "Field crops and the fear of heat stress—Opportunities, challenges and future directions." *Field Crops Research* 200 (2017): 114-121.
30. Ramírez, Jorge Isaac Sarquís, and Ratikanta Maiti. "Research Trends in Abiotic Stress Resistance of Crops." *Bioresource and Stress Management*. Springer Singapore, 2016. 131-163.
31. Kaur, Harmeet, Bhanu Prakash Petla, and Manoj Majee. "Small Heat Shock Proteins: Roles in Development, Desiccation Tolerance and Seed Longevity."

- Heat Shock Proteins and Plants*. Springer International Publishing, (2016):3-18.
32. Singh, Vijaya, et al. "Genotypic differences in effects of short episodes of high-temperature stress during reproductive development in sorghum." *Crop Science* 56.4 (2016): 1561-1572.
 33. Feder M. E., and Hofmann G. E. "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annual review of physiology* 61.1 (1999): 243-282.
 34. Jarvis P., and McNaughton K. G.. "Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region." *Advances in ecological research* 15 (1986): 1-49.
 35. Ahmed Shakeel, et al. "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise." *Journal of advanced research* 7.1 (2016): 17-28.
 36. Parrotta Luigi, et al. "Heat stress affects the cytoskeleton and the delivery of sucrose synthase in tobacco pollen tubes." *Planta* 243.1 (2016): 43-63.
 37. Zhang, C. X., et al. "Heat stress effects are stronger on spikelets than on flag leaves in rice due to differences in dissipation capacity." *Journal of Agronomy and Crop Science* 202.5 (2016): 394-408.
 38. Yadav, A. K., et al. "Heat Tolerance in Pearl Millet: A Review." *Forage Research* 42.2 (2016): 65-81.
 39. Gerganova M., et al. "Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately." *Plant Physiology and Biochemistry* 104 (2016): 234-241.
 40. Calanca P., "Effects of Abiotic Stress in Crop Production." *Quantification of Climate Variability, Adaptation and Mitigation for Agricultural Sustainability*. Springer International Publishing (2017):165-180.
 41. Killi D., et al. "Adaptation to high temperature mitigates the impact of water deficit during combined heat and drought stress in C3 sunflower and C4 maize varieties with contrasting drought tolerance." *Physiologia plantarum* 159.2 (2017): 130-147.

42. Zandalinas S., et al. "Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels". *BMC plant biology* 16.1 (2016): 105-112
43. Xu, Wen, et al. "Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants." *Journal of pineal research* 61.4 (2016): 457-469.
44. Ré, Martín D., et al. "Small heat shock proteins and the postharvest chilling tolerance of tomato fruit." *Physiologia plantarum* 159.2 (2017): 148-160.
45. Waters E. R., Lee G. J., and Vierling E. "Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants." *Journal of Experimental Botany* 47.3 (1996): 325-338.
46. Zandalinas, Sara I., et al. "ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress." *Journal of experimental botany* 67.18 (2016): 5381-5390.
47. Maruyama, Kyonoshin, et al. "Design of an optimal promoter involved in the heat - induced transcriptional pathway in Arabidopsis, soybean, rice and maize." *The Plant Journal* 89.4 (2017): 671-680.
48. Al-Whaibi, Mohamed H. "Plant heat-shock proteins: a mini review." *Journal of King Saud University-Science* 23.2 (2011): 139-150.
49. Imtiaz M., et al. "Interactive effects of vanadium and phosphorus on their uptake, growth and heat shock proteins in chickpea genotypes under hydroponic conditions." *Environmental and Experimental Botany* 134 (2017): 72-81.
50. Gren Ing-Marie. "The value of investing in wetlands for nitrogen abatement." *European Review of Agricultural Economics* 22.2 (1995): 157-172.
51. Faik, A., A. V. Popova, and M. Velitchkova. "Effects of long-term action of high temperature and high light on the activity and energy interaction of both photosystems in tomato plants." *Photosynthetica* 54.4 (2016): 611-619.

