

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

САХНО Людмила Олександрівна

УДК581.143.5 + 1575.123 + 577.21

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

03.00.20 – біотехнологія

**Науковий консультант
член-кореспондент НАНУ,
д.б.н., професор
Кучук Микола Вікторович**

Київ - 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Досягнення і проблеми біотехнології рослин у галузі збільшення рослинної біомаси	19
1.1.1. Збільшення біомаси за оптимальних умов росту	20
1.1.2. Здатність трансгенних рослин до збільшення біомаси за умов абіотичних стресів	26
1.2. Антиоксидантна активність рослин	37
1.3. Супероксиддисмутаза (СОД): перший фермент антиоксидантного захисту	41
1.3.1. Властивості рослинних супероксиддисмутаз	41
1.3.2. Активність СОД і особливості ростових процесів <i>in vitro</i>	44
1.3.3. Зміни активності СОД за нормальних умов росту і розвитку рослин	46
1.3.4. Вплив експресії гетерологічних генів на активність СОД за умов стресів різного походження	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	61
2.1. Характеристика вихідного матеріалу	61
2.2. Вирощування рослин в асептичних умовах	61
2.2.1. Вирощування рослин за фізіологічних (нормальних) умов	61
2.2.2. Вирощування рослин за умов водного дефіциту	61
2.2.3. Вирощування рослин за низьких позитивних температур	62
2.3. Вирощування рослин в кліматичній камері та проведення високотемпературного тесту	63
2.4. Отримання насіння в умовах закритого ґрунту	63
2.5. Тестування на стійкість до фосфінотрицину і гліфосату в асептичних умовах	63
2.6. Тестування на стійкість до гліфосату і фосфінотрицину в умовах	63

теплиці	64
2.7. Вивчення впливу екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку	64
2.8. Генетична трансформація	65
2.9. Векторні конструкції, використані в експериментах з генетичної трансформації	65
2.10. Підготовка агробактерій до інфікування рослинних тканин	69
2.11. Аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	69
2.12. Аналіз експресії введених генів на рівні транскрипції	72
2.13. Визначення антиоксидантної активності тканин листків	73
2.14. Визначення вмісту загального розчинного білка	73
2.15. Визначення активності СОД	74
2.16. Визначення вмісту аскорбінової кислоти в рослинному матеріалі	75
2.17. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів	75
2.18. Газова хроматографія метилових ефірів жирних кислот	76
2.19. Аналіз відносного вмісту води у листках	77
2.20. Вивчення загальної антирадикальної активності рослинних екстрактів	77
2.21. Аналіз ліхеназної активності	78
2.21.1. Якісний тест	78
2.21.2. Кількісний тест	79
2.22. Визначення антивірусної активності рослинних екстрактів	79
2.23. Статистична обробка результатів	80
РОЗДІЛ 3. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РІПАКУ	81
3.1. Розробка протоколу трансформації з використанням в якості експлантів листків асептичних рослин	81
3.2. Трансгенні рослини ріпаку з безпромоторним геном <i>bar</i>	85
3.2.1. Регенерація рослин ріпаку	85
3.2.2. Аналіз за допомогою ПЛР рослин ріпаку, регенерованих в	

експериментах з використанням векторів pICH3744, pICH3737 і pICH9414	87
3.2.3. Генетичний аналіз рослинних ліній	88
3.3. Отримання біотехнологічних рослин ріпаку з геном <i>epsps</i>	92
3.3.1. Регенерація первинних трансформантів	92
3.3.2. ПЛР і ЗТ-ПЛР аналіз первинних трансформантів	96
3.3.3. Тестування на стійкість до обробки гліфосатом за умов теплиці і генетичний аналіз	97
3.4. Отримання рослин ріпаку з геном <i>desC</i> ціанобактерії	101
3.4.1. Регенерація рослин з трансгеном <i>desC</i> та їх молекулярно-біологічний і біохімічний аналізи	101
3.4.2. Склад жирних кислот у ліпідах листків	115
3.5. Рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини	119
3.5.1. Отримання первинних трансформантів та їх молекулярно-біологічний аналіз	119
3.5.2. Аналіз біологічної активності екстрактів рослин ріпаку з геном <i>HuInf-α2b</i>	122
3.6. Біотехнологічні рослини ріпаку з геном <i>sup11A1</i>	126
3.6.1. Регенерація рослин та їх молекулярно-біологічний аналіз	126
3.6.2. Генетичний аналіз рослинних ліній	131
3.6.3. Аналіз сумарного розчинного білка в листках трансгенних рослин	135
3.6.4. Оцінка антиоксидантної активності	136
3.6.5. Аналіз вмісту аскорбінової кислоти	138
3.6.6. Газова хроматографія ефірів жирних кислот, виділених з насіння	140
РОЗДІЛ 4. АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ РІПАКУ	157
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНУ НА РІСТ РОСЛИН РІПАКУ	166

5.1. Вплив обробки насіння ріпаку екзогенним інтерфероном людини на фізіологічні і біохімічні параметри проростків	166
5.2. Вплив обробки пагонів ріпаку розчином інтерферону на ріст в асептичних умовах (нормальні умови та осмотичний стрес)	174
РОЗДІЛ 6. ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ РІПАКУ ЗА УМОВ АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ	181
6.1. Рослини ріпаку з <i>lox</i> -залежною експресією гена <i>bar</i> за умов росту на середовищах з додаванням фосфінотрицину	181
6.2. Рослини ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів на основі глюфозінату і гліфосату при рості на середовищах з додаванням гербіцидів	189
6.2.1. Особливості росту на середовищах з додаванням гербіцидів	189
6.2.2. Особливості росту в умовах закритого ґрунту	195
6.3. Рослини ріпаку з геном <i>desC</i>	197
6.3.1. Вивчення толерантності рослин ріпаку з геном <i>desC</i> до дії низьких позитивних температур	197
6.3.2. Особливості рослин з геном <i>desC</i> за умов високотемпературного тесту	202
6.3.3. Рослини з геном <i>desC</i> за умов осмотичного стресу	210
6.4. Рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини за умов осмотичного стресу	214
6.5. Особливості рослин ріпаку з геном <i>sup11A1</i>	222
6.5.1. Проростання насіння за умов знижених і підвищених температур	222
6.5.2. Аналіз стійкості до осмотичного стресу <i>in vitro</i>	230
6.5.3. Реакція на високотемпературний стрес	240
УЗАГАЛЬНЕННЯ	251
ВИСНОВКИ	261
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	264

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП – 6-бензиламінопурин

Зеа – зеатин

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

Кін – кінетин

НОК – α -нафтилоцтова кислота

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота

MS – середовище Мурасіге і Скуга [308]

МЕС – 2[N-морфоліно]етансульфо кислота

МКЕ – β -меркаптоетанол

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСН – додецилсульфат натрію

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ПААГ – поліакріламідний гель

ПЕГ – поліетиленгліколь

Трис – Трис(гідроксиметил)аміном етан

ВМЦК – вірус мозаїки цвітної капусти

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією

РРТ – фосфінотрицин

bar – ген стійкості до біалафосу

nptII – ген неоміцинофосфотрансферази II

epsps – ген енолпируватшикіматфосфатсинтази

desC – ген десатурази Δ^9

licBM3 – ген ліхенази

HuInf- α 2b – ген інтерферону альфа-2b людини

loxP – сайт рекомбінації Cre-*lox* системи бактеріофага P1

СОД – супероксиддисмутаза

ВМЦК – вірус мозаїки цвітної капусти

НБТ – нітроблакитний тетразолій

АФК – активні форми кисню

СРБ – сумарний розчинний білок

DRPH-радикал – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил радикал

ІНФ – інтерферон

EPSPS – енолпируватшкіматфосфатсинтаза

DesC – десатураза $\Delta 9$

Chl *a* – хлорофіл *a*

Chl *b* – хлорофіл *b*

DPIP – 2,6-дихлорфеноліндофенолят натрію

ВСТУП

Актуальність теми. Значні зусилля фахівців у галузі біологічної науки спрямовані на збільшення врожайності рослин [78, 105, 419]. Ріпак (*Brassica napus* L.) – важлива сільськогосподарська культура, яка забезпечує суттєвий внесок у всесвітню і українську економіку. Вона є третьою за значенням олійною культурою після пальми і сої [150] у світовому виробництві олії. Насіння ріпаку на сьогодні є одним із найважливіших джерел для отримання рослинної олії як для потреб харчування, так і технічного призначення, а також кормів з високим вмістом білка.

Зміни клімату ускладнюють задачу отримання вихідного матеріалу для селекції, зокрема, ріпаку, який характеризувався би мінімальними втратами продуктивності за несприятливих умов вирощування, таких як висока (низька) температура, посуха, вимокання, засолення, підвищений вміст важких металів, ураження фітопатогенними мікроорганізмами і пошкодження комахами [50, 354, 477]. Біотехнологічні методи дозволяють отримувати рослини з поліпшеною толерантністю до стресів на основі вже наявних, цінних з точки зору сільськогосподарських характеристик, генотипів. Так, отримано трансгенні рослини ріпаку, які експресували вакуолярний Na^+/H^+ антипорт з *Arabidopsis thaliana*, що надавало їм можливість рости, цвісти та продукувати насіння за умов засолення (200 мМ NaCl) [494]. Надекспресія мітохондріальної Mn супероксиддисмутази (Mn SOD3.1) з пшениці у рослинах ріпаку підвищувала їх здатність протидіяти впливу підвищених і низьких температур та нестачі вологи як у лабораторних умовах, так і у польових дослідках [184]. Трансгенні рослини *B.napus*, які несли антисенсову конструкцію з геном b-субодиниці фарнезилтрансферази з *Arabidopsis* (ERA1) під контролем rd29A промотору, який індукується посухою, були більш стійкими до абортивності насіння в результаті дефіциту вологи під час цвітіння [470]. Польові випробовування підтвердили, що за умов достатнього водного забезпечення ці трансгенні

рослини продукували такий самий урожай насіння, як і контрольні нетрансформовані. Нетривала посуха під час цвітіння не була перешкодою для формування врожаю насіння біотехнологічного ріпаку, в той час як рослини вихідного сорту продукували його значно менше [470].

Введення деяких гетерологічних генів надає трансгенним рослинам переваг тільки у чітко визначених межах стресової ситуації. Прикладом цього може бути інтеграція до рослинного геному генів стійкості до гербіцидів. Отримання власних біотехнологічних рослин на основі перспективних сортів вітчизняної селекції зі стійкістю до найбільш поширених гербіцидів – гліфосату та глюфозінату – є актуальним, бо зробить вирощування сільськогосподарських рослин, і ріпаку зокрема, більш рентабельним, екологічно чистим [173, 451] і незалежним від імпорту посівного матеріалу. Врахування нових тенденцій у створенні гербіцид-стійких трансгенних рослин, а саме отримання рослин, які поєднують стійкість до декількох гербіцидів одночасно, дасть змогу зменшити ризик виникнення спонтанно стійких бур'янів за рахунок чергування обробок гербіцидами з різними діючими агентами [131, 173]. На сьогодні гербіцид-стійкі рослини ріпаку зареєстровані в Європейському Союзі, але не вирощуються. За розрахунками прямий і непрямий прибуток від культивування таких рослин в Європі за рахунок збільшення врожаю, зменшення вартості і кількості отрутохімікатів, зменшення кількості бур'янів після вирощування гербіцид-стійких сортів ріпаку може сягати 195-318 млн. євро на рік [327]. В Канаді, де кожного року посіви трансгенного ріпаку сягають 85% площ під цією культурою і де, крім цього вирощується ріпак у системі органічного землеробства, прибуток з одного гектара трансгенного ріпаку складав 49-55 € [327].

Незважаючи на те, що гербіцид-стійкі біотехнологічні рослини вирощуються у промислових масштабах з 1996 року, дискусійним залишається питання щодо можливих непередбачуваних змін у трансгенних рослинах [317, 483]. Вивчення біохімічних і фізіологічних особливостей

створених рослин залишається актуальним, тому що може дати відповідь не тільки на питання щодо їх адаптивної пластичності за умов абіотичних і біотичних стресів, але і спрогнозувати вплив конкретних трансгенних рослин на здоров'я тварин і людей, які споживатимуть такі рослини і продукти їх переробки.

Гетерологічні гени різного походження – бактеріальні, тваринні та отримані з геному людини – можуть спричинювати плеiotропний ефект і змінювати адаптивну пластичність трансгенної рослини. Особливо це стосується інтеграції генів білків, що задіяні у відповідях на стрес або регуляції цих процесів. Дослідження наслідків введення таких генів має фундаментальний і практичний інтерес. Так, рослини рису, які надекспресували власний ген дегідроаскорбатредуктази *OsDHAR1*, мали достовірно вищу фотосинтетичну здатність і активність антиоксидантних ферментів за польових умов [234]. У них спостерігали збільшення врожаю зерна і загальної біомаси завдяки підвищенню стебел і коріння і збільшенню кількості колосків і волотей. Вміст аскорбінової кислоти був підвищений у цих рослинах рису в 1,32 разів. Рослини томату (*Solanum lycopersicum*) зі зменшеною активністю аскорбатоксидази завдяки РНК-інтерференції формували більший врожай плодів за умов водного дефіциту і опадання листків [164]. Вони характеризувались також збільшеною провідністю продихів і вмістом цукрів у листках і плодах, а також зміненим співвідношенням гексоз до сахарози у апопласті.

Отримання і характеристика нових трансгенних рослин ріпаку з підвищеною толерантністю до змін умов вирощування – актуальна проблема агробіотехнології. Поєднання в одній рослині таких характеристик, як стійкість до гербіцидів та покращені фізіологічні та біохімічні параметрами є більш вигідним для виробництва, ніж наявність лише генів стійкості до гербіцидів або лише генів, що покращують толерантність до стресів.

Особливої уваги заслуговує питання відбору генотипів з поліпшеними адаптивними характеристиками як в асептичних, так і польових умовах за

допомогою надійних біохімічних, молекулярно-біологічних, фізіологічних маркерів. Зокрема, вибір критерію для первинного скрінінгу і подальшого пошуку рослин з підвищеною стійкістю до змін умов культивування може визначати швидкість досягнення успіху у даному напрямку [84]. Використання в якості критерію для селекції значень активності антиоксидантних ферментів, зокрема, супероксиддисмутази (СОД) дозволить відібрати цінні за агрономічними характеристиками генотипи з покращеною толерантністю до впливу абіотичних і біотичних чинників.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження проводились у рамках бюджетних тем відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ «Вивчення поведінки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цінними агрономічними та фармацевтичними властивостями» (2007–2011 р.р., № держреєстрації 0107U002734), «Вивчення функціонування рослинних систем, які містять гетерологічний генетичний матеріал» (2010–2014 р.р., № держреєстрації 0110U002445), «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (2015 р., № держреєстрації 0115U000025), а також при виконанні проектів цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина. Біопалива» – «Отримання генетично змінених рослин ріпаку з підвищеною продуктивністю, стійкістю до гербіцидів та зміненним складом олії як сировини для виробництва біодизеля» (2007–2010 р.р., № держреєстрації 0107U008096) та «Біотехнологічні рослини ріпаку з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів як сировина для виробництва біодизеля» (2010–2012 р.р., № держреєстрації 0111U004455); проектів «Дослідження фізіологічної ролі генів, що кодують десатурази з різною субстратною специфічністю, в життєдіяльності рослин в нормі та під впливом абіотичних стресових факторів середовища» та «Розробка біоінженерної платформи нового покоління для високоефективної експресії генів фармацевтичних

білків в рослинах і створення їстівних вакцин» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010–2014 р.р., №№ держреєстрації 0110U006062 і 0110U006061, відповідно), проектів НАНУ-РФФД «Дослідження механізмів стійкості вищих рослин до абіотичних стресів завдяки гетерологічній експресії генів ціанобактерій» (2008–2009 р.р., № 0108U003265), ДФФД - РФФД "Молекулярний дизайн системи для гетерологічної експресії білків з використанням термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* як репортера та носія" (2011 р., № держреєстрації № 0111U004979) та «Створення їстівних та кормових рослин, які містять білки з протитуберкульозними та антивірусними властивостями» (ДЗ/489 – 2011).

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

До завдань роботи входило:

- оптимізувати умови генетичної трансформації рослин ріпаку для отримання трансгенних рослин;
- отримати рослини ріпаку з геном *bar* з бактерії *Streptomyces hygrosopicus*, що надає рослинам стійкості до гербіцидів на основі фосфінотрицину (глюфозінат), та дослідити їх можливі біохімічні зміни;
- створити трансгенні рослини ріпаку з одночасною експресією гена *epsps* з *Agrobacterium* штама CP4, що надає рослинам стійкості до гербіцидів на основі фосфометилгліцину (гліфосат), і гена *bar* та дослідити їх можливі біохімічні зміни;
- отримати рослини ріпаку з геном *desC* з ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та вивчити зміни у їх холодостійкості;

- створити рослини ріпаку з геном *HuInf- α 2b* (інтерферону альфа-2b людини), що обумовлює акумулювання рекомбінантного інтерферону людини, та проаналізувати їх фізіологічні та біохімічні параметри;
- отримати рослини ріпаку з геном *sup11A1*, що кодує цитохром P450ssc тваринного походження, та виявити особливості створених рослин;
- визначити загальні характеристики отриманих трансгенних рослин та їх відмінності, що можуть бути пов'язані з експресією гетерологічних генів різного походження, та визначити їх можливі причини.

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

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

Методи дослідження. Методи дослідження включали методики культивування рослин *in vitro* та *in vivo* (вирощування у ґрунті в теплиці та кліматичній камері) за нормальних умов і за дії абіотичних стресів (знижена та підвищена температури; обприскування розчинами гербіцидів; осмотичний стрес, індукований додаванням манітолу до культурального середовища; додавання гербіцидів до середовищ культивування). Для отримання трансгенних рослин ріпаку використовували метод *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації. Наявність та експресію трансгенів на рівні транскрипції у геномі рослин визначали за допомогою молекулярно-біологічних (полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) та полімеразно-ланцюгова реакція зворотніх транскриптів (ЗТ-ПЛР)) методів. Активність генів стійкості до гербіцидів і антибіотика визначали під час культивування рослин або експлантів на середовищах з додаванням фосфіотрицину (РРТ, ген *bar*), або гліфосату (ген *epsps*), або канаміцину (ген *nptII*). Генетичний аналіз полягав в аналізі розщеплення за стійкістю до відповідних селективних агентів при пророщуванні в асептичних умовах

насіння, отриманого від самозапилення трансгенних рослин. Антивірусну активність рослинних екстрактів вивчали методом мікротитрування, що базується на визначенні здатності екстрактів протидіяти цитопатичному впливу вірусу везикулярного стоматиту (штам Indiana з колекції Інституту мікробіології та вірусології НАНУ) на клітинну культуру тестикул поросят (з колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького) як показник біологічної активності введеного гена інтерферону людини. Біохімічні методи застосовувались для визначення вмісту сумарного розчинного білка (СРБ); вмісту хлорофілів і каротиноїдів; вмісту аскорбінової кислоти; вмісту жирних кислот у листі і насінні за допомогою газової хромато-мас-спектрометрії; відносного вмісту води; активності супероксиддисмутази (СОД); антирадикальної активності проти 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил радикала (DPPH-радикал); антиоксидантної активності, яку вимірювали з використанням 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію; активності ліхенази (якісний та кількісний тести). Фізіологічний стан рослин оцінювали за накопиченням сирової біомаси, за будовою квіток, за масою і схожістю насіння, за довжиною коренів і гіпокотилів у проростків. Для аналізу експериментальних даних було використано методи статистичної обробки.