52. Le Maitre, David C., Ilse M. Kotzee, and Patrick J. O'Farrell. "Impacts of land-cover change on the water flow regulation ecosystem service: Invasive alien plants, fire and their policy implications." *Land Use Policy* 36 (2014): 171-181.
53. Kukowski, Kelly R., Susanne Schwinning, and Benjamin F. Schwartz. "Hydraulic responses to extreme drought conditions in three co-dominant tree species in shallow soil over bedrock." *Oecologia* 171.4 (2013): 819-830.
54. Liu, Lijun, et al. "Combination of site-specific nitrogen management and alternate wetting and drying irrigation increases grain yield and nitrogen and water use efficiency in super rice." *Field crops research* 154 (2013): 226-235.
55. Merli, Maria Clara, et al. "Water use efficiency in Sangiovese grapes (*Vitis vinifera* L.) subjected to water stress before veraison: different levels of assessment lead to different conclusions." *Functional plant biology* 42.2 (2015): 198-208.
56. Wang, Yufei, and Xiao Feng. "Heat integration across plants considering distance factor." *Advances in Energy Systems Engineering*. Springer International Publishing, 2017. 621-648.
57. Schmidt-Walter, Paul, et al. "Transpiration and water use strategies of a young and a full-grown short rotation coppice differing in canopy cover and leaf area." *Agricultural and forest meteorology* 195 (2014): 165-178.
58. Grimm, Eckhard, and Moritz Knoche. "Sweet cherry skin has a less negative osmotic potential than the flesh." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140.5 (2015): 472-479.
59. Nicol, Alexander, et al. "Uptake, Distribution, and Bioimaging Applications of Aggregation-Induced Emission Saponin Nanoparticles in *Arabidopsis thaliana*." *ACS Applied Materials & Interfaces* 9.34 (2017): 28298-28304.
60. Zhao, Xingchen, et al. "Distribution, Bioaccumulation, Trophic Transfer, and Influences of CeO₂ Nanoparticles in a Constructed Aquatic Food Web." *Environmental Science & Technology* 51.9 (2017): 5205-5214.

61. Rizwan M., et al. "Mechanisms of silicon-mediated alleviation of drought and salt stress in plants: a review." *Environmental Science and Pollution Research* 22.20 (2015): 15416-15431.
62. Feng, Wei, et al. "Growing out of stress: The role of cell-and organ-scale growth control in plant water-stress responses." *The Plant Cell* 28.8 (2016): 1769-1782.
63. Cogger, Craig, and Sally Brown. "Soil Formation and Nutrient Cycling." *Sowing Seeds in the City*. Springer Netherlands. (2016): 25-52.
64. Rabbani, Masoud, et al. "Biofuel supply chain considering depreciation cost of installed plants." *Journal of Industrial Engineering International* 12.2 (2016): 221-235.
65. Zhivet'ev M., et al. "Change of fatty-acid composition in plants during adaptation to hypothermia." *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 6.4 (2010): 51-65.
66. Box E. "World Bioclimatic Zonation." *Vegetation Structure and Function at Multiple Spatial, Temporal and Conceptual Scales*. Springer International Publishing. (2016): 3-52.
67. Sewelam N., Kazan K, and Schenk P. "Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road." *Frontiers in plant science* .(2016):187.
68. Himabindu, Yeduguri, et al. "Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes." *Environmental and Experimental Botany* .124. (2016): 39-63.
69. Chen M., Thelen J. "Acyl - lipid desaturase 1 primes cold acclimation response in Arabidopsis." *Physiologia plantarum* 158.1 (2016): 11-22.
70. Gibon, Yves, et al. "Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post - translational activation of ADP - glucose pyrophosphorylase in the following light period." *The Plant Journal* 39.6 (2004): 847-862.

71. Hu S., et al. "The antioxidation-related functional structure of plant communities: Understanding antioxidation at the plant community level." *Ecological Indicators*. 78 (2017): 98-107.
72. Calanca P. "Effects of Abiotic Stress in Crop Production." *Quantification of Climate Variability, Adaptation and Mitigation for Agricultural Sustainability*. Springer International Publishing (2017):165-180.
73. Feng, Wei, et al. "Growing Out of Stress: The Role of Cell-and Organ-Scale Growth Control in Plant Water-Stress Responses." *The Plant Cell* 28.8 (2016): 1769-1782.
74. Franco-Navarro, Juan D., et al. "Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants." *Journal of experimental botany* 67.3 (2016): 873-891.
75. Dambreville, Anaëlle, et al. "Phenotyping oilseed rape growth-related traits and their responses to water deficit: the disturbing pot size effect." *Functional Plant Biology* 44.1 (2017): 35-45.
76. Feng, Wei, et al. "Growing out of stress: the role of cell-and organ-scale growth control in plant water-stress responses." *The Plant Cell* 28.8 (2016): 1769-1782.
77. Pu, Cui-Xia, et al. "The rice receptor-like kinases dwarf and runtish spikelet1 and 2 repress cell death and affect sugar utilization during reproductive development." *The Plant Cell Online* 29.1 (2017): 70-89.
78. Aardema H., et al. "Cumulus cells protect the bovine oocyte against lipotoxicity by converting saturated into unsaturated fatty acids using stearyl-CoA-desaturase during in vitro maturation." *Animal Reproduction* 13.3 (2016): 632-632.
79. Menard G., et al. "Genome wide analysis of fatty acid desaturation and its response to temperature." *Plant Physiology* 173.3 (2017): 1594-1605.
80. Weng, Jing-Ke, et al. "Co-evolution of hormone metabolism and signaling networks expands plant adaptive plasticity." *Cell* 166.4 (2016): 881-893
81. Steingroewer, Julianne, et al. "Monitoring of plant cells and tissues in bioprocesses." *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems* (2017): 1-49.