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

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

Вперше отримано рослини ріпаку з трансгенами *bar* і *epsps*, стійкі до двох груп гербіцидів (фосфінотрицину і фосфонометилгліцину). Не виявлено

змін в активності СОД і в антирадикальній активності за нормальних умов культивування.

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

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

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

умов кліматичної камери. Виявлено збільшену активність СОД за нормальних умов вирощування.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані трансгенні рослини можуть бути використані для вирощування в якості сировини для виробництва біодизеля завдяки їх стійкості до гербіцидів, здатності протистояти стресам, накопичувати більшу біомасу, розвиватись і давати врожай швидше за нетрансформовані. Вирощування гербіцид-стійких рослин є більш рентабельним та екологічно чистим у порівнянні з культивуванням нестійких сортів.

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

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

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

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, проведенні всіх основних експериментів і дослідів, аналізі літератури, підготовці та написанні наукових статей. Спільно з науковим консультантом проведено вибір об'єкту, розроблено загальний напрямок досліджень і структуру дисертаційної роботи. Дослідження проводились за участі співробітників Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ та Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, серед яких с.н.с. відділу генетичної інженерії, к.б.н. І.К. Комарницький (ІКБГІ НАНУ), зав. відділом молекулярної генетики, к.б.н. Б.В. Моргун (ІКБГІ НАНУ), зав. лабораторією систем біосинтезу природних сполук, к.б.н. Ю.В. Шелудько (ІКБГІ НАНУ),

зав. відділом проблем інтерферону і імуномодуляторів, д.б.н., член-кор. НАНУ М.Я. Співак (ІМВ НАНУ), зав. лабораторією біологічних полімерних сполук, к.б.н. А.М. Остапчук (ІМВ НАНУ). Отримані результати наведено у спільних публікаціях, при проведенні досліджень та їх узагальненні авторство здобувача становило близько 80%.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідалися на ІХ і Х Міжнародних наукових конференціях «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008 та Казань, 2013), з'їзді генетиків і селекціонерів, присвяченому 200-річчю з дня народження Ч.Дарвіна, поєднаному з V з'їздом Вавіловського товариства генетиків і селекціонерів (Москва, 2009), україно-німецькому симпозиумі з фізики та хімії наноструктур та нанотехнологій (Берегове, Україна, 2010), Міжнародній конференції «Plant transformation technologies II» (Відень, Австрія, 2011), Міжнародній конференції «Rapeseed oil in European modern economy. 10th International Conference on Research and Technology» (Торунь, Польща, 2011), Міжнародній конференції «Сучасні аспекти генетичної інженерії рослин» (Київ, 2011), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Генетичні основи селекції, насінництва і біотехнологій: наука, освіта, практика» (Київ, 2012), Міжнародному симпозиумі з клітинної біології, спільному з 3-м Українським з'їздом клітинних біологів (Лівадія, Ялта, 2012), Міжнародній конференції «Biotechnology and Plant Breeding. Perspective Towards Food Security and Sustainability» (Радзихув, Польща, 2012), Всеросійській конференції з міжнародною участю «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013), 5-му Центрально-Європейському Конгресі Природничих Наук (5th Central European Congress of Life Sciences, Eurobiotech 2013. Leading area: White and Green Biotechnology (Краків, Польща, 2013), 6-й конференції польського товариства експериментальних біологів рослин (PSEPB) (Лодзь, Польща, 2013), з'їздах Українського товариства генетиків і селекціонерів ім.

М.І.Вавилова (Алушта, 2011-2013; Чернівці, 2015), III Міжнародній конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 2014), конференції «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology, Львів, 2015).

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

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Досягнення і проблеми біотехнології рослин у галузі збільшення рослинної біомаси

Рослини – це фототрофні організми, що здатні з використанням енергії сонячного світла трансформувати неорганічний вуглець у вуглеводи і далі у інші сполуки і в такий спосіб нарощувати свою біомасу. Людина використовує рослини для харчування і у різноманітних галузях, таких як будівництво, текстильна, фармацевтична і хімічна промисловості. Рослинна біомаса розглядається як важливе джерело поновлюваної сировини для виробництва біодизелю [125, 136, 354, 415]. Збільшення висоти рослин, швидкості росту і загальної біомаси залишається принциповим завданням через постійний ріст населення планети.

Значні зусилля вчених, які працюють у галузі біотехнології і фізіології рослин, спрямовані на вирішення проблеми підвищення біомаси. Ріст рослин суттєво залежить від наявності основних елементів живлення, таких як азот і фосфор, які впливають на численні аспекти розвитку рослин, включаючи галушення і розвиток коренів і пагонів, ріст листків, час цвітіння, і регулюють експресію численних генів, що залучені до метаболізму азоту і вуглецю [108, 449]. Генно-інженерні дослідження у галузі асиміляції азоту для покращення ефективності використання цього елемента глибоко проаналізовані в недавніх оглядах [122, 297].

Підсумовуючи результати, отримані на модельних об'єктах з підвищення ефективності фотосинтезу (вдосконалення фотосинтетичного електрон–транспортного ланцюга, активності, специфічності та активації Рубіско, вивчення фотодихання, активності седогептульозо-1,7-бісфосфатаз/фруктозо- 1,6-бісфосфатази), Peterhansel C. et al. [333] фокусував увагу на необхідності тестувати розроблені підходи на сільськогосподарських культурах в умовах виробництва.

Регуляція розподілення вуглецю між листками як джерелом продуктів фотосинтезу і тканинами, що їх потребують, – це важливий фактор контролю врожаю [338]. Гормони рослин тонко регулюють ріст і розвиток та впливають на формування загальної біомаси і врожаю [144, 222, 473, 504]. Трансгенез дозволяє ідентифікувати механізми комплексної стійкості до стресів і таким чином забезпечити отримання більшої рослинної біомаси за несприятливих умов [216].

Останні досягнення генетичної інженерії і перспективи деяких підходів для оптимізації ектопічної експресії генів для збільшення рослинної біомаси в польових умовах розглянуті нижче.

1.1.1. Збільшення біомаси за оптимальних умов росту. Змін у формуванні рослинної біомаси можна досягти за рахунок регуляції метаболізму вуглеводів [329, 337, 364]. Одночасна стимуляція УДФ-глюкозопірофосфатази, сахарозосинтази і сахарозофосфатсинтази приводила до покращення первинного росту і збільшення висоти рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) в деяких лініях більше, ніж на 50% [104]. Біомаса трансгенного *AtPAP2* (purple acid phosphatase) арабідопсису була вдвічі вищою, ніж у рослин дикого типу, що не надекспресують пурпурову кислоту фосфатазу, за рахунок підвищеної активності сахарозофосфатсинтази [419]. Експресія інвертази клітинної стінки з *Chenopodium rubrum* (*CrCIN1*) під коренеспецифічним промотором *rruk10* в рослинах *Arabidopsis* не приводила до помітних відмінностей між трансгенними і нетрансформованими рослинами як при оптимальних асептичних умовах росту, так і в ґрунті до десятої доби після проростання. Але подальший ріст у ґрунті приводив до накопичення більшої біомаси у трансгенних рослин за рахунок як надземної частини, так і коренів. Трансгенні рослини зацвітали на 4-6 діб раніше рослин дикого типу [457].

Зниження експресії глюкан, вода-дікінази (першого ферменту, необхідного для фосфорилування крохмалю) під контролем ендосперм-

специфічного промотору завдяки РНК-інтерференції приводило до зменшення вмісту фосфорильованого крохмалю у м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) [357]. Це супроводжувалось збільшенням вегетативної маси, розміру зернин і врожаю зерна до 29% у наступних поколіннях, вирощених як в теплиці, так і за польових умов. Надекспресія гена сахарозсинтази (*SusA1*) у рослинах бавовника (*Gossypium hirsutum*) збільшувала довжину та міцність волокон [214]. Зростання рівня транскриптів *GhSusA1* у вегетативних тканинах позитивно корелювало зі збільшенням біомаси проростків.

Рослини рису (*Oryza sativa* L.) з трансгеном *Sh2r6hs* продукували на 20% більшу біомасу, ніж рослини дикого типу через підвищену активність АДФ-глюкозопирофосфорілази, ключового фермента в біосинтезі крохмалю, завдяки гетерологічній експресії модифікованого сиквенса великої субодиниці АГФ кукурудзи під контролем ендосперм-специфічного промотору [410]. У трансгенних рослин рису (*Oryza sativa* L.), які надекспресували ген *OsAMT1;1*, який задіяний у транспорті амонію (NH_4^+), спостерігали підвищений вміст амонію і підвищену активність генів азот-асимілюючого шляху порівняно з нетрансформованими рослинами. Це приводило до зростання вмісту хлорофілів, крохмалю, цукрів і врожаю зерна у трансгенних рослин за оптимальних та субоптимальних за забезпеченістю азотом умов росту. Експресія трансгену покращувала ріст рослин в цілому, особливо за субоптимальних концентрацій (NH_4^+) [358].

Трансгенні рослини тютюну, які експресували апопластну і цитозольну інвертазу дріжджів під контролем або подвійного 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), або промотору, що забезпечує експресію в ксилемі (промотор 4-кумарат:СоА лігази з петрушки кучерявої (*Petroselinum crispum*)), були значно меншої висоти порівняно з нетрансформованими, але характеризувались збільшенням до 40% діаметру стебла і накопиченням до 88% більшої сирої біомаси [87].

Інтеграція катаболічного шляху гліколята *Escherichia coli* в хлоропласти рослин арабідопсису дозволила знизити втрати від фотодихання і таким чином збільшити біомасу трансгенних рослин. Цікаво, що для введення трьох гетерологічних генів – гліколатдегідрогенази (три субодиниці), гліоксалаткарбоксилігази і тартроніксеміальдегідредуктази – використали три різні вектори. Для відбору рослин, які отримали всі цільові гени після схрещування трансгенних ліній, застосували мультиплексну полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) [229].

Численними є спроби вирішення задачі збільшення розмірів рослин, підвищення швидкості росту і загальної біомаси за рахунок підвищення концентрації гормонів або їх сигналіngu. Так, надекспресія гена найбільш вивченого фермента біосинтеза гібереліну, ГК 20-оксидази, приводила до надзвичайно високої активності фермента ГК 2-оксидази, що деактивує гіберелін. Показано, що інгібування гіберелін-деактивууючого фермента в рослинах тютюну проявлялось у суттєвому покращенні їх ростових характеристик у порівнянні з рослинами дикого типу і рослинами, які надекспресували ген ГК 20-оксидази [115]. Супресія генів *PtGA2ox4* і *PtGA2ox5*, які активні в надземних органах, приводила до значного збільшення розмірів листків (+50%), висоти стебел (+20%), їх діаметру (+10%) і біомаси (+30%) у тополь *Populus*. Не спостерігалось впливу супресії цих генів на розвиток коренів [172].

Транспластомні рослини тютюнів, які експресували β -глюкозидазу (*Bgl-1*), мали в листках вдвічі більший вміст гіберелінів, збільшений рівень інших рослинних гормонів, включаючи зеатин і індол-3-оцтову кислоту, ніж нетрансформовані рослини. Збільшення гормонального фону не спостерігалось в інших органах цих біотехнологічних рослин. Вони зацвітали на 1 місяць раніше, формуючи більшу біомасу (в 1,9 разів) і маючи більшу висоту (в 1,5 разів) і площу листків (в 1,6 разів), ніж нетрансформовані [216].

Збільшення розмірів органів завдяки інтенсифікації ділення клітин (без додаткового росту розтягуванням) спостерігали у рослинах арабідопсису і

тютюну, що експресували ген *ARGOS* (повнорозмірну кДНК з листків китайської капусти і *Arabidopsis thaliana*, відповідно) [242, 462]. Рослини кукурудзи, що надекспресували власний ген *ARGOS1*, мали більшу висоту, формували більшу загальну біомасу за рахунок збільшення стебел і листків, формували більше качанів, які мали більше зерен на качан, ніж контрольні рослини [178].

У трансгенних за геном ізопентеніл-трансферази (*IPT*) з агробактерії *Agrobacterium tumefaciens* (під контролем специфічного для квітки промотора *TP12* з тютюну) ліній вузьколистого люпину (*Lupinus angustifolius* L. сорт Merrit) відмічено суттєве збільшення кількості додаткових пагонів за рахунок розвитку адвентивних бруньок [65]. Експресія *IPT* підвищувала рівень цитокінінів у квітках, тканинах меристем і флоемних ексудатах. Збільшувалась і загальна кількість стручків у деяких трансгенних ліній, хоча розмір насіння достовірно не змінювався у порівнянні з контролем. У трансгенних рослин тютюну, які експресували злитий ген *AOC-IPT*, рівень цитокінінів збільшувався у 2-3 рази. Вони росли швидше, ніж контрольні і трансгенні лише за геном *AOC* (алленоксидциклаза з солестійкої рослини *Bruguiera sexangula*), мали більш довгий період цвітіння, більшу кількість квіток і насіння. У них також підвищувався вміст хлорофілів і на 27% загальна суха біомаса [177].

У проростків трансгенного рису з геном серотонін-*N*-ацетилтрансферази (*NAT*) з вівці збільшувалась біомаса коренів за рахунок впливу трансгенного мелатоніну [328]. Серотонін-*N*-ацетилтрансферазу вважають ферментом, від якого залежить швидкість біосинтезу мелатоніна у тварин. Раніше було показано, що обробка цим гормоном покращує ріст рослин капусти [340] за рахунок його антиоксидантних властивостей [426].

Збільшення в умовах теплиці сухої маси завдяки росту пагонів спостерігали у злака *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. з трансгеном *rolA* з агробактерії *Agrobacterium rhizogenes* [54]. Деякі клони бородатих коренів локриці (*Glycyrrhiza glabra* L.) з геном *rolB* з тієї ж агробактерії були

більш розгалужені і на агаризованому поживному середовищі мали біомасу, майже у 8 разів більшу, ніж корені нетрансформованих рослин [431].

Лінії арабідопсису, що надекспресували ген *pdx2*, задіяний у *de novo* шляху біосинтезу вітаміну В₆ в рослинах, мали значно більші вегетативні і генеративні органи, а також підвищений вміст загального протеїна, ліпідів і вуглеводів [360].

Рослини проса (*Panicum virgatum*), які надекспресували miR156, збільшували свою біомасу, головним чином, за рахунок збільшення кількості пагонів, на 58-101% в залежності від рівня експресії трансгена [159]. Незначна експресія трансгена приводила до підвищення кількості пагонів в 1,6–2,1 разів, середня – у 4,6-6,4 разів, сильна експресія трансгена корелювала із збільшенням кількості пагонів у 5,0–6,0 разів. В останній групі трансгенних рослин спостерігали суттєве пригнічення росту і зниження накопичення біомаси. Рослини із середнім рівнем експресії трансгена були стерильні – не формували квіток.

Селективні гени не спричинюють плейотропного впливу на функціонування рослинного організму і не ведуть до збільшення рослинної біомаси [285, 316, 395]. Так, трансгенні рослини рису (подія LLRICE62) не відрізнялись достовірно за накопиченням біомаси, врожаєм зерна, вмістом мінеральних речовин, вуглеводів і білків від нетрансформованого, вихідного для трансформації сорту у польових випробуваннях [316]. В деяких експериментах в якості контролю використовували трансформовані рослини, що мали лише селективний ген. Не було зафіксовано даних щодо збільшення біомаси трансгенних рослин лише з геном *nptII* [216], або *bar* [316, 414], або *ahas* (ген ацетогідроксіацидсинтази) [395], або *hpt* (ген гігроміцинфосфотрансферази) [388]. Трансгенні рослини пшениці з генами *bar* і *mtlD* (манітол-1-фосфатдегідрогеназа з *E.coli*) формували сиру і суху біомасу за сприятливих умов росту, яка достовірно не відрізнялась від біомаси трансгенних рослин з лише трансгеном *bar* [51].

Генно-інженерні підходи дозволяють досягти максимально двократного збільшення рослинної біомаси як модельних, так і сільськогосподарських культур за умов їх вирощування в оптимальних контрольованих (теплиця або кліматична камера) і польових умовах (табл. 1.1). Трансгенні корені можуть накопичувати біомасу, більшу у вісім разів, у порівнянні з коренями нетрансформованих рослин, у асептичних умовах. Трансгенні рослини, здатні накопичувати більшу біомасу у порівнянні з нетрансформованими контролями, мають підвищену адаптаційну пластичність.

Таблиця 1.1

Збільшення біомаси трансгенних рослин за оптимальних умов вирощування

Вид	Ген	Збільшення біомаси в порівнянні з контролем, раз	Посилання
1	2	3	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Надекспресія пурпурової кислотої фосфатази <i>AtPAP2</i>	2 (загальна сира маса)	[419]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Повнорозмірна кДНК гена <i>BrARGOS</i> з листків китайської капусти	2,2 (сира маса листків)	[462]
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Одночасна надекспресія УДФ-глюкозопірофосфорілази (<i>UGPase</i>), сахарозосинтази (<i>SuSy</i>) і сахарозофосфатсинтази (<i>SPS</i>)	1,5 (висота рослин)	[104]
Тютюн	Надекспресія генів <i>AOC-IPT</i> - транскрипційно злитих ізопентенілтрансферази з агробактерії (<i>IPT</i>) і алленоксидциклази з солестійкої рослини <i>Bruguiera sexangula</i> (<i>AOC</i>)	1,27 (загальна суха маса)	[177]
Трансплас-томний тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	β -глюкозидаза (<i>Bgl-1</i>)	1,9 (загальна сира маса), 1,5 (висота), 1,6 (площа листків)	[216]

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
Рис <i>Oryza sativa</i> L. сорт Taichung 65	Часткова супресія гена <i>OsBR11</i> (<i>BRASSINOSTEROID</i> <i>INSENSITIVE1</i> ортолог з рису)	1,3 (врожай зерна)	[307]
Рис	Експресія гена <i>HARDY (HRD)</i> з арабідопсиса	2 (загальна сира маса)	[226]
Рис сорт Dongjin	Експресія гена серотонін <i>N</i> - ацетилтрансферази (<i>NAT</i>) з вівці	1,44 (сира маса коренів)	[328]
М'яка пшениця (<i>Triticum</i> <i>aestivum</i> L.)	Зниження активності глюкан, вода дікінази (<i>GWD</i>), першого фермента в реакціях фосфорилювання крохмалю	1,29 (врожай зерна) в теплиці	[357]
<i>Panicum</i> <i>virgatum</i> L.	miR156	1,63 – 2,01 (загальна суха маса)	[159]
<i>Bouteloua</i> <i>gracilis</i>	Ген <i>rolA</i> з <i>A. rhizogenes</i> під контролем двох промоторів 35S ВМЦК	2 (загальна суха маса) в умовах теплиці	[54]
Локриця <i>Glycyrrhiza</i> <i>glabra</i>	Ген <i>rolB</i> з <i>A. rhizogenes</i> під контролем <i>nos</i> промотора	8 (загальна сира маса бородатих коренів) <i>in vitro</i>	[431]
Тополя (гібридний клон INRA 717-IB4 (<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i>)	Супресія генів <i>PtGA2ox4</i> і <i>PtGA2ox5</i> , що належать до підродини C19 гіберелін 2- оксидаз (<i>GA2ox</i>)	1,5 (розмір листка), 1,2 (висота стебла), 1,1 (діаметр стебла), 1,3 (сира маса листіків)	[172]
Бавовник <i>Gossypium</i> <i>hirsutum</i> L. зразки 7235 і ТМ-1	Надекспресія гена сахарозосинтази (<i>SusA1</i>)	1,4 (загальна суха маса як на стадії проростків, так і на стадії насіненних коробочок)	[214]

1.1.2. Здатність трансгенних рослин до збільшення біомаси за умов абіотичних стресів. Експресія більшості генів, про які йде мова в цьому

розділі, надає рослинам переваги за стресових умов зростання. Ці трансгенні рослини можуть не відрізнятися від контрольних за оптимальних умов. І біотехнологічні, і контрольні (вихідні) рослини зменшують накопичення біомаси під впливом стресів, але зміни в метаболізмі трансгенних рослин завдяки трансгенезу дозволяють їм краще пристосовуватись до несприятливих умов і формувати більшу біомасу; вони мають кращу адаптаційну пластичність.

Взаємозв'язок між експресією гетерологічних генів і накопиченням біомаси досліджували, насамперед, на прикладі модельних об'єктів (табл.1.2).

Таблиця 1.2

Трансгенні рослини модельних видів, для яких показано збільшення біомаси у несприятливих умовах зростання

Вид	Ген (гени)	Умови	Збільшення біомаси в порівнянні з контролем, раз	Посилання
1	2	3	4	5
Арабідопсис <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Ген фосфатази (<i>PvPs2:1</i>) з квасолі <i>Faseolus vulgaris</i>	Високий вміст фосфору в ґрунті	1,2 (загальна сира маса)	[258]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Ген <i>AtPAP18</i> , що кодує пурпурову кислу фосфатазу з арабідопсиса	Як в умовах достатнього вмісту фосфору, так і за його дефіциту	1,41 (загальна сира маса)	[492]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Ген мітохондріальної малатдегідрогенази (<i>MDH</i>) з мікоризного гриба <i>Penicillium oxalicum</i>	Середовище з фосфатом алюмінію	1,49 (загальна сира маса)	[272]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Ген <i>MDH</i> з мікоризного гриба <i>Penicillium oxalicum</i>	Середовище з фосфатом заліза	1,29 (загальна сира маса)	[272]

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4	5
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Ген MDH з мікоризного гриба <i>Penicillium oxalicum</i>	Середовище з фосфатом кальцію	1,28 (загальна сира маса)	[272]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Ген panD , що кодує l-аспартат - α -декарбоксилазу (AspDC) з <i>Escherichia coli</i>	Висока температура	1,3-1,4 (загальна сира маса)	[272]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	1) Фосфоенолпируват-карбоксилаза (perc); 2) цитратсинтаза (cs); 3) подвійні трансформанти	Al стрес	Висота: 1) 1,2; 2) 1,49; 3) 1,82. Суша маса коренів: 1) 1,33; 2) 2,55; 3) 3,73	[465]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Злитий ген AOC-IPT : ізопентенілтрансфераза (IPT) і AOC (алленоксидциклаза з <i>Bruguiera sexangula</i>)	Посуха	1,39 (загальна суха маса)	[177]

Інтенсивність фотосинтезу зменшується за умов помірно високої температури. Це відбувається за рахунок зниження активності Рубіско через зменшену здатність активації Рубіско досягати оптимума активації цього білка. Лінії трансгенного арабідопсиса, химерні за активацією (домен упізнавання Рубіско арабідопсиса був замінений на такий з тютюну, що є більш термостабільним), демонстрували більш високу інтенсивність фотосинтезу, ніж рослини дикого типу після короткотривалої дії високих температур [243]. Вони також формували більшу біомасу і давали більше насіння у порівнянні з вихідними рослинами після тривалої дії помірно високої температури.

У рослин тютюну зі зміненим шляхом синтезу β -аланіна у хлоропластах через експресію гена *panD*, який каталізує декарбоксилювання

α-аспартата до β-аланина і вуглекислого газу, за умов високотемпературного стресу підвищувалась терmostійкість фотосинтезу і біомаса [156].

Обмежена доступність фосфатних іонів (Pi) і азоту пригнічує ріст рослин у природних екосистемах. У порівнянні з рослинами ріпаку дикого типу трансгенні, які надекспресували аланінамінотрансферазу з ячменю (*AlaAT*) під контролем коренеспецифічного промотору ріпаку (*btg26*), формували більшу біомасу (сиря маса підвищувалась у 1,98 разів, суха маса – у 1,75 разів) і врожай насіння за умов низького вмісту азоту у ґрунті у лабораторних та польових експериментах. Ці зміни дозволили трансгенним рослинам сформувати врожай, рівний урожаю рослин дикого типу, за польових умов при внесенні на 40% меншої кількості азотних добрив, необхідних для контрольних рослин. В той же час не спостерігалось різниці в рості між контрольними і біотехнологічними рослинами, коли вміст азоту був високим [171].

Одним з основних елементів живлення для росту і розвитку рослин є фосфор, але він часто є недоступним у ґрунті, бо при внесенні зв'язується з алюмінієм і залізом у кислих ґрунтах і з кальцієм – у лужних ґрунтах. Збільшення секреції органічних кислот – шлях, яким рослини можуть підвищити доступність фосфору. Значне покращення росту було виявлено у трансгенних ліній тютюну, які надекспресували ген мітохондріальної малатдегідрогенази (*MDH*) з мікоризного гриба *Penicillium oxalicum* і мали найвищі рівні активності MDH та виділення молочної кислоти в порівнянні з рослинами дикого типу [272]. Створення нового шляху синтезу лимонної кислоти через одночасну надекспресію власної цитратсинтази і мутантної (зі зменшеною чутливістю до інгібування органічними кислотами) фосфоенолпіруваткарбоксилази з ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* у цитоплазмі листків трансгенного тютюну приводило до підвищеної толерантності рослин до алюмінію [464].

Біомаса деяких ліній люцерни (*Medicago sativa* L.) з трансгеном *MtPHY1* (ген фітази під контролем коренеспецифічного MtPT1 промотору)

була втричі більшою за таку у контрольних рослин, вирощених на піску з додаванням фітату в якості єдиного джерела фосфору, і вдвічі більшою, коли рослини вирощувались на природних ґрунтах без додавання фосфору [279]. Надекспресія гена *GmEXPB2* (b-експансин сої) приводила до підвищення на 28% сирої маси сої (*Glycine max* (L.) Merr.) на ґрунтах із низьким вмістом фосфору [177].

Дефосфорилювання білків фосфатазами відіграє головну роль у передачі сигналу у процесі відповіді рослин на стрес. Сира маса зростала у трансгенних рослинах арабідопсису, які мали ген фосфатази *PvPs2:1* з квасолі (*Faseolus vulgaris*), більш суттєво у порівнянні з рослинами дикого типу як в умовах низького, так і високого вмісту фосфору. Особливо відчутно це було в останньому випадку і супроводжувалось підвищенням загального вмісту фосфору і загальної довжини коренів [257]. Рослини тютюну з геном пурпурової кислої фосфатази з арабідопсиса (*AtPAP18*) демонстрували достовірне підвищення активності кислої фосфатази, що приводило до збільшення біомаси за умов достатнього і недостатнього забезпечення фосфором [492].

Трансгенні рослини ріпаку з геном *ACC*, що кодує фермент 1-аміноциклопропан-1-карбоксилатдеаміназу, і нетрансформовані рослини, оброблені бактерією *Pseudomonas putida* UW4, яка експресувала той самий ген, мали більшу надземну біомасу у порівнянні з нетрансформованими або необробленими бактерією рослинами в умовах незначного затоплення [152].

Інозитолполіфосфаткіназа (ІПК) задіяна у метаболізмі інозитола, передачі кальцієвого сигналу, відповіді на стрес, транскрипції та інших фізіологічних і біохімічних процесах. Трансгенні рослини сої з геном *ThIPK2* (ІПК із *Thellungiella halophila*) виявляли більшу стійкість до нестачі води, сольового і оксидативного стресів у порівнянні з нетрансформованими контрольними [266]. Більше того, експресія *ThIPK2* змінювала співвідношення жирних кислот у бобах сої через підвищення вмісту

олеїнової (C18:1) кислоти. Збільшувався також розмір бобів у цих біотехнологічних рослин.

Ектопічна експресія антиоксидантних генів приводить до підвищення стійкості рослин до стресів різного походження, що супроводжується формуванням більшої біомаси.

Дегідроаскорбатредуктаза (DHAR) підтримує редокс-пул аскорбінової кислоти (AsA) в циклі окиснений аскорбат – відновлений аскорбат. Рослини рису, які надекспресували власний ген *OsDHAR1*, мали достовірно вищу фотосинтетичну здатність і активність антиоксидантних ферментів за польових умов [234]. У них спостерігали збільшення врожаю зерна і біомаси загалом завдяки підвищенню маси стебел і коріння і збільшенню кількості колосків і волотей.

Ген *AOC* є важливим для солестійкості рослин. В рослинах тютюну, що експресували ген *IPT*, транскрипційно злитий в одній рамці зчитування з геном *AOC*, спостерігали незначне підвищення вмісту цитокінінів, що позитивно впливало на ріст рослин. Суха маса зростала у рослин, отриманих за допомогою векторів *pVKH35S-AOC* і *pVKH35S-AOC-IPT* на 12% і 39%, відповідно, у порівнянні з контрольними за умов посухи у теплиці. Більш відчутні зміни спостерігались за умов засолення, коли рослини поливали морською водою: суха маса рослин зростала на 59% і 37% (*pVKH35S-AOC-IPT* і *pVKH35S-AOC* відповідно) [177].

Аскорбатоксидаза – ще один фермент, що контролює редокс-пул аскорбінової кислоти. Рослини томату (*Solanum lycopersicum*) зі зменшеною активністю аскорбатоксидази через РНК-інтерференцію формували більший врожай плодів за умов водного дефіциту і опадання листків [164]. Вони характеризувались також збільшеною провідністю продихів і вмістом цукрів у листках і плодах, а також зміненим співвідношенням гексоз до сахарози у апопласті.

Гліцин бетаїн – це осмопротектант, який відіграє важливу роль і швидко акумулюється за умов посухи або засолення. Рослини м'якої

пшениці, трансгенні за геном *betA*, який кодує холіндегідрогеназу з *Escherichia coli*, менш потерпали від посухи у порівнянні з рослинами дикого типу, що проявлялось у більшій довжині корінців і кращому рості [192] (табл.1.3).

Таблиця 1.3

Трансгенні рослини злаків, для яких показано збільшення біомаси у несприятливих умовах зростання

Вид	Ген (гени)	Умови	Збільшення біомаси в порівнянні з контролем, раз	Посилання
Рис сорт Ілмі	Ген γ -глутамілцистеїн-синтази (<i>BrECS</i>) з гірчиці <i>Brassica juncea</i> під контролем промотора <i>Rab21</i> , що індукується стресом	Сольовий стрес (100 мМ NaCl)	1,2 (загальна сира маса), 1,1 (сира маса коренів), 1,2 (загальна маса насіння)	[69]
Рис сорт Nipponbare	Ген <i>HARDY (HRD)</i> з арабідопсиса, що кодує транскрипційний фактор AP2/ERF	Посуха	1,5 (загальна сира маса) у теплиці	[226]
Рис	Цитозольна <i>Cu/ZnSOD</i> з <i>Avicennia marina</i>	Сольовий стрес (150 мМ NaCl)	1,7/1,5 (сира/суха біомаса)	[341]
Тверда пшениця (<i>Triticum durum</i>) сорту Karim	Ген <i>AISAP</i> (кодує білок, пов'язаний зі стресом) із галофіта <i>Aeluropus litoralis</i>	Сольовий стрес (50 мМ NaCl)	3 (суха маса листків)	[76]
Тверда пшениця (<i>Triticum durum</i>) сорту Karim	Ген <i>AISAP</i>	Сольовий стрес (150 мМ NaCl)	4 (суха маса листків)	[76]
М'яка пшениця (<i>T. aestivum</i>)	Ген <i>bet A</i> , що кодує холіндегідрогеназу з <i>Escherichia coli</i>	Посуха	1,36 (загальна суха маса)	[192]

Глютатіон (GSH), низькомолекулярний трипептид, що відіграє важливу роль у клітинному метаболізмі в якості антиоксиданта, синтезується завдяки γ -глутамілцистеїнсинтазі (γ -ECS) і глютатіонсинтазі (GS). Трансгенні рослини рису, що надекспресували ген *ECS* з гірчиці (*Brassica juncea* L.) під контролем стрес-індуцибельного *Rab21* промотору, характеризувались помірним збільшенням біомаси (на 20% підвищувалась загальна сира маса і на 10% – сира маса коренів) і зростанням врожаю зерна в 1,2 рази за польових умов [69].

Трансгенні рослини твердої пшениці (*Triticum durum*), отримані на основі комерційного сорту Карім, що експресували AISAP (білок, зв'язаний зі стресом, із злака-галофіта *Aeluropus littoralis*), виявляли покращені схожість і нарощування біомаси за умов засолення і осмотичного стресу [76]. В результаті досліджень у теплиці виявлено, що AISAP лінії продукували нормально виповнені зерна після довготривалих сольового або водного стресів, в той час як рослини дикого типу або гинули на вегетативній стадії за сольового стресу, або формували значно менш виповнене зерно за умов посухи (табл. 1.3).

Холінмонооксигеназа (СМО) є головним каталізатором у синтезі гліцинбетаїна. Врожай насіння рослин бавовника з геном *AhСМО* (холінмонооксигеназа з лободи городньої (*Atriplex hortensis*)) був нижчим, ніж у нетрансформованих рослин за нормальних умов зростання, але достовірно вищим за умов засолення у польових дослідженнях [498] (табл.1.4).

Ізопентенілтрансфераза (ІРТ) – критичний фермент для біосинтеза цитокінінів. Експресія гена *IPT* у рослинах арахісу (*Arachis hypogaea* L.) під контролем SARK промотору, який індукується стресом та в період дозрівання, приводила до затримки викликаного стресом старіння і підвищення стійкості до посухи за лабораторних і польових умов [349]. Трансгенні рослини арахісу мали вдвічі більшу інтенсивність фотосинтезу і транспірації, ніж нетрансформовані рослини за умов нестачі вологи. Це

давало таким рослинам змогу продукувати значно більший урожай у порівнянні з рослинами дикого типу за умов помірного водного дефіциту (50 і 29 г/рослину, відповідно), в той час як за умов достатнього забезпечення водою не спостерігали достовірних відмінностей між трансгенними і вихідними рослинами (врожай 42 і 40 г/рослину, відповідно).

Таблиця 1.4

**Збільшення біомаси деяких важливих сільськогосподарських
трансгенних рослин в умовах стресів**

Вид	Ген (гени)	Умови	Збільшення біомаси в порівнянні з контролем, раз	Посилання
1	2	3	4	5
Люцерна сорт Regen SY-4D	Ген фітази (<i>MtPHY1</i>) з <i>Medicago truncatula</i> під контролем коренеспецифічного промотора MtPT1	На натуральних ґрунтах без додавання фосфору	2 (загальна сира маса)	[279]
Люцерна сорт Regen SY-4D	Ген фітази (<i>MtPHY1</i>) з <i>Medicago truncatula</i> під контролем коренеспецифічного промотора MtPT1	З фітатом як джерелом фосфору	3 (загальна сира маса)	[279]
Люцерна	<i>MnSOD</i> у мітохондріях або хлоропластах	Холодовий стрес	2 (загальна сира маса)	[299]
Ріпак сорт Westar	Ген аланінаміно-трансферази (<i>AlaAT</i>) з ячменю під контролем корене-специфічного промотору (<i>btg26</i>)	Низький вміст азоту	1,98 (загальна сира маса), 1,75 (загальна суха маса)	[171]
Ріпак сорт Youyan No.9	Ген <i>BHO-1</i> (гемоксигенази) з ріпаку	Hg стрес	1,41–1,59 (загальна суха маса)	[400]
Лінія ріпаку DH-12075 (подвійні гаплоїди)	Мітохондріальна Mn супероксиддисмутаза пшениці (<i>MnSOD3.1</i>)	Холод, посуха, висока температура (польові умови і <i>in vitro</i>)	1,4 (загальна сира маса)	[184]

Продовження таблиці 1.4

1	2	3	4	5
Ріпак сорт Westar	Ген 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат-деамінази (<i>ACC</i>) з <i>Pseudomonas putida</i> UW4 під контролем промотора <i>rolD</i> з <i>A. rhizogenes</i>	Затоплення (незначний рівень)	1,34 (загальна суха маса) у польових умовах	[152]
Цукровий буряк (<i>Beta vulgaris</i> L.) сорт Heitian No. 1	Ген вакуолярного Na ⁺ /H ⁺ антипортера (<i>AtNHX3</i>) з арабідопсису	500мМ NaCl	2 (загальна суха маса), 2,2 (загальна сира маса), 2,2 (суха маса коренеплодів)	[264]
Соя (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) сорт HN89	Ген b-експансина сої (<i>GmEXPB2</i>)	Низький вміст фосфору	1,28 (загальна сира маса)	[179]
Арахіс (<i>Arachis hypogaea</i> L.) сорт New Mexico Valencia A	Ізопентенілтрансфераза (<i>IPT</i>) під контролем промотора P _{sark} , що індукується дозріванням і стресом	Посуха (у кліматичній камері)	1,84 -1,61 (сира – суха маса пагонів), 2,88-2,24 (сира – суха маса коренів)	[349]

Як адаптивна відповідь на водний дефіцит у наземних рослин спостерігається швидкий біосинтез абсцизової кислоти (АБК), що викликає закриття продихів для зменшення втрат води за рахунок транспірації. Останні генетичні дослідження встановили, що ключовим негативним регулятором, який контролює чутливість замикаючих клітин до АБК, є фарнезилтрансфераза. Зниження активності цього ферменту в рослинах ріпаку за рахунок РНК-інтерференції з використанням конструкції під контролем промотору гідроксипіруватредуктази приводило до захисту врожаю під час посухи за польових умов [471]. Не спостерігалось відмінностей між генетично модифікованими і нетрансформованими рослинами при культивуванні за оптимальних умов. Однак за помірної

нестачі води у фазі цвітіння біотехнологічні рослини давали достовірно вищий урожай насіння.

Ектопічна експресія гена *SlAIM1*, що кодує транскрипційний фактор R2R3MYB та індукується АБК, приводила до зменшення сухої маси надземної частини і коренів рослин томату у порівнянні з контрольними за нормальних умов вирощування в теплиці [53]. Однак трансгенні помідори росли достовірно краще, ніж нетрансформовані, за умов високого засолення (150, 200 і 250 мМ NaCl).