82. Ruiz - Lopez, Noemi, et al. "Successful high - level accumulation of fish oil omega - 3 long - chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop." *The Plant Journal* 77.2 (2014): 198-208.
83. Troncoso-Ponce A., et al. "New insights on the organization and regulation of the fatty acid biosynthetic network in the model higher plant *Arabidopsis thaliana*." *Biochimie* 120 (2016): 3-8.
84. Shockey, Jay, et al. "Naturally occurring high oleic acid cottonseed oil: identification and functional analysis of a mutant allele of *Gossypium barbadense* fatty acid desaturase-2." *Planta* 245.3 (2017): 611-622.
85. Hernández L., Sicardo D., and Martínez-Rivas J. "Differential contribution of endoplasmic reticulum and chloroplast ω -3 fatty acid desaturase genes to the linolenic acid content of olive (*Olea europaea*) fruit." *Plant and Cell Physiology* 57.1 (2016): 138-151.
86. Angeloni, Patricia, et al. "Fatty acid composition of high oleic sunflower hybrids in a changing environment." *Field crops research* 202 (2017): 146-157.
87. Kaye, Yuval, et al. "Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous Δ 12 desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG." *Algal Research* 11 (2015): 387-398.
88. Sun R., et al. "Identification of a Δ 12 fatty acid desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) involved in the biosynthesis of linoleic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 591.1 (2016): 21-26.
89. Usher, Sarah, et al. "Field trial evaluation of the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Camelina sativa*: Making fish oil substitutes in plants." *Metabolic engineering communications* 2 (2015): 93-98.
90. Walley, Justin W., et al. "Fatty acids and early detection of pathogens." *Current opinion in plant biology* 16.4 (2013): 520-526.

91. Li D., et al. "Classification and substrate head-group specificity of membrane fatty acid desaturases." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14 (2016): 341-349.
92. Yang T., et al. " β -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthase I (KASI) Plays Crucial Roles in the Plant Growth and Fatty Acids Synthesis in Tobacco." *International Journal of Molecular Sciences* 17.8 (2016): 1287.
93. Кирпа-Несміян Т. М., та ін. "Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени Δ -9-і Δ -12-ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій". *Фактори експериментальної еволюції організмів* 17 (2015): 197-199
94. Кирпа-Несмиян Т.М., и др., "Растения картофеля *Solanum tuberosum* экспрессирующие ген Δ 12- ацил-липидной десатуразы цианобактерии". // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. 24(2016): 81-87.
95. Bai, Shuangyi, et al. "Directed evolution increases desaturation of a cyanobacterial fatty acid desaturase in eukaryotic expression systems." *Biotechnology and bioengineering* 113.7 (2016): 1522-1530.
96. Sedeek K., et al. "Amino Acid Change in an Orchid Desaturase Enables Mimicry of the Pollinator's Sex Pheromone". *Current Biology* 26.11 (2016): 1505-1511.
97. Zhao X., et al. "Genomic Analysis of Genes Involved in the Biosynthesis of Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in *Thraustochytrium* sp. 26185." *Lipids* 51.9 (2016): 1065-1075.
98. Shanklin, John, and Edgar B. Cahoon. "Desaturation and related modifications of fatty acids 1." *Annual review of plant biology* 49.1 (1998): 611-641.
99. Solomon, Edward I., et al. "Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes." *Chemical reviews* 100.1 (2000): 235-350.