Різні види рослин дають різні, іноді протилежні, відповіді на введення одного й того ж гена. Експресія Δ^1 -пірролін-5-карбоксилат синтази (P5CS) з вігні (*Vigna aconitifolia* L.) під контролем стрес-індуцибельного промотора приводила до збільшення синтезу відповідного фермента і накопичення більшої кількості проліну у трансгенних рослинах рису [505]. Рослини другого покоління характеризувались збільшенням біомаси за умов сольового стресу і нестачі води у порівнянні з нетрансформованими рослинами. Але у рослин нуту (*Cicer arietinum* L.), які накопичували проліну більше у 6 разів завдяки експресії мутантного гена *P5CS*, не спостерігали покращення росту за умов посухи [78]. Автори вважають, що збільшення вмісту проліну не є головним чинником для суттєвого впливу на врожайність нуту за даних умов.

Трансформація дводольних рослин геном *rolA* приводить до вкорочення міжвузлів, зменшення апікального домінування, утворення темно-зелених листків, листків зі складками, зменшення співвідношення довжини до ширини листків, збільшення розмірів квіток з одночасним зменшенням їх кількості, чоловічої стерильності, запізнення цвітіння [445]. Лінії важливої кормової злакової культури *Bouteloua gracilis*, трансформованої геном *rolA*, формували вдвічі меншу кореневу систему, але мали вдвічі більшу надземну біомасу у порівнянні з нетрансформованим контролем через більшу висоту (на 30%) і підвищену кількість пагонів і листків (більше в 1,7 і 1,5 раз, відповідно) [54].

Таким чином, трансгенез дозволяє рослинам формувати (найчастіше) вдвічі більшу біомасу, ніж продукують нетрансформовані рослини, за умов стресів (табл.1.2 – 1.4).

1.2. Антиоксидантна активність рослин

Утворення активних форм кисню (АФК), включаючи вільні радикали, є невід'ємною складовою метаболізму рослин [9, 227]. АФК можуть відігравати важливу роль у багатьох біологічних процесах як інтегративні сигнальні молекули, які функціонують разом з іншими сигнальними шляхами [301]. Поєднання стрес-залежної надпродукції АФК з ауксиновим сигнальним шляхом приводить до стрес-індукованої морфогенетичної відповіді [301, 422]. За умови, коли у рослинних клітинах підтримується відповідний окислювально-відновний рівень за рахунок балансу утворення і знешкодження АФК, рослина нормально росте і розвивається. Під дією помірного стресу виживання рослин забезпечується індукцією антиоксидантного захисту для того, щоб контролювати низькі рівні АФК і підтримувати редокс-баланс. Оксидативний стрес настає, коли окислювально-відновний баланс порушується або через підвищену продукцію АФК, або через виснаження антиоксидантного захисту, або через поєднання обидвох причин. Він веде до клітинного колапсу і відмирання (некрозу) у рослин [9, 227].

Антиоксидантна активність рослинних тканин характеризує їх здатність протидіяти надмірній кількості АФК (супероксид-радикал, гідроксил-радикал, синглетний кисень, перекис водню), які утворюються внаслідок процесів фотосинтезу, дихання, фотодихання, а також при роботі спеціалізованих ферментативних систем – НАДФН-оксидази плазмалеми та ін., особливо за екстремальних умов – висока інсоляція, підвищена або низька температура, посуха, вимокання, засолення, ураження патогенами [10, 118]. Антиоксидантна активність забезпечується відповідною системою

рослин, яка представлена ферментами (супероксиддисмутази, пероксидази, каталази) і низкою низькомолекулярних сполук (пролін, глутатіон, токоферолі, аскорбінова кислота, жирні кислоти, поліфеноли (антоціани, флавоноїди, ароматичні оксікислоти) [188]. Їх координована активність захищає клітинні структури рослин від пошкодження АФК [207, 256, 303] і забезпечує ріст і розвиток [260]. Показано, що підвищення НАДФН-оксидазної активності корелювало з підвищенням вмісту пероксиду водню та індукцією мітотичної активності у васкулярних циліндричних клітинах гіпокотилів кришталевої травички *Mesembryanthemum crystallinum*, які культивувались на середовищах з нафтилоцтовою кислотою. Це приводило до утворення коренів з культивованих гіпокотилів [260]. Інгібітор НАДФН-оксидаз, діфенілйодоніум, інгібував утворення H_2O_2 і ризогенез. Ультраструктурні дослідження показали, що супероксид-радикали відповідають за ініціацію утворення коренів за рахунок ділення компетентних клітин, а пероксид водню регулює розвиток через ріст клітин [260]. Проміжною ланкою, яка відповідає за утворення H_2O_2 з супероксиду, в обидвох процесах задіяні супероксиддисмутази (СОД).

Підвищення антиоксидантної активності позитивно впливає на здатність рослин протистояти стресовим факторам різного походження [233, 325, 356] і покращує їх адаптивну пластичність. Відмічено, що стійкість до низьких температур у люцерни позитивно лінійно корелює з активністю антиоксидантних ферментів [466]. Крім того, продемонстровано позитивний вплив рослин з високою антиоксидантною активністю на стан здоров'я людей і тварин, що їх вживають [56, 162]. Так, показано, що ефірна олія листків тропічної рослини *Hoslundia opposita* (Lamiaceae) може використовуватись для лікування діабету другого типу через здатність знижувати рівень глюкози в крові. Прийом 110 мг/кг маси тіла цієї ефірної олії протягом чотирьох діб практично нормалізував глікемічний рівень у діабетичних щурів [56]. Дослідження рослин, які традиційно використовуються у медицині латино-американських країн, а також трав і

прянощів щодо вмісту фенолів, антиоксидантної активності та здатності *in vitro* інгібувати ключові ферменти, що задіяні при діабеті та підвищеному кров'яному тиску, підтвердило їх потенціал у лікуванні гіперглікемії і гіпертензії, які пов'язані з діабетом другого типу [162]. Високий вміст фенолів і підвищена антиоксидантна активність, характерні для філантуса (*Phyllanthus niruri* L.), сарсапарелі (*Smilax officinalis*), мате (*Ilex paraguayensis* St-Hil) і бархатців (*Tagetes minuta*), корелювали з найвищою антиглікемічною активністю, виміряною за інгібуванням α -глюкозидази *in vitro*, і не впливали на активність α -амілази. Шинус м'який (*Schinus molle*), мака перуанська (*Lepidium meyenii* Walp), циклантера істівна (*Cyclanthera pedata*) та імбир (*Zingiber officinale*) достовірно інгібували ангіотензін перетворюючий фермент (АПФ), що відповідає за підвищений тиск крові. Всі проаналізовані види перцю (*Capsicum*) виявляли як антиглікемічну, так і антигіпертензивну активність [162].

Найвищою антиоксидантною активністю характеризуються фрукти, далі – ягоди, горіхи, насіння і висушені фрукти; овочі; коренеплоди; боби; злаки [185]. Рослини, які використовуються у народній медицині у різних регіонах світу, мають високу антиоксидантну активність [251, 488].

Антиоксидантна активність інтенсивно вивчається у важливих сільськогосподарських культур і рослин, що використовуються у медицині [57, 60, 89, 137, 220]. Значна увага приділяється дослідженням антиоксидантної активності у рослин, які використовуються в їжу як прянощі [479]. Серед 32 видів рослин, що належать до дев'ятнадцяти родин, найвищою загальною антирадикальною активністю, виміряною за допомогою DPPH-методу, характеризувались такі рослини, як кипрей волосистий (*Epilobium hirsutum*, Onagraceae), гвоздичне дерево (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), розмарин звичайний (*Rosmarinus officinalis*, Labiatae), пижмо звичайне (*Tanacetum vulgare*, Compositae), гуньба сінна (*Trigonella foenum-graecum*, Leguminosae), чистотіл звичайний (*Chelidonium majus*, Papaveraceae). Вони мали активність, що дорівнювала 2021; 884; 513; 469;

364; 300 у тролоксовому еквіваленті (мкМ trolox/100 г сухої маси), відповідно. Загальна антирадикальна активність варіювала серед аналізованих трав від 7,34 до 2021 мкМ trolox/100 г сухої маси [479].

Порівняння антиоксидантної активності сирої та сухої біомаси рослин меліси лікарської (*Melissa officinalis*), материнки звичайної (*Origanum vulgare*), м'яти перцевої (*Mentha piperita*) показало, що значення, отримані за допомогою DPPH-методу, вищі у екстрактах свіжих рослин. У висушених рослинах спостерігається зменшення вмісту аскорбінової кислоти і каротиноїдів і зниження за рахунок цього загальної антирадикальної активності [89].

Антирадикальна активність у проростків бобів (*Vicia faba*), отриманих після мікрохвильової обробки насіння, підвищувалась за рахунок зростання у 7 разів вмісту фенолів і на 59% вмісту лево-дигідрокси-фенілаланіну, який вивчається як попередник дофаміну для лікування хвороби Паркінсона [359].

Зафіксовано відмінності за антиоксидантною активністю у рослин одного виду, що росли у різних умовах оточуючого середовища [319, 480]. Активність СОД і вміст каротиноїдів був вищим у альпійських рослин (1500-2000 м над рівнем моря, північно-західна частина Анатолійського плоскогір'я) у порівнянні з рослинами степової зони (850-1000 м, центральна частина Анатолійського плоскогір'я) [319]. Вміст проліна і сумарного розчинного білка також був вищим у альпійських рослин, в той час як не спостерігалось відмінностей за вмістом хлорофілів в залежності від висоти зростання [319].

Показано відмінності у антиоксидантній активності між сортами рослин одного виду, отриманими з використанням методів традиційної селекції [224, 225, 466]. Рослини шести сортів люцерни, що різнились за швидкістю проростання насіння, біомасою проростків, довжиною пагонів і коренів, мали відмінності і за активністю антиоксидантних ферментів [466].

Деякі речовини можуть впливати на антиоксидантну активність рослин, змінюючи як активність антиоксидантних ферментів, так і загальну

антирадикальну активність [481]. Так, фітотоксин коронатин, що індукує хлороз, впливає на рослини подібно метилжасмонату. Обробка коронатином проростків бавовника зменшувала негативний вплив сольового стресу (150 мМ NaCl) за рахунок підвищення як активності антиоксидантних ферментів, так і підвищення активності проти DPPH-радикалу.

У трансгенних рослин антиоксидантну активність досліджували, головним чином, у тих з них, що були отримані в результаті генетичної трансформації генами, експресія яких мала б вплинути на антиоксидантний статус [257, 355]. Трансгенні рослини також використовували як моделі для вивчення процесів росту і розвитку, досліджуючи як активність ферментів антиоксидантного захисту, так і вплив змін вмісту низькомолекулярних антиоксидантів на морфогенез.

1.3. Супероксиддисмутаза: перший фермент антиоксидантного захисту

1.3.1. Властивості рослинних супероксиддисмутаз. Першим ферментом, задіяним в процесі детоксикації АФК, є супероксиддисмутаза (СОД, ЕС 1.15.1.1). Вперше досліджений McCord & Fridovich у 1969 р. [297], він реагує з супероксидом з утворенням перекису водню і кисню.

Вміст СОД складає від 1,6 до 2,4% вмісту загального розчинного білка у проростках кукурудзи (*Zea mays* сорт Michigan 500), гороху (*Pisum sativum* сорт Wando) і вівса (*Avena sativa* L. сорт Au Sable) [168].

В рослинах відомо три ізоформи СОД, які відрізняються металами в активному центрі. Це можуть бути цинк і мідь (Cu/ZnСОД), марганець (MnСОД) або залізо (FeСОД) [157, 351]. Всі ізоформи кодуються ядерними генами і спрямовуються до відповідних субклітинних компартментів за допомогою сигнальних пептидів [82, 336]. В мітохондріях локалізується MnСОД, тоді як FeСОД – у хлоропластах [205, 301] і в цитозолі [309]. Cu/ZnСОД активна в цитозолі, хлоропластах і пероксисомах та представлена

щонайменше у трьох ізоформах [85, 223]. Еукариотична Cu/ZnСОД є чутливою до цианідів, в той час як активність інших двох (MnСОД і FeСОД) не інгібується цими сполуками. FeСОД інактивується перекисом водню, в той час як MnСОД – ні [389].

Кількість ізоформ СОД та їх співвідношення є специфічними для кожного виду. У рослинах кукурудзи відомо десять ізоформ СОД: чотири цитозольні Cu/ZnСОД, чотири мітохондріальні MnСОД та Cu/ZnСОД і FeСОД, які знаходяться у хлоропластах [446]. У геномі арабідопсиса виявлено три гена для FeСОД, три – для Cu/ZnСОД і один, що кодує MnСОД [237].

Загальна активність СОД у листках квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.) за оптимальних умов складалась з активності MnСОД (45%), FeСОД (30%), хлоропластної і цитозольної Cu/ZnСОД (15% і 10%, відповідно) [423], в той же час у листках тополь (*Populus tremula* x *Populus alba*) і кукурудзи активність FeСОД не зафіксована [61, 103]. Рослини, які знижують активність Cu/ZnСОД і підвищують активність FeСОД за умов нестачі міді (наприклад, *A. thaliana*, гірчиця посівна (*Brassica juncea*), томат, рис), здатні підтримувати детоксикацію супероксида і зберегати мідь для накопичення пластоціаніну, що суттєво для фотосинтезу [103].

Активність різних ізоформ СОД неоднакова у процесах розвитку, а також за умов біотичних і абіотичних стресів. Цитозольна Cu/ZnСОД має вищу активність, ніж MnСОД у насінні тютюну. При проростанні насіння активність MnСОД знижується, а активність Cu/ZnСОД – підвищується [254].

Поєднання нестачі світла та низької температури приводило до інгібування Cu/ZnСОД у листках огірка (*Cucumis sativus* L.) за рахунок збільшення до трьох разів вмісту перексиду водню [101]. Це викликало пригнічення фотосинтезу через інактивацію фотосистеми I.

Нестача марганцю не знижувала активності MnСОД, натомість підвищувала активність FeСОД і Cu/ZnСОД і, таким чином, загальну

активність СОД у молодих листках шовковиці білої (*Morus alba* L.) [434]. За фізіологічних умов чутливий до надлишку Mn сорт райграсу (*Lolium perenne* L.) виявляв нижчу загальну активність СОД, ніж Mn-стійкий, і ця відмінність ставала більш виразною за надмірного вмісту Mn, який буває на кислих ґрунтах. У рослинах Mn-стійкого сорту активність FeСОД підвищувалась до 5 разів у порівнянні з рослинами чутливого до марганцю сорту. Індуковане Mn підвищення експресії MnСОД і Cu/ZnСОД спостерігали скоріше, ніж у випадку FeСОД ізоформи [363]. Диференціальна регуляція ізоформ СОД за умов водного дефіциту дає можливість використовувати ці ферменти в якості біохімічних індикаторів для вивчення оксидативного стресу, що його індукує нестача води [84]. Активація СОД і аскорбатпероксидази за умов низьких температур показана для рослин *Stylosanthes guianensis* Schumach. &Thonn. [503].

У мутантів квасолі, дефектних за MnСОД (*sodPv1*) або за FeСОД (*sodPv2*), спостерігали нормальний ріст завдяки підвищеній активності Cu/ZnСОД на стадії проростків і на рівні цілої рослини. Ці мутанти, оброблені арсеном, зберігали здатність до нормального росту; у них не виявлено достовірного підвищення акумуляції активних форм кисню. У подвійних мутантів повна відсутність як MnСОД, так і FeСОД супроводжувалась достовірним зниженням активності Cu/ZnСОД, що приводило до накопичення АФК у великих кількостях і виявлялось у вигляді некротичних плям на фотосинтезуючих органах як за умов обробки арсеном, так і за його відсутності [424].

Мутанти *Arabidopsis* без шаперона міді для СОД, який доставляє мідь до фермента Cu/ZnСОД, не відрізнялись від рослин дикого типу за фенотипом і фотосинтетичним потенціалом, хоча у них не було зафіксовано активності СОД у хлоропластах і цитозолі, а загальна СОД активність була представлена лише активністю MnСОД [103].

Найвища температура, за якої детектувалась активність СОД у водних рослинах *Hydrilla verticillata* L., дорівнювала 45°C. Підвищення температури

приводило до падіння активності, ймовірно, за рахунок денатурації білка [324].

1.3.2. Активність СОД і особливості ростових процесів *in vitro*. Деякі проблеми, пов'язані з труднощами введення в культуру *in vitro* і маніпуляціями під час культивування, можуть бути пояснені оксидативним стресом і продукуванням АФК.

Достовірне підвищення активності ферментів СОД спостерігали у процесах як зиготичного, так і соматичного ембріогенезу у гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) [70]. В першому випадку спостерігали активність однієї ізоформи MnСОД і п'яти ізоформ Cu/ZnСОД, в той час як при проходженні соматичного ембріогенезу експресувались одна ізоформа MnСОД і одна – FeСОД. Автори припускають, що труднощі в роботі з гіркокаштаном в асептичних умовах можуть бути пов'язані з оксидативним стресом *in vitro* і особливостями функціонування ферментів СОД за цих умов.

Високий рівень активності СОД визначав здатність до ембріогенезу і розвиток соматичних ембріодів у банана *Musa* [278]. Активність СОД поступово підвищувалась після перенесення ембріогенних клітин на середовище для регенерації. Це супроводжувалось підвищенням вмісту пероксиду водню в тканинах, яке сягало максимуму на стадії проембріо. Потім вміст H_2O_2 поступово знижувався. Вміст пероксиду водню і активність антиоксидантних ферментів були вищими у клітин, здатних до ембріогенезу порівняно з неембріогенними клітинами [278].

Підвищення активності СОД детектували під час формування калюсу і регенерації пагонів у стеркулії пекучої (*Sterculia urens*) [128]. В 30-добовому калюсі, що регенерував, активність СОД була вищою у порівнянні з контролем (експланти сім'ядолей) і калюсі, не здатному до регенерації, в 4,5- і 1,2 рази, відповідно. Підвищена активність антиоксидантних ферментів

супроводжувалась підвищенням вмістом білка і знизеними загальним вмістом фенолів і вмістом флавоноїдів у регенеруючих пагонах [128].

Вища концентрація H_2O_2 і знизена активність каталази були зафіксовані у морфогенному калюсі кришталеві травички (*Mesembryanthemum crystallinum*), ніж у калюсі, не здатному до морфогенезу [259]. В калюсних культурах спостерігали достовірні відмінності активностей хлоропластної FeСОД і цитозольної Cu/ZnСОД, при чому найбільше підвищення активності відмічено у останньої ізоформи.

Здатність до соматичного ембріогенезу підвищувалась у дерези звичайної (*Lycium barbarum*) і астрагала (*Astragalus adsurgens*) за обробки пероксидом водню або при інгібуванні ферментів, що приводять до розпаду H_2O_2 , – каталази (обробкою амінотріазолом або саліциловою кислотою) і аскорбат пероксидази (обробкою саліциловою кислотою) [110, 276]. Максимальна активність СОД спостерігалась в ембріогенних тканинах дерези до стадії утворення многоклітинного ембріоїда. Інгібітор активності СОД, діетилдітіокарбамат, знизував активність СОД до 80% і це зменшувало ефективність соматичного ембріогенезу. Обробка пероксидом водню в концентрації 200 мкМ максимально підвищувала ембріоїдогенез у дерези, в той час як обробка H_2O_2 в концентрації 300 мкМ інгібувала формування соматичних ембріоїдів [110]. Максимальне підвищення соматичного ембріоїдогенезу у астрагала спостерігали після додавання саліцилової кислоти в концентрації 150 мкМ до середовища для регенерації. Це супроводжувалось підвищенням вмісту пероксиду водню в рослинній клітинах [276]. Виявлено, що передобробка клітин астрагалу діметилмочевиною, яка блокує H_2O_2 , приводила до зменшення ембріоїдогенезу навіть на середовищах з оптимальним вмістом саліцилової кислоти.

Експресія трансгена *SOD*, який кодував хлоропластну Cu/ZnСОД томату, покращувала регенерацію рослин перцю (*Capsicum annuum*) [91].

Трансгенні рослини перцю першого і другого покоління мали до 30% вищу регенераційну здатність порівняно з нетрансформованим контролем.

Трансгенні рослини сливи (*Prunus domestica* сорт Claudia verde), які експресували цитозольну Cu/ZnСОД з шпинату (*Spinacia oleracea*) і цитозольну аскорбатпероксидазу з гороху (*Pisum sativum*), характеризувались прискореними темпами розмноження за умов *in vitro* [148]. Рослини сливи, які були трансгенні лише за геном аскорбатпероксидази, не відрізнялись від нетрансформованого контролю за темпами мікророзмноження в асептичних умовах. Всі біотехнологічні рослини сливи з високою здатністю до мікророзмноження накопичували значні кількості пероксиду водню [148].

Активність СОД і вміст білка зменшувались під час регенерації калюсу шафрану звичайного (*Crocus sativus* L.), який було отримано з меристем. Але в регенерантах активність СОД підвищувалась, тоді як активність каталази, пероксидаз і поліфенолоксидаз знижувалась [450].

Антиоксидантні ферменти і, зокрема, СОД впливають на процеси диференціації *in vitro*. З підвищеною активністю СОД пов'язана підвищена здатність до відповіді на маніпуляції в асептичних умовах.

1.3.3. Зміни активності СОД за нормальних умов росту і розвитку рослин. В якості моделей для вивчення впливу змін активності СОД на параметри рослин використовували трансгенні рослини з підвищеною або зниженою експресією генів *SOD* (табл.1.5-1.7).

Знижена активність СОД досліджена на рослинах арабідопсиса, у яких активність власного гена *MnSOD* була інактивована за допомогою антисенсової конструкції [306]. Було відібрано дві лінії, у яких спостерігали зменшення рівня транскриптів *MnSOD* до 80% і рівня білка MnСОД до 70% і 60%, відповідно. У цих рослин достовірно (в 1,4 разів) зменшувався ріст коренів, але ріст надземної частини не відрізнявся від контролю. У рослин, які вирощувались у ґрунті, спостерігали затримку цвітіння. Вони характеризувались підвищенням продукування біомаси за рахунок

подовження періоду вегетативного росту. У старіючому листі зменшена активність мітохондріальної СОД приводила до підвищення загальної антиоксидантної активності через підвищену активність аскорбат- та глутатіонпероксидаз і FeСОД, а також підвищений рівень буферних сполук – глутатіона (на 50%) і аскорбінової кислоти (на 43%).

Таблиця 1.5

Особливості рослин з підвищеною за фізіологічних умов активністю СОД завдяки експресії гетерологічних генів *MnSOD*

Цільова рослина	Донор гена	СОД, *	Тип стресу, до якого зафіксована підвищена толерантність	Фенотип за сприятливих умов (у порівнянні з контролем)	Посилання
1	2	3	4	5	6
Ріпак <i>Brassica napus</i> , сорт Westar	<i>Triticum aestivum</i>	2,5	Важкі метали (алюміній); метилвіолоджен	Не вивчався	[74]
Ріпак, дигаплоїдна лінія DH-12075	<i>Triticum aestivum</i>	1,4	Холод, посуха, підвищена температура (<i>in vitro</i> і в ґрунті)	Більша біомаса, прискорений вегетативний ріст, прискорене зацвітання	[184]
Тютюн <i>N. tabacum</i> сорт PBD6	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	2-4 – у Chl, 8 – у Mt	Озон (тільки за експресії у хлоропластах)	Відмінностей немає	[447]
Томат <i>Solanum lycopersicon</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	2	NaCl, метилвіолоджен	Не вивчався	[469]
Рис <i>Oryza sativa</i> L.	Дріжджі <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,7	NaCl, метилвіолоджен	Відмінностей немає	[428]
Люцерна <i>Medicago sativa</i>		2	Перезимовування	До двох разів більша біомаса у польових дослідках	[299]

Продовження таблиці 1.5

1	2	3	4	5	6
Тополя <i>Populus davidiana</i> x <i>P. bolleana</i>	<i>Tamarix androsowii</i>	1,3	NaCl	Відносний вміст МДА та електропровідність були нижчими. Фенотипово нормальні рослини	[472]
Петунія <i>Petunia hybrida</i>		Н.о.	NaCl, холод, метилвіолоджен	Більша біомаса, зміни у розмірах квіток	[252, 253]

* – Підвищення загальної активності, разів, у перерахунку на СРБ; МДА – малонілдіальдегід; Н.о. – не обчислювали; Chl – хлоропласти; Mt – мітохондрії.

Одночасна експресія MnСОД у хлоропластах і мітохондріях у рослин трансгенної люцерни приводила до зменшення активності цього ізоферменту на 13% від загальної активності СОД та зростання ізоформи Cu/ZnСОД. Автори припускали, що це зменшення відбувалось не за рахунок мовчання трансгена, а через зменшення експресії власних генів *MnSOD* або відповідних білків [384].

Cu/ZnСОД-ізоформи локалізовані у хлоропластах і цитозолі. Аналіз фізіологічних і біохімічних характеристик рослин арабідопсиса KD-SOD, у яких не працювала хлоропластна Cu/ZnСОД за рахунок делеції (кнокдауна), виявив знижену інтенсивність фотосинтезу і знижений вміст хлорофілів. Однак вміст окиснених білків (як показник оксидативного стресу) достовірно не відрізнявся у трансгенних рослин у порівнянні з рослинами дикого типу. Рівень редукованого глутатіона був лише незначно підвищений у KD-SOD рослин. Фарбування *in situ* на наявність супероксиду не виявило відмінностей між контрольними і трансгенними рослинами, які

культивувались за нормальних умов. KD-SOD рослини зацвітали пізніше, принамні на три дні; однак формували фертильне насіння [363].

Рослини тютюну, які експресували цитозольну Cu/ZnСОД з рису з хлоропластним транзитним пептидом глітатіонредуктази арабідопсиса, демонстрували підвищену толерантність до метилвіолоджену і сульфїту натрію як супероксид-генеруючим агентам. Активність СОД в хлоропластах була значно вища, ніж у рослин дикого типу. Крім того, трансгенні рослини були більш стійкими до сольового стресу і водного дефіциту, індукованому додаванням поліетиленгліколя (ПЕГ) [68], що проявлялось у накопиченні більшої біомаси за рахунок меншого пошкодження фотосинтетичного апарату дією АФК під час стресів.

Таблиця 1.6

Особливості рослин з підвищеною за фізіологічних умов активністю СОД завдяки експресії гетерологічних генів *Cu/ZnSOD* і *FeSOD*

Цільова рослина	Ген	СО Д*	Тип стресу, до якого зафіксована підвищена толерантність	Фенотип за сприятливих умов (у порівнянні з контролем)	Посилання
1	2	3	4	5	6
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Cu/ZnSOD</i>	1,37	NaCl	Відмінностей немає	[169]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Cu/ZnSOD</i>	3	Інтенсивне освітлення; низька температура	Активність аскорбат пероксидази вища у 3-4 рази; вища фотосинтетична активність	[181]
Цукровий буряк <i>Beta vulgaris</i> , інбредна лінія 028	Цитозольна <i>Cu/ZnSOD</i> Хлоропластна <i>Cu/ZnSOD</i>	Н.о.	Чистий церкоспорин; інокуляція спорами <i>Cercospora beticola</i> ; метилвіолоджен	Відмінностей немає	[433]

Продовження таблиці 1.6

1	2	3	4	5	6
Рис <i>Oryza sativa</i> var Pusa Basmati-1	Цитозольна Cu/ZnSOD	2	NaCl, метилвіолоджен посуха	Не вивчався	[341]
Бавовник <i>Gossypium hirsutum</i> сорт Zhongmiansuo 35	Cu/ZnSOD Cu/ZnSOD та APX Cu/ZnSOD та CAT	1,6 (Chl – 4,4) 2,4 (Chl – 6,3) 2,6 (Chl – 7,7)	NaCl, метилвіолоджен	Підвищена швидкість вегетативного росту і біомаса	[277]
<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i>	FeSOD	10,4	Метилвіолоджен, низький парціальний тиск CO ₂	Відмінностей немає	[61]
<i>N. tabacum</i> сорт Petit Havana SR1	FeSOD	1,8	Метилвіолоджен	Не вивчався	[448]
Кукурудза <i>Zea mays</i> var H99	FeSOD	Н.о.	Метилвіолоджен	Підвищена швидкість вегетативного росту і біомаса	[235]

Втрата значної частки антиоксидантного захисту через неактивність деяких СОД-ферментів може компенсуватись за рахунок інших компонентів цієї системи і часто не приводить до катастрофічних змін для рослин у стресових ситуаціях. Ймовірно, тому спроби надзвичайно підвищити толерантність до несприятливих умов за рахунок надекспресії ферментів СОД розчарували: занадто високі (більші в 30-50 разів) показники активності СОД або не впливали на фенотипові характеристики [432], або рослини не були здатні до виживання [74] (активність СОД у листі трансгенного ріпаку була більша за контроль у 5 разів).

Слід зазначити, що рослини, які мають *SOD* трансген, не завжди характеризуються збільшенням кількості цього білка та підвищенням його активності. Так, рослини тютюну, що надпродукували *FeSOD*, мали лише половину ендогенної активності *FeSOD*, яку детектували у нетрансформованих рослин [448]. Автори припускали, що причиною цього могла бути супресія ендогенної активності *FeSOD* гетерологічною *SOD*, або формування гетеродімерів між ендогенною і трансгенною формами. Зниження активності *MnSOD*-ізоформи за умов стресу, викликаного обробкою арсеном, у листках квасолі дикого типу і мутантів не корелювало з підвищеним рівнем відповідних транскриптів, що свідчить про ймовірну регуляцію цієї ізоформи на посттрансляційному рівні [425]. У деяких ліній кукурудзи виявляли трансген і детектували активність *SOD*, яка не відрізнялась від такої у нетрансформованих рослин [235].

В той же час в експериментах з рослинами картоплі показано позитивну кореляцію рівнів транскриптів гетерологічних генів *Cu/ZnSOD* та аскорбат пероксидази із толерантністю рослин до оксидативного стресу, індукованого паракватом [429].

Активність *SOD* зростала до 7 разів у листках трансгенних тополь, що експресували одну копію *FeSOD* із *Arabidopsis*, але збільшення сягало 10 разів, коли у рослинах були активними дві копії трансгена [61].

Експресія деяких інших гетерологічних генів може впливати на активність *SOD* в трансгенних рослинах, змінюючи їх фізіологічні та біохімічні параметри (табл. 1.7).

Збільшення експресії генів цитозольної і хлоропластної *Cu/ZnSOD* показано у рослин *Medicago truncatula*, які надекспресували власну тірозил-ДНК-фосфодіестеразу-2, в результаті кількісного ПЛР-аналізу в реальному часі, але активність *SOD* не оцінювали [69]. Трансгенні рослини характеризувались продукуванням більшої біомаси і підвищеним вмістом хлорофілів за фізіологічних умов, а також за умов осмотичного стресу. Крім

того, вони демонстрували меншу пошкодженість ДНК за умов стресу і підвищення активності інших антиоксидантних ферментів [105].

Таблиця 1.7

**Особливості рослин з підвищеною за фізіологічних умов активністю
СОД завдяки експресії різних гетерологічних генів**

Цільова рослина	Ген	СОД	Тип стресу, до якого зафіксована підвищена толерантність	Фенотип за сприятливих умов (у порівнянні з контролем)	Посилання
1	2	3	4	5	6
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>TsRfBP</i> (рібофлавінзв'язуючий білок)	1,1	Водний дефіцит (ПЕГ 6000)	Підвищена швидкість вегетативного росту і біомаса	[126]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>ICE1</i>	3	Холод (-4 °C)	Низький вміст хлорофіла	[134]
Тютюн <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>OxO</i> (оксалат оксидаза)	1,3-1,35	Метилвіолоджен підвищена інтенсивність світла	Підвищений синтез транскриптів генів Cu/ZnSOD, CAT1, хлоропл. APX, цитозольної APX і GR	[461]
Тютюн сорт W38	<i>TaPIMP1</i> (MYB)	1,31	Осмотичний стрес (ПЕГ), сольовий стрес, метилвіолоджен, <i>Ralstonia solanacearum</i>	Підвищений вміст хлорофілів	[263]
Тютюн	<i>OjERF</i> (ethylene response factor)	1,63	Посуха	Активація стрес-генів, інші відмінності не вивчалися	[255]
Томат	<i>mt-1</i> (металотіонеїн-1)	1,2	Не вивчали	Підвищення вмісту цинку у 1,6 разів	[401]

Продовження таблиці 1.7

1	2	3	4	5	6
Томат <i>Solanum lycopersicum</i>	ZAT12 , що кодує C ₂ H ₂ zinc finger транскрипц. фактор	1,69	Посуха	Відмінностей немає	[356]
Рис <i>Oryza sativa</i> ssp. japonica сорт Zhonghua 11	OsSAMD-C (S-adenosyl methionine decarboxylase)	Зниження в 1,2 рази	Посуха, соле-стійкість	Зниження проростання насіння, розмірів рослин, фертильності пилку, врожаю зерна на рослину, вихід фотосинтеза	[96]
<i>Medicago truncatula</i>	MtTdp2a (тірозил-ДНК фосфодіестераза 2)	Н.о. Синтез з транскриптів генів <i>SOD</i> збільшений у 1,4 рази	Метилвіолоджен, ципрофлоксацин, осмотичний стрес (ПЕГ 6000)	Підвищені біомаса та синтез транскриптів гена <i>APX</i>	[105]

Трансгенні рослини з підвищеною за фізіологічних умов активністю СОД іноді не мають фенотипових відмінностей від вихідних рослин [61, 169, 356, 427, 432, 446, 471] або ці зміни не вивчалися [74, 257, 342, 448, 469]. Але часто вони продукують більшу біомасу [105, 126, 184, 235, 252, 253, 277, 299], мають скорочений вегетативний період [126, 184, 235, 277] і зміни у функціонуванні фотосинтетичного апарату [96, 134, 181, 263] у порівнянні з рослинами дикого типу та/або трансгенними рослинами, які були трансформовані вектором лише з селективним геном. Для більшості рослин з підвищеною за нормальних умов активністю СОД підтверджена вища

толерантність до стресів різного походження в експериментах за лабораторних умов і у польових дослідженнях.

Таким чином, біотехнологічні рослини зі збільшеною за нестресових умов активністю СОД можуть характеризуватися підвищеною адаптивною пластичністю у порівнянні з рослинами, у яких активність цього фермента є нижчою.

1.3.4. Вплив експресії гетерологічних генів на активність СОД за умов стресів різного походження. Трансгенні рослини однієї і тієї ж лінії по-різному збільшують активність СОД за різних стресових умов. Так, біотехнологічні рослини тютюну, що експресували ген протеїнкінази (*GhMPK2*) з бавовника за умов нестачі вологи, викликаній ПЕГ 6000, підвищували активність СОД на 30% у порівнянні з нетрансформованими рослинами, а за умов сольового стресу це підвищення сягало 50% [500]. Ген *GhMPK2* може слугувати точкою взаємозв'язку у реакціях рослин на абіотичний і біотичний стреси. Ектопічна експресія цього гена приводила до підвищення стійкості до патогенних грибів (*Fusarium oxysporum* та *Phytophthora parasitica*) та вірусів (вірус тютюнової мозаїки та вірус мозаїки огірка). Автори вважають, що підвищення стійкості до патогенів могло відбуватись за рахунок підвищеного конститутивного базального рівня стійкості, тому що у неінфікованих рослин спостерігали збільшену експресію генів, пов'язаних з патогенезом і біосинтезом етилена.

Рослини тютюну з трансгеном тілакоїд-зв'язаної аскорбатпероксидази томату (*StAPX*) під контролем 35S промотору ВМЦК демонстрували збільшену толерантність до супероксид-продукуючого метилвіолоджено у дуже високій концентрації (200 мкМ) порівняно з нетрансформованими рослинами. Зазвичай для тестування стійких до цього агента рослин використовують розчини з концентрацією 5 мкМ. Активність СОД у рослин тютюну з трансгеном *StAPX* збільшувалась в залежності від тривалості

стресу: через 3 доби вона була вищою за контроль на 60%, через 4 – на 80%, через 5 діб вона була більшою у 2,1 рази [4209].

Експресія гена *ICE1* з *Vitis amurensis* (індуктор експресії СВФ 1) покращувала морозостійкість рослин тютюну, при цьому активність СОД була меншою в контрольних рослинах на 80% [134]. Одночасна експресія генів *CuZnSOD* та *APX* під контролем 35S промотору ВМЦК надавала рослинам тютюну можливості краще протидіяти умовам посухи, засолення і низької температури та поєднанню цих стресів [254].

У рослинах ріпаку з трансгеном *secPI* (ген цекропіна P1) активність СОД підвищувалась на 30% при обробці 5 мкМ розчином метилвіолоджена [491].

Рослини люцерни (*Medicago sativa* сорт Zhaodong) характеризувались підвищеною порівняно з контролем на 14% активністю СОД після 15 діб сольового стресу (300 мМ NaCl) завдяки експресії гена *GsCBRLK*, що кодує Са-залежну кальмодулін-рецептор-подібну кіназу з *Glycine soja* Siebold & Zucc [71].

Активність СОД під час сольового (150 мМ NaCl) стресу підвищувалась у рослинах *Liquidambar formosana* з геном *AtNHX1* з арабідопсису під контролем 35S промотору ВМЦК. В порівнянні з контролем вона зростала на 71% через 7 діб стресу, на 50% – через 14 діб, на 88% – через 21 добу і 58% – через 28 діб [348].

Рослини тополь (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx клон T89), що експресували ген *SOS2* (надчутливий до солі 2) з тополі чорної *Populus trichocarpa*, за умов засолення (85 мМ NaCl) мали активність СОД, яка на 30% перевищувала таку у контрольних рослин після 3 тижнів росту у ґрунті [504].

Трансгенні рослини бавовника, що надекспресували антиоксидантні ферменти у хлоропластах, були більш толерантні до сольового стресу, ніж ті, що експресували ці ж ферменти у цитозолі, хоча при цьому загальна активність антиоксидантних ферментів була майже однаковою. Рослини, які

одночасно надекспресували власні гени *GhSOD1* і *GhCAT1*, мали найвищу стійкість серед аналізованих трансгенних рослин [277]. Проникність мембран, виміряна за виходом електролітів, у найкращої з цих ліній була найнижчою при обробці 5мкМ метилвіолоджена і дорівнювала 16,8%, в той час як у рослин дикого типу пошкодження мембран виявлялось більш значним і цей показник був більшим майже втричі та становив 48,4%. Висота рослин при вирощуванні в умовах засолення (200 мМ NaCl) у теплиці складала в середньому 39,2 см (нетрансформовані рослини), 61,8 см (рослини, які надекспресують СОД), 64 см (рослини, які надекспресують аскорбатпероксидазу), 78,5 см (рослини, які надекспресують СОД і каталазу). Рослини бавовника, які одночасно експресували два антиоксидантних фермента – СОД і каталазу, були найкращими і за такими агрономічними характеристиками як кількість коробочок на рослину, маса коробочки і врожай насіння на рослину [277].