100. Beld J., et al. "Probing fatty acid metabolism in bacteria, cyanobacteria, green microalgae and diatoms with natural and unnatural fatty acids." *Molecular BioSystems* 12.4 (2016): 1299-1312.
101. Nakamura, Manabu T., and Takayuki Y. Nara. "Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases." *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004): 345-376.
102. Marchive, Chlo  , et al. "Transcriptional regulation of fatty acid production in higher plants: molecular bases and biotechnological outcomes." *European journal of lipid science and technology* 116.10 (2014): 1332-1343.
103. Pflaster, Erin L., et al. "A high-throughput fatty acid profiling screen reveals novel variations in fatty acid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and related algae." *Eukaryotic cell* 13.11 (2014): 1431-1438.
104. Edwards, Daniel J., et al. "Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*." *Chemistry & biology* 11.6 (2004): 817-833.
105. Prasad, Tottempudi K., et al. "Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide." *The Plant Cell* 6.1 (1994): 65-74.
106. Bhunia K., et al. "Enhancement of α -linolenic acid content in transgenic tobacco seeds by targeting a plastidial ω -3 fatty acid desaturase (fad7) gene of *Sesamum indicum* to ER." *Plant cell reports* 35.1 (2016): 213-226.
107. Bajhaiya K., Moreira J., and Pittman J. "Transcriptional engineering of microalgae: prospects for high-value chemicals." *Trends in biotechnology* 35.2 (2017): 95-99.
108. Doreau M., et al. "Ruminal Metabolism of Fatty Acids: Modulation of Polyunsaturated, Conjugated, and Trans Fatty Acids in Meat and Milk." *Handbook of Lipids in Human Function: Fatty Acids* (2016): 521-542.
109. Karabudak, T., et al. "Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and

- lipoxygenase gene expression." *Molecular biology reports* 41.3 (2014): 1401-1410.
110. McCord, Joe M., and Irwin Fridovich. "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988)." *Free Radical Biology and Medicine* 5.5-6 (1988): 363-369.
111. Bielecka, Monika, et al. "Targeted mutation of $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturase genes in hemp produce major alterations in seed fatty acid composition including a high oleic hemp oil." *Plant biotechnology journal* 12.5 (2014): 613-623.
112. Jiao, Jingjing, and Yu Zhang. "Transgenic biosynthesis of polyunsaturated fatty acids: a sustainable biochemical engineering approach for making essential fatty acids in plants and animals." *Chemical reviews* 113.5 (2013): 3799-3814.
113. Abedi, Elahe, and Mohammad Ali Sahari. "Long - chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties." *Food science & nutrition* 2.5 (2014): 443-463.
114. Ledesma-Amaro, Rodrigo, and Jean-Marc Nicaud. "Yarrowia lipolytica as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids." *Progress in lipid research* 61 (2016): 40-50.
115. Бараненко, В. В. "Супероксиддисмутаза в клетках растений." *Цитология* 48.6 (2006): 465-474.
116. Beauchamp, Charles, and Irwin Fridovich. "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels." *Analytical biochemistry* 44.1 (1971): 276-287.
117. Баранова Е., Лундовских И., и Гулевич А. "Влияние встройки Fe-СОД1 гена на рост, перекисный гомеостаз и состояние пигментного комплекса трансгенных растений картофеля". *Агрохимия* 8 (2014): 72-78.
118. Akram A., et al. "Trehalose pretreatment induces drought tolerance in radish (*Raphanus sativus* L.) plants: some key physio-biochemical traits." *Acta physiologiae plantarum* 38.1 (2016): 3.

119. Meloni, Diego A., et al. "Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress." *Environmental and Experimental Botany* 49.1 (2003): 69-76.
120. McCord, Joe M. "The Discovery of Superoxide Dismutase and Its Role in Redox Biology." *Redox-Active Therapeutics*. Springer International Publishing, (2016): 5-10.
121. Wang, Mengcheng, et al. "A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity." *Plant molecular biology* 91.1-2 (2016): 115-130.
122. Kaouthar, Feki, et al. "Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses." *Journal of plant physiology* 198 (2016): 56-68.
123. Sultana T., et al. "Expression of a rice GLP in *Medicago truncatula* exerting pleiotropic effects on resistance against *Fusarium oxysporum* through enhancing FeSOD-like activity." *Acta Physiologiae Plantarum* 38.11 (2016): 255.
124. Lightfoot, Damien J., Graham RD Mcgrann, and Amanda J. Able. "The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley–pathogen interactions." *Molecular plant pathology* 18.3 (2017): 323-335.
125. Norastehnia A., and Sheydaei P. "Effects of increased concentrations of chloride on the expression of Mn-SOD enzyme in tobacco." *Acta agriculturae Slovenica* 109.1 (2017): 53-59.
126. García A. C., et al. "Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants." *Journal of plant physiology* 192 (2016): 56-63.
127. Гулевич А. А. "Трансформанты табака с геном Fe-SOD1, как модель для изучения формирования алюмоустойчивости." *Агрохимия* 2 (2015): 79-85.