Вивчення особливостей залежності активності СОД і вмісту хлорофілів під час посухи від генотипу пшениці дозволило зробити висновок про можливість використання величин активності СОД як критерію для селекції посухо-стійкого рослинного матеріалу [490]. До схожого висновку дійшли і після експериментів з бататом (*Ipomoea batatas*) в експериментах з отримання солестійких рослин [193]. Після добору в умовах *in vitro* за активністю СОД серед 276 регенерантів, отриманих після гамма-опромінення ембріогенного калюсу і відібраних на середовищах з NaCl, 18 ліній було висаджено у теплицю, і серед них 3 виявились більш стійкими до засолення, ніж вихідні та інші регенеровані рослини. Активність СОД у кращих за солестійкістю ліній була до 49% вища, ніж у контрольних рослин.

Одним з підходів до отримання стійких до стресів трансгенних рослин є використання стрес-індуцибельних промоторів. Активність СОД у таких рослин не відрізняється від такої у нетрансформованих за нормальних умов росту. За настанням стресу активність СОД збільшується у цих рослин швидше і більш суттєво та надає їм переваги для росту в порівнянні з

контрольними. Так, насіння рослин тютюну, які були трансгенні за Cu/ZnСОД і аскорбатпероксидазою під контролем промотора SWPA2, було здатним проростати швидше за умов стресів (посуха, або низька температура, або засолення), ніж нетрансформоване [254]. Ця особливість спостерігалась як за умов подвійного (посуха і сольовий стрес, або низька температура і посуха, або низька температура і сольовий стрес), так і потрійного (низька температура, сольовий стрес і посуха) стресів. Крім цього, трансгенні проростки формували за цих умов більшу біомасу листків і коренів. Трансгенні за трьома генами, залученими до відповіді на стрес (СОД, аскорбатпероксидазою і *NDPK2*, під контролем того ж промотора SWPA2), рослини картоплі були більш толерантними до дії високих температур і оксидативного стресу, індукованому метилвіолодженном, за рахунок підвищення активності СОД, аскорбатпероксидази і каталази, яка регулюється *NDPK2* [232].

Зміни активності СОД регулюються мікроРНК [138, 421, 440] і альтернативним сплайсингом [154, 415].

МікроРНК (міРНК) - це ~21-нуклеотидні РНК, які зменшують накопичення цільових РНК за рахунок їх розщеплення або репресії трансляції. *miR398* з арабідопсису регулює мРНК, які відповідають двом ферментам Cu/ZnСОД. Сама *miR398* знижує активність у відповідь на вміст міді і стрес. *miR398* позитивно регулюється сахарозою, що приводить до зменшення мРНК як цитозольної, так і хлоропластної Cu/ZnСОД. Така регуляція сахарозою спостерігається як за наявності, так і при відсутності фізіологічно відповідних рівнів додаткової міді. Крім того, виявлено, що рослини, які мають мРНК цитозольної і хлоропластної Cu/ZnСОД зі зміненими сайтами комплементарності до *miR398*, накопичують відповідні мРНК, в той час як акумуляції відповідних білків не відбувається. Це говорить за те, що *miR398* може діяти як трансляційний репресор. Крім того, показано, що цільові РНК можуть уникати регуляції міРНК на рівні накопичення мРНК, але зберігається чутливість до регуляції на рівні

трансляції [138]. Показано, що рослини арабідопсиса, які надекспресують стійку до miR398 форму хлоропластної Cu/ZnСОД, акумулюють більше відповідної mРНК, ніж рослини, що експресують звичайну хлоропластну Cu/ZnСОД. Трансгенні рослини набувають більшої толерантності до високої інсоляції, важких металів та інших оксидативних стресів [421].

В рослинах люцерни (*Medicago truncatula*) при водному дефіциті підвищується активність miR398a/b і miR408 як в коренях, так і в надземній частині. Зниження активності відповідних цільових генів, які кодують мідь-вмісні білки COX5b (субодиниця 5b мітохондріальної оксидази цитохрома c) і пластоцианін, підтверджує участь цих мікроРНК у відповіді на посуху у рослин *Medicago truncatula*. Крім того, підвищення активності miR398 приводить до зниження експресії цитозольної СОД під час водного дефіциту. Регуляція генів, що кодують мідь-вмісні білки, шляхом активації miR398a/b і miR408 виявляє зв'язок між гомеостазом міді та адаптацією *Medicago truncatula* до нестачі води, що посилюється [440].

Альтернативний сплайсинг показаний для FeСОД, взятої з бібліотеки кДНК волоті рису. Він відбувається в четвертому екзоні гена *FeSOD*, що приводить до трансляції двох ізоформ різного розміру. 5'-фланкуюча область цього гена була клонована. Багато цис-активних регуляторних елементів, що є задіяними у відповідях на дію світла, включаючи G- та I-бокси, були знайдені. ПЛР аналіз, поєднаний зі зворотною транскрипцією, показав, що дві альтернативні форми експресувались як у вегетативних, так і генеративних тканинах. Акумуляція обох ізоформ підвищувалась за дії світла. Крім того, альтернативний сплайсинг mРНК для FeСОД рису був чутливим до низьких температур. Дві рекомбінантні FeСОД рису були експресовані в клітинах *Escherichia coli*. Аналіз активності СОД виявив, що скорочення С-кінця у другій ізоформі не приводить до втрати ензиматичної активності [154].

Два гени (*PthipI-SODC1* і *PthipI-SODC2*), що кодують білок СОД з високою ізоелектричною точкою (hipI-SOD) були знайдені у рослинах тополі

бальзамічної (*Populus trichocarpa*). Виявлено два транскрипти PhipI-SODC1 (hipI-SODC1b і hipISODC1s), які різняться між собою довжиною: перший є довшим другого на 69 нуклеотидів за рахунок альтернативного сплайсинга в шостому інтроні. Транскрипт hipI-SODC1b експресується в ксилемі і камбії та не експресується у флоемі. Імунолокалізація і мас-спектрометричні дані підтверджують наявність СОД з високою ізоелектричною точкою у васкулярній тканині [415].

Хоча деякі дані щодо ролі змін в активності СОД і пов'язаних з цим змінами у метаболізмі рослин є неоднозначними, зацікавленість до висвітлення особливостей функціонування цього фермента не згасає. Вивчення можливостей підвищення стійкості рослин до несприятливих факторів оточуючого середовища за рахунок надекспресії генів СОД та їх регуляції як показник адаптивної пластичності рослин залишається актуальним і знаходить своє підтвердження в експерименті. Підвищення активності СОД у результаті біотехнологічних маніпуляцій може слугувати передумовою для вивчення відповіді отриманих рослин на стресові умови, тобто оцінка активності СОД може бути критерієм для відбору.

Підводячи загальний підсумок даного огляду літературних джерел, необхідно вказати, що знання щодо фізіології рослин і аспектів, що стосуються їх адаптивної пластичності, постійно розширюються і поглиблюються. Можливості трансгенезу як одного з біотехнологічних підходів до вивчення і удосконалення сільськогосподарських рослин створюють перспективи до подальшого розвитку. Отримано значну кількість трансгенних рослин різних видів, які продукують більшу біомасу, ніж нетрансформовані рослини, як за нормальних умов вирощування, так і в умовах стресів.

Отримання нових трансгенних рослин на прикладі однієї з важливих олійних культур – ріпаку – може згодом розширити базу для селекції на продуктивність і стійкість до стресів різного походження. Вплив експресії

генів десатураз і цитохрома P450_{SCC} на фізіологію і біохімію трансгенних рослин раніше було досліджено на тютюні як модельному об'єкті. У значної групи рослин, що наразі отримані і характеризуються експресією генів інтерферону людини, досліджували, головним чином, рівень накопичення рекомбінантного білка і стійкість до вірусних інфекцій. Можливі фізіологічні і біохімічні зміни в рослинному організмі через введення генів інтерферону і їх механізми не вивчено.

Аналіз трансгенних рослин, які будуть експресувати гени бактеріального походження і гени ссавців (великої рогатої худоби і людини), дозволить збагатити уявлення про взаємодію генів та їх вплив на фізіологію отриманих рослин і використати ці знання для отримання рослин з підвищеною продуктивністю, особливо в несприятливих умовах зростання.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика вихідного матеріалу

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

2.2. Вирощування рослин в асептичних умовах

2.2.1. Вирощування рослин за фізіологічних (нормальних) умов.

Для отримання асептичних рослин, що використовувались в експериментах, насіння поверхнево стерілізували, послідовно занурюючи його в 70% етанол (1 хв), діюцид (10 хв), стерильну воду (тричі по 10 хв). Насіння пророщували на безгормональному агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) [308] в чашках Петрі в темряві за 23°C. Після 5–7 діб паростки переносили в стерильні колби з тим же середовищем. Рослини розмножували живцюванням і підтримували у термальній кімнаті за температури 24°C і освітленні 4000–5000 люкс у колбах, сосудах Magenta Vox або пробірках Sigma 25×150 мм (Sigmawave™) з 50, 30 або 15 мл безгормонального агаризованого середовища MS, відповідно.

2.2.2. Вирощування рослин за умов водного дефіциту.

Під час вивчення толерантності до осмотичного стресу верхівки з одним повністю

розвинутим листком переносили до пробірок Sigma 25×150 мм (Sigmaxwave™) з 5мл рідкого безгормонального середовища MS, до яких перед автоклавуванням додавали відповідну кількість манітола (100 мМ, 200 мМ, 500 мМ) для моделювання осмотического стресу, і вирощували протягом двох тижнів в термальній кімнаті за 24°C і освітленні 4000 –5000 люкс. Для кращої фіксації пагонів у рідкому середовищі на дно пробірок вміщували смужки фільтрувального паперу. Контролем вважали ріст у середовищі без манітолу.

Толерантність до дефіциту води в асептичних умовах аналізували і на безгормональному агаризованому середовищі MS з додаванням манітолу в концентрації 50 мМ. Рослини вирощували в зазначених вище пробірках і за тих же умов протягом чотирьох тижнів.

2.2.3. Вирощування рослин за низьких позитивних температур.

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

2.3. Вирощування рослин в кліматичній камері та високотемпературний тест

Рослини з асептичної культури висаджували в ґрунт (горшечки об'ємом 2 л) в умовах теплиці (12/12 фотоперіод, +23°C). За тиждень адаптовані рослини переносили в кліматичну камеру Programmable Plant Growth Chamber, модель WGC-P9 (WiseCube® WGC, Корея). Їх вирощували

протягом двох тижнів, підтримуючи наступні параметри: 16 год (світло)/ 8 год (темрява) фотоперіод, температура +22°C (день)/+18°C (ніч), вологість – 70%, освітлення – 480-550 $\mu\text{M m}^{-2} \text{сек}^{-1}$).

Високотемпературний тест проводили на рослинах у фазі 4–5 листків після двох тижнів вирощування в кліматичній камері. Вологість і освітлення залишали без змін. Температуру підвищували кожної години на 2°C до 42°C, потім її підтримували постійною протягом 16 год згідно [184].

2.4.Отримання насіння в умовах закритого ґрунту

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

2.5. Тестування на стійкість до фосфінотрицину і гліфосату в асептичних умовах

Насіння ріпаку, отримане в результаті самозапилення створених ліній, стерильно пророщували в умовах освітлення в термальній кімнаті на безгормональному середовищі MS без додавання фосфінотрицину (PPT). Корені і гіпокотилі як тканини, що не мають хлорофіла, є нечутливими до дії PPT, тому висаджування насіння на середовище з PPT приводило до затягування тестування за рахунок розростання нечутливих тканин і виживання нетрансгенних проростків через акумуляцію селективного агента нечутливими тканинами. Верхівки 5-7-добових проростків з повністю сформованими несправжніми листочками відокремлювали і переносили на середовище, що містило PPT (10 мг/л), і визначали розщеплення за цією ознакою за тиждень (нестійкі жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння).

Для тестування на стійкість до гліфосату в асептичних умовах стерильний розчин *N*-фосфонометилгліцина (2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте») додавали до безгормонального поживного середовища після автоклавування. За три тижні оцінювали коренеутворення і загальний стан рослин.

2.6. Тестування на стійкість до гліфосату і фосфінотрицину в умовах теплиці

В умовах закритого ґрунту проводили обприскування 3-тижневих адаптованих рослин розчином гліфосату (*N*-фосфонометилгліцина 2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»); дію препарату спостерігали за тиждень.

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

2.7. Вивчення впливу екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку

Вплив екзогенного інтерферону (ІНФ) вивчали в асептичних умовах при проростанні насіння і при культивуванні верхівок пагонів сформованих рослин. Насіння стерилізували (розділ 2.2), висушували за допомогою фільтрувального паперу і замочували в водних розчинах ІНФ (концентрації 10^2 , 10^3 , 10^4 МО/мл) протягом 30 хв за температури +4 °С. В якості контролю робили замочування 1) в деіонізованій воді, 2) в розчині ІНФ (10^2 МО/мл), інактивованому кип'ятінням, 3) в розчині ІНФ (10^2 МО/мл) з додаванням діетилдітіокарбамату натрію в якості інгібітора СОД [194]. Потім насіння підсушували фільтрувальним папером і розкладали на поверхню безгормонального агаризованого середовища MS по 10 штук в кожну чашку Петрі. Для приготування розчинів ІНФ використовували Laferon (рекомбінантний ІНФ альфа 2b людини, 1 М МО, INTER-PHARM-BIOTEK,

Україна) і стерильну деіонізовану воду, охолоджену до +4 °С. Пророщування насіння і ріст проростків проходили в термостаті в темряві за температури 24°C. За 7 діб оцінювали фізіологічні (сиря маса проростків та їх окремих частин – коренів, гіпокотилів, сім'ядольних листочків) та біохімічні (вміст сумарного розчинного білка, активність СОД) параметри і вплив обробки екзогенним ІНФ на проростання насіння (% проростання).

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

2.8. Генетична трансформація

Трансформацію ріпаку проводили згідно розробленої нами методики [16] (розд.3.1). Частоту регенерації розраховували як відношення кількості експлантів, на яких утворились регенеранти, до загальної кількості експлантів. Ефективність трансформації визначали як частку трансгенних регенерантів (за ПЛР аналізом) у загальній кількості регенерантів.

2.9. Генетичні конструкції, використані в експериментах з трансформації

Векторні конструкції з плазмідами pICH3744, pICH3737 і pICH9414 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, Німеччина). Крім селективного гена неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) вони мали

кодуючу послідовність гена стійкості до фосфінотрицину (*bar* гена) і незалежний 35S промотор, які були розміщені між двома інвертованими *lox*-сайтами (рис.2.1). Загальну схему конструкцій можна представити як RB-*lox*-*bar*-35S-*lox*-*nptII*. Плазмиди pICH3744 і pICH9414 несли додатковий *loxA* (*loxP*) сайт, який знаходився в прямій орієнтації по відношенню до іншого *lox A* (*loxP*) сайту.

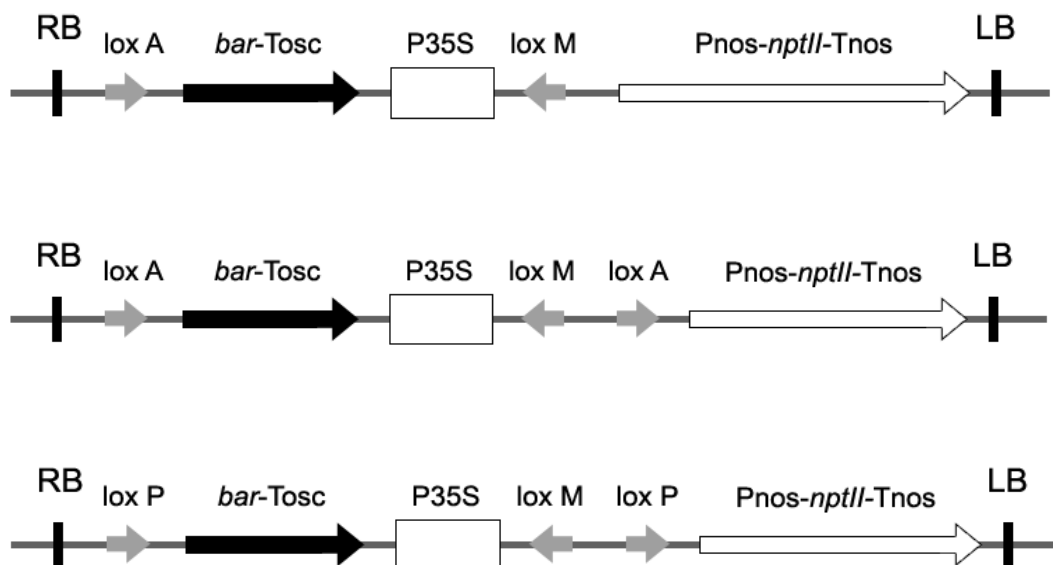


Рис. 2.1. Схеми конструкцій, що були використані в експериментах з отримання рослин ріпаку зі стабільною експресією безпромоторного гена *bar*: LB – ліва границя Т-ДНК, RB – права границя Т-ДНК, *bar* – кодуюча частина гена фосфінотрицин ацетилтрансферази, *nptII* – ген неоміцинфототрансферази II, *loxA*, *loxM*, *loxP* – сайти специфічної рекомбінації.

Вектор pCB133 мав гени *epsps* (цільовий) під контролем 35S промотора ВМЦК і *bar* (селективний) під контролем *nos* промотора (рис. 2.2). Вектор був сконструйований к.б.н. І.К.Комарницьким на основі вектора pUC19 шляхом ексцизії гена *gus* і лігування гена *epsps* під контроль 35S промотора.

Вектор pBISN-*desC::licBM3* містив гени *desC* цианобактерії *Synechococcus vulcanus* і *licBM3* термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* [12], що були злиті в одній рамці зчитування під контролем 35S

промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), і селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) під контролем *nos* промотора (рис. 2.3). Вектор був люб'язно наданий д.б.н. І.В.Голденковой-Павловою (Інститут загальної генетики ім.М.І.Вавілова РАН, Москва).



Рис. 2.2. Схема вектора pCB133: RB, LB- межі T-ДНК, Tnos – термінатор гена нопалінсинтази, Pnos – промотор гена нопалінсинтази, P35S – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти, Tocs – термінатор гена октопінсинтази, TP – транзитний пептид, *epsps* – ген енолпірувілшикіматфосфатсинтази, *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази.

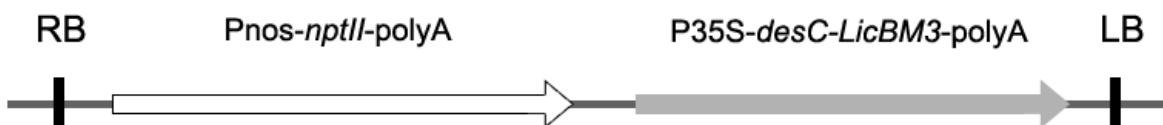


Рис. 2.3. Схема вектора pBISN-*desC::licBM3*.