128. Barra, Patricio J., et al. "Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress." *Applied Soil Ecology* 102 (2016): 80-91
129. Houmani, Hayet, et al. "Modulation of superoxide dismutase (SOD) isozymes by organ development and high long-term salinity in the halophyte *Cakile maritima*." *Protoplasma* 253.3 (2016): 885-894.
130. Agafonova N., Doronina N., and Trotsenko A. "Enhanced Resistance of Pea Plants to Oxidative Stress Caused by Paraquat during Colonization by Aerobic Methylobacteria." *Applied Biochemistry and Microbiology* 52.2 (2016): 199-204.
131. Kumar N., and Ebel R. "Oxidative metabolism in 'Valencia'sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) abscission zone tissue treated with the abscission agent 5-Chloro-3-Methyl-4-Nitro-1H-Pyrazole." *HortScience* 51.4 (2016): 377-382.
132. Tan Z., et al. "Reduction of renal ischemia reperfusion injury by hydrogen sulfide preconditioning through inhibiting oxidative stress." *Chinese Journal of Nephrology* (2016): 138-142.
133. Munne-Bosch, S., and M. Pinto-Marijuan. "Free radicals, oxidative stress and antioxidants." *Encycl. Appl. Plant Sci* 2 (2016): 16-19.
134. Li Q., Xin Q., and Jia W. "3, 3', 5-triiodothyroxine inhibits apoptosis and oxidative stress by the PKM2/PKM1 ratio during oxygen-glucose deprivation/reperfusion AC16 and HCM-a cells: T3 inhibits apoptosis and oxidative stress by PKM2/PKM1 ratio." *Biochemical and biophysical research communications* 475.1(2016):51-56.
135. Wendehenne, David, et al. "Free radical-mediated systemic immunity in plants." *Current opinion in plant biology* 20 (2014): 127-134.
136. Lushchak, Volodymyr I. "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." *Chemico-biological interactions* 224 (2014): 164-175.

137. Pospisil, Pavel. "The role of metals in production and scavenging of reactive oxygen species in photosystem II." *Plant and Cell Physiology* 55.7 (2014): 1224-1232.
138. Prior, Ronald L. "Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits." *Journal of Functional Foods* 18 (2015): 797-810.
139. Lambeth, J. David, and Andrew S. Neish. "Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9 (2014): 119-145.
140. Pottosin, Igor, et al. "Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses." *Journal of Experimental Botany* 65.5 (2014): 1271-1283.
141. Agafonova N., Doronina N., and Trotsenko Y. "Enhanced resistance of pea plants to oxidative stress caused by paraquat during colonization by aerobic methylobacteria." *Applied Biochemistry and Microbiology* 52.2 (2016): 199-204.
142. Kumar N., and Robert E. "Oxidative metabolism in 'Valencia sweet orange (Citrus sinensis osbeck) abscission zone tissue treated with the abscission agent 5-chloro-3-methyl-4-nitro-1H-pyrazole." *HortScience* 51.4 (2016): 377-382.
143. Vatansever, Fatma, et al. "Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond." *FEMS microbiology reviews* 37.6 (2013): 955-989.
144. Mor, Avishai, et al. "Singlet oxygen signatures are detected independent of light or chloroplasts in response to multiple stresses." *Plant Physiology* 165.1 (2014): 249-261.
145. Semenova M. "Advances in molecular design of biopolymer-based delivery micro/nanovehicles for essential fatty acids." *Food Hydrocolloids* 68 (2017): 114-121.

146. Bai J., et al. "Taurine protects against As₂O₃-induced autophagy in pancreas of rat offsprings through Nrf2/Trx pathway." *Biochimie* 123 (2016): 1-6.
147. Strugała P., et al. "Biological activity of japanese quince extract and its interactions with lipids, erythrocyte membrane, and human albumin." *The Journal of membrane biology* 249.3 (2016): 393-410.
148. Peng, Yongwu, et al. "Room temperature batch and continuous flow synthesis of water-stable covalent organic frameworks (COFs)." *Chem. Mater* 28.14 (2016): 5095-5101.
149. Semenova, M. G., et al. "Role of the covalent conjugate (sodium caseinate+ maltodextrin) and a plant antioxidant in the protection against oxidation of the composite food ingredients, containing the equimass amount of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids." *Gums and Stabilisers for the Food Industry* 18. (2016):182-189.
150. Lopez-Gomez M., et al. "24-Epibrassinolide ameliorates salt stress effects in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* and regulates the nodulation in cross-talk with polyamines." *Plant Physiology and Biochemistry* 108 (2016): 212-221.
151. Han L., et al. "Antioxidant and anti-fatigue activities of seed oil from the berries of three indigenous plants in tibetan plateau." *Journal of Food and Nutrition Research* 3.7 (2015): 445-457.
152. Decamps, Karolien, et al. "Molecular oxygen and reactive oxygen species in bread-making processes: scarce, but nevertheless important." *Critical reviews in food science and nutrition* 56.5 (2016): 722-736.
153. Pace-Asciak, Cd, and L. S. Wolfe. "Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoieic and linoienic acids." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 152.4 (1968): 784-787.
154. You, Youngmin, and Wonwoo Nam. "Designing photoluminescent molecular probes for singlet oxygen, hydroxyl radical, and iron–oxygen species." *Chemical Science* 5.11 (2014): 4123-4135.

155. Weinstain, Roy, et al. "In vivo targeting of hydrogen peroxide by activatable cell-penetrating peptides." *Journal of the American Chemical Society* 136.3 (2014): 874-877.
156. Zhang, Ruilong, et al. "Real-time discrimination and versatile profiling of spontaneous reactive oxygen species in living organisms with a single fluorescent probe." *J. Am. Chem. Soc* 138.11 (2016): 3769-3778.
157. Huang, Jia-Qiang, et al. "Selenoproteins protect against avian nutritional muscular dystrophy by metabolizing peroxides and regulating redox/apoptotic signaling." *Free Radical Biology and Medicine* 83 (2015): 129-138.
158. Pramanik, Sudipta. "Review of biological processes in oil sands: a feasible solution for tailings water treatment." *Environmental Reviews* 24.3 (2016): 274-284.
159. Demidchik, Vadim, et al. "Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment." *Journal of Experimental Botany* 65.5 (2014): 1259-1270.
160. Braun, Artur, et al. "Biological components and bioelectronic interfaces of water splitting photoelectrodes for solar hydrogen production." *Chemistry-A European Journal* 21.11 (2015): 4188-4199.
161. Zhang, Kun, et al. "Bioconcentration of dissolved organic compounds from oil sands process-affected water by medaka (*Oryzias latipes*): importance of partitioning to phospholipids." *Environmental science & technology* 50.12 (2016): 6574-6582.
162. Hendry, Charles, et al. "The digestive system: part 2." *Nursing Standard* 28.25 (2014): 37-44.
163. Tas, A. Cuneyt. "The use of physiological solutions or media in calcium phosphate synthesis and processing." *Acta biomaterialia* 10.5 (2014): 1771-1792.
164. Dickhout, Janneke Marrit, et al. "Produced water treatment by membranes: A review from a colloidal perspective." *Journal of colloid and interface science* 487 (2017): 523-534.

165. Vaseghi, Ghazaleh, Abbas Ghassemi, and Jim Loya. "Characterization of reverse osmosis and nanofiltration membranes: effects of operating conditions and specific ion rejection." *Desalination and Water Treatment* 57.50 (2016): 23461-23472.
166. Gwak, Gimun, et al. "Evaluation of poly (aspartic acid sodium salt) as a draw solute for forward osmosis." *Water research* 80 (2015): 294-305.
167. Qiu, Guanglei, et al. "Direct and complete phosphorus recovery from municipal wastewater using a hybrid microfiltration-forward osmosis membrane bioreactor process with seawater brine as draw solution." *Environmental science & technology* 49.10 (2015): 6156-6163.
168. Zhu, Liangliang, et al. "Plant leaf-derived fluorescent carbon dots for sensing, patterning and coding." *Journal of Materials Chemistry C* 1.32 (2013): 4925-4932.
169. Ahmed, Mohammad Boshir, et al. "Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: progress and challenges." *Science of the Total Environment* 532 (2015): 112-126.
170. Levinton, Jeffrey, Shanna Lord, and Yoshiaki Higeshide. "Are crabs stressed for water on a hot sand flat? Water loss and field water state of two species of intertidal fiddler crabs." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 469 (2015): 57-62.
171. Boyer, John S. "Turgor and the transport of CO₂ and water across the cuticle (epidermis) of leaves." *Journal of experimental botany* 66.9 (2015): 2625-2633.
172. Fang, Yujie, and Lizhong Xiong. "General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants." *Cellular and molecular life sciences* 72.4 (2015): 673-689.
173. Sami, Fareen, et al. "Role of sugars under abiotic stress." *Plant Physiology and Biochemistry* 109 (2016): 54-61.
174. Ryding, Mauritz J., et al. "Nucleophilic Substitution in Reactions between Partially Hydrated Superoxide Anions and Alkyl Halides." *The Journal of organic chemistry* 80.12 (2015): 6133-6142.