T-ДНК район плазміді pCB125 містив ген альфа-2b інтерферону людини (*HuInf-α2b*), злитого з рослинним (*Nicotiana plumbagenifolia* L.) кальретикуліновим апопластним сигналом таргетингу, під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК, та селективний ген *bar* (рис. 2.4). Плазміді pCB125 була сконструйована к.б.н. І.М.Герасименко шляхом вирізання гена інтерферону альфа-2b (*HuInf-α2b*) із вектора pICH17311 ендонуклеазами рестрикції *NcoI* і *XbaI* та лігування до вектора pICH5290 T4-ДНК лігазою. Вектори pICH5290 і pICH17311 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, Німеччина).



Рис. 2.4. Схема вектора pCB125.

В якості донора гена *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} із мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби використовувалась плазмідна рGBP450f, отримана з Інституту генетики і цитології НАН Біларусі. Бінарний вектор pICH5290 слугував реципієнтом гена *cyp11A1* і основою для двох генетичних конструкцій – pCB092 і pCB093 (рис.2.5).

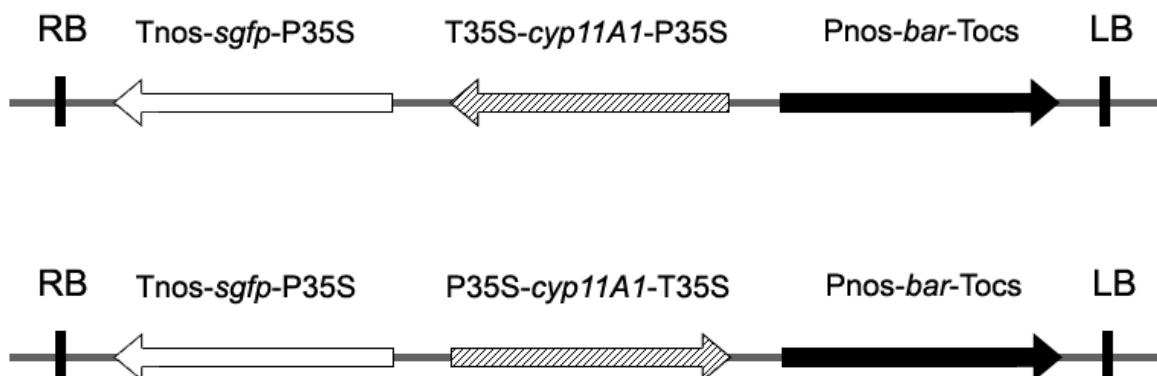


Рис. 2.5. Схема генетичних конструкцій pCB092 (вище) і pCB093 (нижче). Експресуючі касети вказані з промоторами (P) і термінаторами (T).

Між лівим і правим кінцем Т-ДНК вектора розміщувалися: 1) селективний ген *bar* під контролем промотора нопалінсинтази (Pnos) і термінатора октопінсинтази (Tocs) та 2) візуальний маркерний ген розчинного білку GFP під контролем 35S промотора і термінатора нопалінсинтази (Tnos). Клонування проводилося по сайту EcoRI, присутньому на плазміді pICH5290, на Т-ДНК між *bar* та *gfp* генами, тому зберігалася рівноцінна можливість вбудовування донорного ДНК-фрагменту у двох протилежних орієнтаціях, прямій (pCB093) і оберненій (pCB092).

Конструювання векторів, трансформацію компетентних клітин *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (Stratagene) і компетентних клітин *Agrobacterium tumefaciens* штама GV3101 виконано к.б.н. Б.В.Моргуном.

2.10. Підготовка агробактерій до інфікування рослинних тканин

Нічну культуру агробактерії нарощували в 20 мл рідкого середовища LB [383], доповненого 50 мг/л карбеніциліна і 100 мг/л рифампіцина, на качалці (180 об/хв) протягом 24 годин при 24°C в темряві. Потім агробактеріальну суспензію розводили в 3 рази рідким середовищем для каюсоутворення та інкубували за тих же умов протягом 3–4 годин. Отриману суспензію використовували для інфікування.

2.11. Аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Інтеграцію чужорідних генів до рослинного генома визначали за допомогою ПЛР. Із листової тканини виділяли ДНК згідно методикам [99] і [351].

Для реакції використовували 40 нг рослинної ДНК, по 0,5 мкМ кожного з праймерів (табл.2.1), по 200 мкМ кожного з трифосфатів, 1ед. *Taq* ДНК-полімерази, ПЛР реакційний буфер, що містив 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 9 при 25°C), 0,1 % Triton X-100 і 2 мМ MgCl₂. Загальний об'єм суміші дорівнював 20 мкл. Ізольована ДНК з нетрансформованих рослин (негативний контроль) і 1 нг плазмідного вектору (позитивний контроль) були ампліфіковані з тими ж праймерами та за тих же умов. Реакцію проводили в ампліфікаторі “Терцик ИМ02” (фірма “ДНК–технология“, Москва). Крім того, ампліфікації (з однією парою праймерів або мультіплексні реакції) проводили в 10 мкл суміші, яка містила 1 мкг рослинної ДНК, по 0,5 мкМ кожного з праймерів (10 мкМ) (табл.2.1), 0,5 мкл

(10 мкМ) суміші трифосфатів, 0,1 мкл *Taq* ДНК-полімерази (0,5 од.), 1 мкл 10X ПЛР буфера, в ампліфікаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США).

Таблиця 2.1

Праймери, які використовувались при проведенні ПЛР-аналізів

Ген	Праймери (5' - 3')	Розмір фрагмен- ту, пн	Автор
1	2	3	4
<i>nptII</i>	For GAGGCTATTCGGCTATGACTG Rev CAAGCTCTTCAGCAATATCACG	622	[124]
<i>bar</i>	For ATGAGCCCAGAACGACGCCGGCC Rev CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC	551	[29]
<i>bar</i> (мульти- плексна реакція)	For GAATTCATGAGCGGAGAATTAAGGGA GT Rev CTCGGCCGTCCAGTCGTAG (мультиплекс)	624	-
<i>bar</i>	For GAATTCATGAGCGGAGAATTAAGGGA GT Rev CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC	910	[27]
<i>cupIIA1</i>	For GCCACATCGAGAACTTCCAGAAG Rev CTGGTGTGGAACATCTTGTAGACG	502	[39]

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
<i>HuInf-α2b</i>	For CTCCTGCTTGAAGGACAG Rev GGAGTCCTCCTTCATCAG	265	[165]
<i>HuInf-α2b</i>	For4 TTGATGCTCCTGGCACAG Rev2 TTCTGCTCTGACAACCTC	396	[165]
<i>actin</i> (<i>Nicotiana tabacum</i>)	For TTTGCTGGAGATGATGC Rev CTTGAATGGCGACATAC	351	[165]
<i>virD1</i>	For ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA Rev GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA	432	[165]
<i>desC</i>	For GTTGACACCAACGGTAACGCC Rev CCAGTTAAAGGTGCGCTCGTAA	949	[3]
<i>licBM3</i>	For GTCGTAAATACGCCTTTTGTTGCA Rev GTTAGGATAGTATTTTACATATTCG	642	[3]
<i>epsps</i>	For GCTGACTCCTCGAGTTCAAG Rev TCGAATCTAGACTCATCAGG	498	[36]

Використовувались наступні профілі:

для гена *nptII*: 1) 94 °C, 1 хв; (94 °C, 1 хв, 55 °C, 1 хв; 72 °C, 1 хв) – 33 цикла; останній – 72 °C, 8 хв, 2) при проведенні мультиплексної реакції: 94°C, 5 хв, (94°C, 30 сек, 60°C, 45 сек, 72°C, 45 сек) – 30 циклів, останній – 72 °C, 5 хв; для гена *bar* (перша пара праймерів, табл. 2.1): 94 °C, 1 хв; (94 °C, 1 хв, 60°C, 1 хв; 72 °C, 45 сек) – 35 циклів; останній – 72 °C, 4 хв; для гена *bar* (друга пара праймерів, табл. 2.1 – при проведенні мультиплексної реакції): 94°C, 5 хв, (94°C, 30 сек, 60°C, 45 сек, 72°C, 45 сек) – 30 циклів, останній – 72 °C, 5 хв;

для гена *bar* (третя пара праймерів, табл.2.1): 94 °С, 4 хв; (94 °С, 1 хв, 56 °С, 1 хв; 72 °С, 20 сек; 94 °С, 30 сек) – 35 циклів, останній – 72 °С, 10 хв;

для гена *HuInf2b*: 94 °С, 5 хв, (94 °С, 30 сек, 60 °С, 30 сек, 72 °С, 30 сек) – 30 циклів; останній – 72 °С, 5 хв;

для гена *cyp11A1*: 94 °С, 4 хв; (56 °С, 1 хв; 72 °С, 20 сек; 94 °С, 30 сек) – 35 циклів, останній – 72 °С, 10 хв;

для гена *desC*: 94 °С, 5 хв, (94 °С, 30 сек, 60 °С, 45 сек, 72 °С, 45 сек) – 30 циклів, останній – 72 °С, 5 хв;

для гена *licBM3*: 94 °С, 5 хв, (94 °С, 30 сек, 60 °С, 45 сек, 72 °С, 45 сек) – 30 циклів, останній – 72 °С, 5 хв;

для гена *epsps*: 94 °С, 1 хв, (94 °С, 1 хв, 62 °С, 1 хв, 72 °С, 30 сек) – 35 циклів, останній – 72 °С, 4 хв.

Після цього продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,0% або 1,5% агарозних гелях в Tris–ацетатній буферній системі. Результати фіксувались цифровою камерою Olympus.

2.12. Аналіз експресії введених генів на рівні транскрипції

Для підтвердження експресії генів на рівні транскрипції проводили ПЛР аналіз зворотніх транскриптів (ЗТ-ПЛР) з використанням сумарної РНК. Її виділяли з листків рослин згідно методиці [267]. Для аналізу брали 200 мг рослинного матеріалу. Концентрацію РНК вимірювали на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Синтез першого ланцюга кДНК на матриці РНК проводили з використанням набору для проведення ЗТ-ПЛР «First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas») згідно інструкціям фірми-виробника. РНК-матрицю попередньо обробляли дезоксирибонуклеазою I. Для кожного зразка РНК проводили дві реакції – з додаванням і без додавання зворотної транскриптази M-MuLV. Ампліфікацію і аналіз ПЛР-продуктів виконували, як описано вище.

2.13. Визначення антиоксидантної активності тканин листків

Антиокислювальну активність визначали за методом Семенова і Ярош [38] з деякими модифікаціями. Для цього 0,3 г листків розтирали в ступці з 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4). Отриманий гомогенат переносили до пробірок Eppendorf і центрифугували в мікроцентрифузі 10 хв при 4000 об/хв. До кювети для фотоелектроколориметра товщиною 1 см вносили 1,5мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мл 0,8 мМ 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію (DPIP), 0,5 мл сульфата заліза (II) і 0,5 мл супернатанта (дослід) чи 0,5 мл дистильованої води (контроль). Після цього кожні 30 с протягом 5 хв вимірювали оптичну густину розчину в кюветі (D_t) за довжини хвилі 510 нм. Крім цього, вимірювали оптичну густину розчину, в який замість 0,5 мл сульфата заліза (II) додавали 0,5 мл дистильованої води (D_∞). За цих умов 2,6-дихлорфеноліндофенолят натрію є повністю окисненим. Потім визначали константу швидкості окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію як тангенс кута нахилу прямої на графіку залежності натурального логарифма ΔD_t ($\Delta D_t = D_\infty - D_t$) від часу. За показник антиокислювальної активності рослинного матеріалу приймали значення константи інгібування (K_i) окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолята натрію, що вираховували за формулою:

$$K_i = \frac{K_{\text{контр}} - K_{\text{дослід}}}{C},$$

де $K_{\text{контр}}$ і $K_{\text{дослід}}$ – константи швидкості окиснення DPIP в контрольному і дослідному варіантах, відповідно, мл/л хв; C – концентрація рослинного матеріалу в кюветі, мг/мл.

2.14. Визначення вмісту сумарного розчинного білка

Для визначення кількості сумарного розчинного білка в листках рослин використовували метод Бредфорда [83]. Рослинні екстракти готували, розтираючи наважку в ступці або в пробірках на шаровому млині Retsch MM

400 (Німеччина) в подвійному об'ємі 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 8,0), до якого додавали 5 мМ Na₂EDTA, 100 мМ NaCl, 10 мМ β-меркаптоетанол і 2,5% полівінілпіролідон, з наступним центрифугуванням при 13 000 g (4°C) протягом 15 хв. Рідину над осадом використовували для аналізу. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. за довжини хвилі 595 нм. В якості внутрішнього стандарту використовували бичачий сироватковий альбумін.

2.15. Визначення активності СОД

Визначення активності СОД проводили з використанням метода фотохімічного окиснення нітроблакитного тетразолія (НБТ) згідно [77]. Рослинний матеріал (100 мг) розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 8,0) у ступці або в пробірках на кульовому млині Retsch MM 400 (Німеччина) і центрифугували при 13 000 g (4°C) протягом 15 хв. Рідину над осадом використовували для аналізу. Реакцію з НБТ проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш мала в своєму складі 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл буфера, 130 мкл 65 мМ метіоніна, 47 мкл 63 мкМ НБТ, 12,5 мкл 1 мМ рибофлавіна. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, інші три освітлювали протягом 5 хв в термостаті за температури 23°C лампой білого світла (люмінісцентна лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W). За довжини хвилі 550 нм визначали абсорбцію реакційною сумішшю, яку витримували на світлі, проти поглинання світла пробою, що була в темряві, на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 (Німеччина). Нульова проба мала в своєму складі всі перелічені компоненти, за виключенням рослинного екстракту. Кількість буфера збільшувалась в реакційній суміші до 550 мкл. Розрахунки проводили за формулою:

$$\text{СОД (од/мл)} = (\text{ОД}_1/\text{ОД}_2 - 1) [\text{ФР}],$$

де ОД₁ – оптична густина нульової проби;

ОД₂ – оптична густина експериментальної проби;

ФР – фактор розведення = об'єм реакційної суміші, мл/ об'єм
рослинного екстракту, що було використано, мл
Активність СОД виражали в од. акт./ мг білка.

2.16. Визначення вмісту аскорбінової кислоти в рослинному матеріалі

Вміст аскорбінової кислоти визначали з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у листі рослин T₂ покоління з геном *sup11A1*, вирощених в умовах теплиці, згідно методики [508].

Ліофілізований зразок (50 мг) екстрагували 5 мл ортофосфорної кислоти (5%) протягом 2 хв в ультразвуковій бані. Після наступного 10 хв центрифугування при 13000g за температури 4°C відбирали надосадкову рідину. До 1 мл супернатанта додавали 200 мкл гептана для позбавлення від гідрофобних речовин. Потім суміш центрифугували ще 10 хв при 8000 g за тієї ж температури. Обережно відбирали слой гептана. Водну фракцію використовували для ВЕРХ аналізу. Його проводили розділенням у градієнтній суміші ацетонітрилу, 39 мМ натрій-фосфатного буферу (рН=2,5) та 2,5 мМ гексансульфонової кислоти. Було побудовано калібрувальну криву залежності площини піку на хроматограмі від концентрації аскорбінової кислоти з лінійною областю від 0,25 до 4 мкг.

2.17. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів

Вміст фотосинтетичних пігментів визначали згідно [475], використовуючи в якості розчинника диметилсульфоксид. У пробірки з 4 мл реагента занурювали зразки листків (50 мг), закручували кришками і витримували в темряві протягом 24 год за кімнатної температури, якщо аналізувались зразки рослин, культивованих в асептичних умовах. Якщо

вивчали вміст пігментів фотосинтезу в рослинах, які вирощувались в кліматичній камері, тоді екстракцію проводили на водяній бані за температури 67°C протягом 4 год. Вимірювали поглинання світла екстрактами за довжин хвиль 665, 649 і 480 нм на спектрофлуориметрі «Флуорат-02-Панорама» (Люмекс-Маркетинг, Росія). Розрахунки проводили за рівняннями:

$$C_a = 12,19A_{665} - 3,45A_{649}$$

$$C_b = 21,99A_{649} - 5,32A_{665}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{480} - 2,14C_a - 70,16C_b)/220,$$

де C_a , C_b , C_{x+c} – вміст хлорофіла a , хлорофіла b і загальна кількість каротиноїдів, відповідно.

2.18. Газова хроматографія метилових ефірів жирних кислот

Виділення жирних кислот та утворення їх метилових ефірів для проведення аналізів на газовому хроматографі відбувалось за один етап згідно [163]. Жирні кислоти виділяли з листя та насіння рослин ріпаку. Для приготування екстрактів брали 50 мг насіння або 400 мг листя. Насіння подрібнювали в ступці, листя нарізали скальпелем в чашці Петрі. Переносили рослинний матеріал до скляних пробірок з кришками, що закручуються і мають тефлонові прокладки, і додавали 3,3 мл реакційної суміші, яка мала в своєму складі метанол:толуол: H_2SO_4 в об'ємному співвідношенні 44:20:2. Потім вносили до пробірок 1,7 мл гексана. Гептадеканову кислоту (С 17:0) використовували в якості внутрішнього стандарту. Пробірки витримували на водяній бані за 80°C протягом 2 год. На початку прогрівання пробірки м'яко струшували для утворення однофазної рідини з попередньо двофазної. При охолодженні за кімнатної температури знов відбувалось утворення двофазної системи. Верхню фазу, в якій концентрувались метилові ефіри жирних кислот, відбирали і використовували для аналізу.

Аналіз проводили в газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина – 30 м; внутрішній діаметр – 0,25 мм; товщина покриття 0,25 мкм) (J&W Scientific). Реакція відбувалась за температурної програми від 150°C до 220°C з градієнтом 2° /хв. В якості газа-носія використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Температура інжектора дорівнювала 250°C. Для ідентифікації отриманих спектрів жирних кислот використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш метилових ефірів жирних кислот бактерій Supelco.

2.19. Аналіз відносного вмісту води у листках

Відносну кількість води вираховували за формулою

$$BBB, \% = 100 * (\text{Сира Б} - \text{Суха Б}) / (\text{ТБ} - \text{Суха Б}),$$

де Сира Б – сира біомаса листка безпосередньо після взяття зразка, г,

ТБ – тургорна біомаса того ж листка після насичення деіонізованою водою протягом 24 год в чашці Петрі, г,

Суха Б – суха біомаса того ж листка після ліофільного висушування, г.

2.20. Вивчення загальної антирадикальної активності рослинних екстрактів

Рослинний матеріал (100 мг) розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (4°C, рН 8,0) в пробірках на кульовому млині Retsch MM 400 (Німеччина) протягом 3 хв за частоти струшувань 25 об/сек, потім центрифугували при 13000 g (4°C) протягом 15 хв і рідину над осадом використовували для аналізів.