175. Regula, C., et al. "Chemical cleaning/disinfection and ageing of organic UF membranes: a review." *Water research* 56 (2014): 325-365.
176. Yuan, Hongbo, et al. "Conjugated Polymer-Based Hybrid Materials for Turn-On Detection of CO₂ in Plant Photosynthesis." *Analytical chemistry* 88.12 (2016): 6593-6597.
177. Герасименко, И. М., и др. "Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий." *Вестник ВОГиС* 14.1 (2010): 127-133.
178. Герасименко И. М., Сахно Л. А, Кирпа Т. Н., Остапчук А. Н., Хаджиев Т. А., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. В. "Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены $\Delta 9$ или $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы". *Физиология растений*. 62. (2015): 1–10.
179. Кирпа-Несміян, Т. М., та ін. "Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени $\Delta 9$ -і $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій." *Фактори експериментальної еволюції організмів* 17 (2015): 197-199.
180. К.А. Мусийчук, и др. "Получение и свойства делеционных вариантов лихеназы *Clostridium thermocellum* и создание на их основе бифункциональных гибридных белков". *Биохимия*. (2000): 1659-1665.
181. Кирпа-Несміян Т.М. "Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків". *Фактори експериментальної еволюції організмів*. (2016): 139-143.
182. Zarka, Daniel G., et al. "Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature." *Plant Physiology* 133.2 (2003): 910-918.
183. Prasher, Douglas C., et al. "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein." *Gene* 111.2 (1992): 229-233.

184. Clough, Steven J., and Andrew F. Bent. "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *The plant journal* 16.6 (1998): 735-743.
185. Valvekens, Dirk, Marc Van Montagu, and Mieke Van Lijsebettens. "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.15 (1988): 5536-5540.
186. Nehra, Narender S., et al. "Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system." *Plant Cell Reports* 9.6 (1990): 293-298.
187. Kravets, A. P., et al. "Corn plant DNA methylation pattern changes at UV-C irradiation fractionating." *Cytology and genetics* 47.1 (2013): 29-33.
188. Кирпа-Несміян Т.М. "Дослідження успадкування гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії у рослин тютюну Т1 покоління". *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017»*. (2017): 254.
189. Piruzian, E. S., et al. "The use of a thermostable β -glucanase gene from *Clostridium thermocellum* as a reporter gene in plants." *Molecular and General Genetics MGG* 257.5 (1998): 561-567.
190. Piruzian, E., et al. "A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum*." *Molecular Genetics and Genomics* 266.5 (2002): 778-786.
191. Дученко, М. А. "Дослідження полісахаридів листя гледичії колючої." *Український біофармацевтичний журнал* 3 (2014): 64-66.
192. Smith, P. K, et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* 150.1 (1985): 76-85.
193. Кирпа Т. М., и др" Создание растений орхидеи *Dendrobium linguella* RCHB. F., экспрессирующих ген $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии". *Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові,*

- прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». (2012): 265-266.
194. Fried, Rainer. "Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase." *Biochimie* 57.5 (1975): 657-660.
195. Janero, David R. "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury." *Free Radical Biology and Medicine* 9.6 (1990): 515-540.
196. Гра О.А., и др. ."Экспрессия гетерологичных генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам.". *II Международная научная конференция . Генетика и Биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы* (2015): 56.
197. Кырпа-Nesmiiian T.M., Sheludko Y.V. " Superoxide dismutase activity in *Nicotiana tabacum* expressing hybrid cyanobacterial $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene after hyperthermal stress". *International conference Advances in cell biology and biotechnology*. (2015): 38.
198. Bai, Shuangyi, et al. "Directed evolution increases desaturation of a cyanobacterial fatty acid desaturase in eukaryotic expression systems." *Biotechnology and bioengineering* 113.7 (2016): 1522-1530.
199. Musiychuk K., et al. "Construction and properties of deletion derivatives of *Clostridium thermocellum* lichenase and their use to obtain bifunctional hybrid proteins." *Biokhimiya* 65.12 (2000): 1659-1665.
200. Кирпа-Несмиян Т.Н. "Линии *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие ген Δ -12-цил-липидной десатуразы цианобактерий в условиях гипотермического стресса". *Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге* (2015): 75.
201. Kaouthar, Feki, et al. "Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide

- dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses." *Journal of plant physiology* 198 (2016): 56-68.
202. Vyacheslavova A., et al. "Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities." *Russian Journal of Genetics* 48.11 (2012): 1067-1079.
203. Wang, Mengcheng, et al. "A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity." *Plant molecular biology* 91.1-2 (2016): 115-130.
204. Adhikari, Tapan, et al. "Growth and enzymatic activity of maize (*Zea mays* L.) plant: solution culture test for copper dioxide nano particles." *Journal of plant nutrition* 39.1 (2016): 99-115.
205. Vital, Roberto Gomes, et al. "Physiological changes and in the carbohydrate content of sunflower plants submitted to sub-doses of glyphosate and trinexapac-ethyl." *Bragantia* 76.1 (2017): 33-44.
206. Meijer, Harold JG, et al. "Acclimation to salt modifies the activation of several osmotic stress-activated lipid signalling pathways in *Chlamydomonas*." *Phytochemistry* 135 (2017): 64-72.
207. Kawa, Dorota, and Christa Testerink. "Regulation of mRNA decay in plant responses to salt and osmotic stress." *Cellular and Molecular Life Sciences* 74.7 (2017): 1165-1176.
208. Brausemann, Anton, et al. "Structure of Phytoene Desaturase Provides Insights into Herbicide Binding and Reaction Mechanisms Involved in Carotene Desaturation." *Structure* 25.8 (2017): 1222-1232.
209. Bhattacharya, J., and S. S. Khuspe. "In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds." *Scientia Horticulturae* 91.1 (2001): 39-49.
210. Bailly, Christophe, et al. "Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging." *Physiologia Plantarum* 97.1 (1996): 104-110.

211. Ruiz - Lozano, J. M., R. Azcón, and J. M. Palma. "Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress." *New Phytologist* 134.2 (1996): 327-333.
212. Bowler, Chris, et al. "Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants." *The EMBO journal* 10.7 (1991): 1723.
213. Becana, M., J. F. Moran, and I. Iturbe-Ormaetxe. "Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection." *Plant and Soil* 201.1 (1998): 137-147.
214. Кирпа-Несміян Т.М., Кучук М.В., Шелудько Ю.В. "Дослідження фізіолого-біохімічних характеристик рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени *desA* або *desC* в умовах стресів різних температур". Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. (2016):21-26.
215. Tetiana Kyrypa-Nesmiian." Research plants *Nicotiana tabacum* generation T1 expressing gene *desA* in terms hot stress." International conference "Smart Bio". (2017):128.
216. Amiri R., et al. "Expression of acyl - lipid $\Delta 12$ - desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato." *Journal of integrative plant biology* 52.3 (2010): 289-297
217. Zarka, Daniel G., et al. "Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature." *Plant Physiology* 133.2 (2003): 910-918.
218. Knight, Heather, et al. "Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element." *Plant physiology* 135.3 (2004): 1710-1717.
219. Roy, Binayak, and Amy S. Lee. "Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter." *Molecular and Cellular Biology* 15.4 (1995): 2263-2274.

220. Кирпа-Nesmiiian, Т. "Getting plants *Nicotiana tabacum* that simultaneously express heterologous gene of two acyl-lipid desaturases cyanobacterium *desC* and *desA*. ". *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. (2016): 65 – 68.
221. Кирпа-Несмиян, Т.М., и др. "Растения картофеля *Solanum tuberosum* экспрессирующие ген $\Delta 12$ - ацил-липидной десатуразы цианобактерии". *Картофелеводство*. (2016):81-87.
222. Кирпа-Несмиян, Т.М., и др. "Растения картофеля *Solanum tuberosum*, которые несут ген *desA* десатуразы цианобактерии". *Международная научно-практическая конференция «Современное картофелеводство Евразийского содружества: от науки до практики»*.(2016): 132.
223. Кирпа Т.Н., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко И.М., Иванников Р.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова И.В., Шелудько Ю.В. "Гетерологическая экспрессия $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии в орхидее *Dendrobium linguella* Rchb. F." *Фактори експериментальної еволюції організмів*. (2013):244-248.