Для визначення загальної антирадикальної активності використовували метод DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал), принцип якого базується на методиці [79]. Вимірювали інтенсивність забарвлення

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

Кількісно поглинання вільного радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою:

$$A(k) - A(e) / A(k) * 100,$$

де: $A(k)$ – оптична щільність контрольного розчину

$A(e)$ – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту

На основі розрахованих відсотків інгібування було побудовано графік залежності величин інгібування забарвлення DPPH від об'єму екстракту. За графіком встановлено об'єм екстракту, котрий викликав 50 % інгібування забарвлення вільного радикалу (EC_{50}).

2.21. Аналіз ліхеназної активності

2.21.1. Якісний тест. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази проводили в чашках Петрі з 2 % агарозою, в яку додавали 50 мМ

Tris/HCl (pH8,0) і 0,05 % розчин ліхенана (Megazyme, Ірландія). В підготовлені лунки заливали по 20 мкл рослинних екстрактів. Чашки інкубували за температури 65°C протягом 1 год, фарбували в 0,5 % розчині Конго червоного (Sigma, США) 15 хв і відмивали 1М NaCl до появи світлих плям в місцях гідроліза ліхенана [15].

2.21.2. Кількісний тест. Кількісне визначення активності ліхенази проводили шляхом вимірювання кількості вільних редуруючих цукрів після реакції сумарних білкових екстрактів листків з ліхенаном в якості субстрата [477]. Екстракти отримували, розтираючи рослинний матеріал в однократному об'ємі 100 мМ Tris-HCl буфера (pH 8,0), який мав в своєму складі 0,1 М NaCl, 5 мМ Na₂EDTA і 10мМ β-меркаптоетанол, і центрифугуючи його при 13000 g (4°C) протягом 5 хв. Надосадкову рідину використовували для аналізу. До 20 мкл екстракта додавали 50 мкл 0,5 % водного розчину ліхенана, доводили водою до 500 мкл та інкубували 95 хв за температури 65-70 °С. Потім вносили 500 мкл ДНС-реагента (1% дінитросаліцилової кислоти та 0,05 % сульфїта натрію в 1% розчині гідроксида натрію), 165 мкл 40% К-На-виннокислового та витримували на водяній бані 10 хв за температури 95-100°C. Охолоджували при +4 °С, потім на 15-20 хв залишали при комнатній температурі. Вимірювали оптичну густину розчинів при 510 нм на BioPhotometer (Eppendorf, v.1.35, Німеччина). Концентрацію редууючих цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованим для глюкози. За одиницю активності приймали активність фермента, що утворює 1 мкмоль редууючих цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 сек. Питому активність розраховували на кількість білка в зразку.

2.22. Визначення антивірусної активності рослинних екстрактів

Інтерференоподібну активність визначали за методом мікротитрування [366], що базується на вивченні здатності екстрактів протидіяти

цитопатичному впливу вірусу везикулярного стоматиту (штам Indiana з колекції Інституту мікробіології та вірусології НАНУ) на клітинну культуру тестикул поросят (з колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.Кавецького). Результати реєстрували за 24 год. За одиницю активності інтерферону приймали розведення зразків, які захищали 50% клітинного моношару від цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту. Активність інтерферону виражали у міжнародних одиницях на грам сирової біомаси листків (МО/ г сирової біомаси).

2.23. Статистична обробка результатів

При аналізі експериментальних даних використовували стандартні методики обробки первинних даних [10], за допомогою яких визначали середнє арифметичне, довірчі інтервали для оцінки достовірності отриманих результатів, коефіцієнт Пірсона з використанням стандартних функцій Microsoft Excel, а також критерій χ^2 для достовірності оцінки розщеплення в T₁-T₂ поколіннях трансформантів.

РОЗДІЛ 3

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РІПАКУ

3.1. Розробка протоколу трансформації з використанням в якості експлантів листків асептичних рослин

В експериментах з трансформації ріпаку використовують різні види експлантів. Частіше за все інфікують гіпокотилі проростків, тому що вони мають високий регенераційний потенціал. Крім того, їх легко отримувати у великій кількості [4, 17, 67, 112, 335]. Високої ефективності трансформації ріпаку, використовуючи в якості експлантів 4-6-добові сім'ядольні листочки, досягли Moloney et al. [305]; Hong et al. [198]; Damgaard et al. [113]. Мікроспори як експланти для трансформації є цікавими з точки зору можливості швидкого отримання гомозиготних трансформантів, у яких вивчають рецесивні алелі [200, 331, 423]. Культивуванню з агробактерією піддавали міжвузля рослин, які вирощувались в теплиці і досягли стадії формування суцвіть [158, 344], а також протопласти, що їх виділяли або із гіпокотилів [436], або із мезофілу листків [367].

В якості експлантів ми використовували листки 3–4-тижневих рослин, вирощених в асептичних умовах (рис.3.1).



Рис.3.1. Вихідні рослини ріпаку сорту Калинівський в умовах асептичної культури.

Цей підхід дає можливість працювати з незначною кількістю вихідного насіння (при його обмеженні) і використовувати молоді, здатні до активної проліферації і трансформації тканини, а також виключає необхідність стерилізації вихідного матеріалу перед постановкою кожного досліду. Метод листових дисків запропоновано Horsch [171] для трансформації тютюну і адаптовано нами для тканин ріпаку.

За 3–4 доби до інфікування експланти насікали і для ініціації калюса розміщували на поверхні агаризованного середовища I (табл.3.1).

Таблиця 3.1

**Склад середовищ, використаних в експериментах з трансформації
ріпаку**

Речовини	Вміст, мг/л*		
	Середовище I	Середовище II	Середовище III
сахароза	30 000	30 000	10 000
інозитол	300	300	100
гідролізат казеїна	300	300	-
2,4-діхлорфеноксіоцтова кислота	2	2	-
нафтілоцтова кислота	1	1	1
кінетин	0,1	0,1	-
бензиламінопурін	0,1	0,1	2
абсцизова кислота	-	-	1
зеатин	-	-	1
гіберелова кислота	-	-	1
тіосульфат Na	1000	-	-

* - за основу взято безгормональне середовище MS

Середовище мало в своєму складі 1 г/л тіосульфата натрію в якості агента, що збільшує чутливість рослинних тканин до агробактерії і таким

чином веде до підвищення ефективності трансформації [318]. Раніше в експериментах з трансформації клітин сої було показано, що додавання до середовищ для кокультивування з агробактерією речовин, які мають в своєму складі тіольні групи (L- і D-цистеїн, тіосульфат натрію), підвищує ефективність трансформації, можливо, за рахунок інгібування відповіді на поранення і проникнення патогена. Зв'язування міді та заліза також підвищувало ефективність трансформації, що вказує на інгібування поліфенолоксидаз і пероксидаз. Підтверджено незалежність впливу використання речовин, що мають в своєму складі тіольні групи на ефективність трансформації, від генотипу, штаму агробактерії та плазміди [318].

В підготовленій агробактеріальній суспензії (розд. 2.10) експланти нарізали на сегменти розміром приблизно $0,3-0,5 \times 0,3-0,5$ см і витримували, періодично перемішуючи, протягом 30 хв. Потім, підсушивши фільтрувальним папером, переносили їх в ті ж чашки Петрі, де відбувалось прекультивування. Сокультивування продовжувалось протягом двох діб за умов термальної кімнати при освітленні 4000–5000 люкс і температурі 24°C [493]. Вплив світла на ефективність агробактеріальної трансформації було вивчено раніше на двох оптимізованих системах трансформації: двох калюсних культурах квасолі (*Phaseolus acutifolius*) та культурі сегментів коренів двох екотипів арабідопсиса. Завдяки детекції активності гена бета-глюкуронідази при транз'єнтній трансформації показано, що перенос Т-ДНК позитивно корелює з умовами освітлення. Найвищою експресія гена *gus* була після кокультивування експлантів з агробактерією при постійному освітленні, найнижчою – в умовах темряви [493]. Позитивний ефект постійного світла спостерігали в незалежності від використаного штаму агробактерії – нопалінового, октопінового або агропін/сукцинамопінового.

Після цього експланти відмивали від надлишка агробактерій, підсушували папером і переносили на агаризоване середовище II для калюсоутворення (табл. 3.1), в яке вводили цефотаксим (500 мг/л) для

елімінації бактерій. За 5–7 діб культивування в умовах термостата (24°C) експланти переносили на середовище того ж складу, але з додаванням 5 мг/л фосфінотрицина (PPT) в якості селективного агента. Формування калюса при цьому продовжувалось на розсіяному світлі (2000 люкс) протягом наступних 7–10 діб. Це дозволяло уникнути підвищеної чутливості тканин до селективного агента, що могло привести до швидкої загибелі навіть трансформованих клітин [111]. Оскільки PPT є інгібітором глютамінсинтетази, що грає ключову роль в асиміляції аміаку і регуляції метаболізму азоту в рослині, при його застосуванні азотний метаболізм в тканинах порушується і аміак накопичується в токсичних кількостях. Аміак продукується під час реакцій, які пов'язані з фотосинтетичним електронним транспортом, його накопичення зростає при наявності світла.

Для регенерації використовували середовище III (табл. 3.1) з 250 мг/л цефотаксима і 5 мг/л PPT. За три тижні зелені пагони, що сформувались (рис.3.2), пересаджували на безгормональне середовище MS, доповнене 5 мг/л PPT, а калюси, що залишились, знов переносили на регенераційне середовище того ж складу.

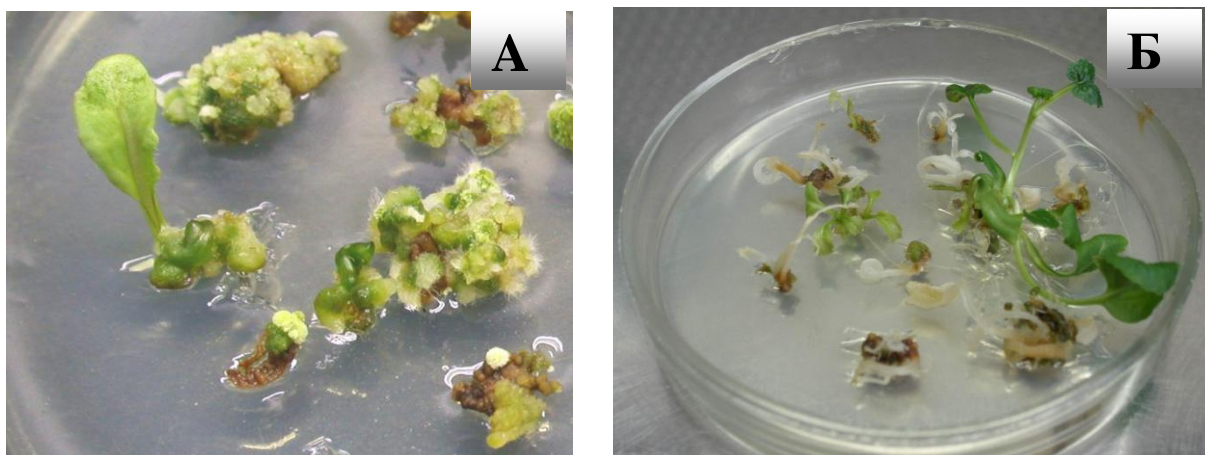


Рис.3.2. Регенерація з листових експлантів ріпаку сорта ВНПС100, які було інфіковано *A.tumefaciens* рІСН 3737, в селективних умовах (5 мг/л PPT): А – формування меристематичних центрів і листків, Б – формування і укорінення пагонів.

Отримані рослини вирощували на безгормональному середовищі MS із 10 мг/л РРТ. Формування коренів відбувалось за цих умов без додаткового стимулювання.

При використанні прекультивованих листових пластинок початок регенерації спостерігався за 4–5 тижнів від постановки експерименту (в умовах селективного тиску РРТ (5 мг/л)), формування пагонів – приблизно за 2 місяці. Запропонована методика запатентована в Україні [16].

3.2. Трансгенні рослини ріпаку з безпромоторним геном *bar*

3.2.1. Регенерація рослин ріпаку. В результаті експериментів з *Agrobacterium tumefaciens*–опосередкованої трансформації листових дисків асептичних рослин ріпаку (розд.3.1) з використанням векторів pICH3744, pICH3737 і pICH9414, які мали кодуєчу послідовність гена стійкості до РРТ (*bar* гена) і незалежний 35S промотор, що були розміщені між двома інвертованими *lox*-сайтами (розд.2.9), отримано 88 незалежних фосфінотрицистинстійких ліній ріпаку двох промислових ярих сортів Калинівський (Вn5) і ВНІС 100 (Вn7) (табл. 3.2).

Використання нами листових дисків культивованих *in vitro* рослин дозволило отримати трансформанти ріпаку з достатньою частотою (~ 9 %) та ефективністю (~70–85 %) за досить короткий час (появу перших регенерантів спостерігали за 7–8 тижнів від початку експериментів, на отримання основної кількості укорінених рослин витрачалось 3–3,5 місяці). Частоту регенерації розраховували як відношення кількості експлантів, на яких утворились регенеранти, до загальної кількості експлантів (табл.3.2). Частоту трансформації визначали як частку трансгенних регенерантів (за ПЛР-аналізом) в загальній кількості регенерантів. Первинні трансформанти ріпаку не відрізнялись від нетрансформованих рослин за фенотипом, темпами росту і швидкістю утворення коренів в асептичних умовах.

Таблиця 3.2

Ефективність регенерації та трансформації листових експлантів ріпаку

Сорт	Вектор	Кількість				Частота регенерації (%)	Частота трансформації (%)
		експлантів	регенерантів	стиких до РРГ	трансгенних (ШЛР+)		
<i>Калинівський</i> (Вn5)	<i>pICH</i> 3744	210	22	19	19	9±0,3	86,3±1,2
<i>ВНІС 100</i> (Вn7)	<i>pICH</i> 3737	640	70	51	50	8±0,1	72,8±1,11
<i>ВНІС 100</i> (Вn7)	<i>pICH</i> 9414	200	24	18	18	9±0,4	75,0±0,9

Зрідка незабаром після регенерації і формування пагона спостерігали цвітіння у асептичній культурі (рис. 3.3).

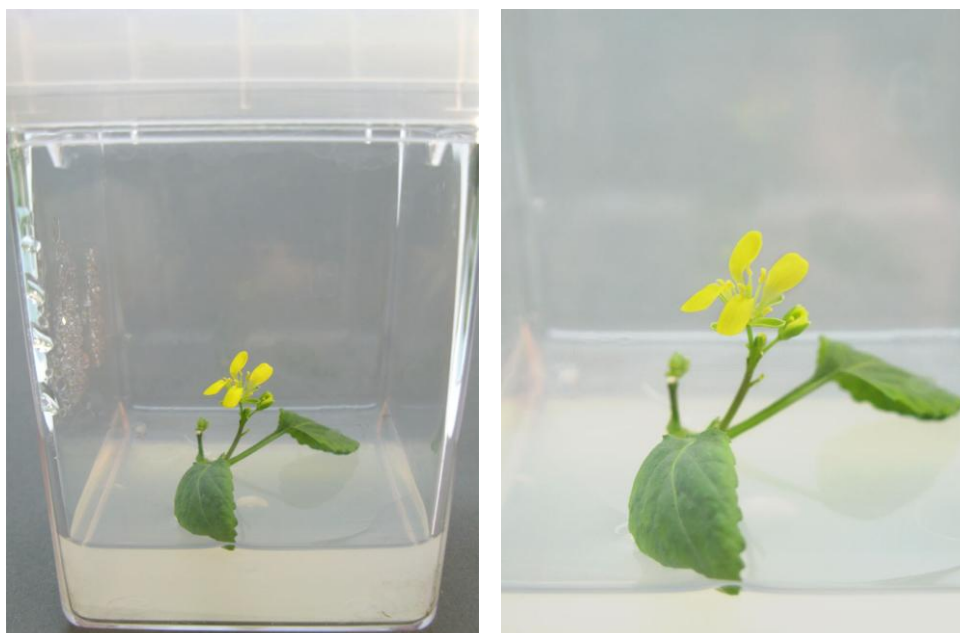


Рис.3.3. Цвітіння трансформанта лінії Вn7/37/2 в асептичній культурі.

Морфологія квіток була нормальною, але зав'язування насінин не відбувалось.

Подібне спотерігали у соматичних гібридів, отриманих нами раніше, між ріпаком і *Orychophragmus violaceus* (представник дикої флори родини хрестоцвітих) [35]. Цвітіння в умовах *in vitro* нетрансформованих рослин ріпаку різних сортів не спостерігали при роботі з цією культурою протягом 12 років.

3.2.2. Аналіз за допомогою ПЛР рослин ріпаку, регенерованих в експериментах з використанням векторів рІСН3744, рІСН3737 і рІСН9414. Наявність гена *bar* в регенерованих лініях підтверджено за допомогою ПЛР (рис 3.4).

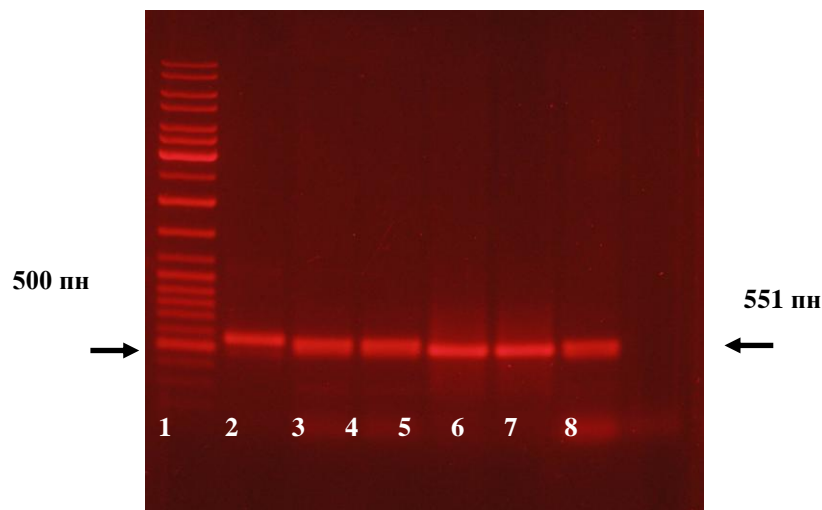


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації сумарної ДНК рослин з праймерами до гена *bar*: 1 – маркер молекулярних мас; 2, 3 – лінії 2 і 15, трансформовані вектором рІСН 3744; 4, 5, 6 – лінії 22, 57 і 66, трансформовані вектором рІСН 3737; 7 – позитивний контроль, ДНК плазміди рІСН 3744; 8 – негативний контроль, ДНК вихідної рослини (сорт Калинівський).

В результаті електрофорезу продуктів ампліфікації тотальної ДНК, виділеної з листків трансформованих рослин ліній 5/44/2, 5/44/15, 5/37/22, 5/37/57 і 5/37/66, з відповідними праймерами (табл.2.1), виявлено фрагмент

довжиною 551 пн, що відповідає очікуваному для гена *bar*. ПЛР з ДНК плазміди рІСН3744 слугувала позитивним контролем. Не було виявлено будь-якого фрагмента після ампліфікації загальної ДНК контрольної (нетрансформованої) рослини з праймерами до гену *bar*, це слугувало негативним контролем.

Наявність гена *nptII* у ядерному геномі отриманих рослин ріпаку (покоління Т₃) показано за допомогою ПЛР з відповідними праймерами (табл. 2.1, рис. 3.5).

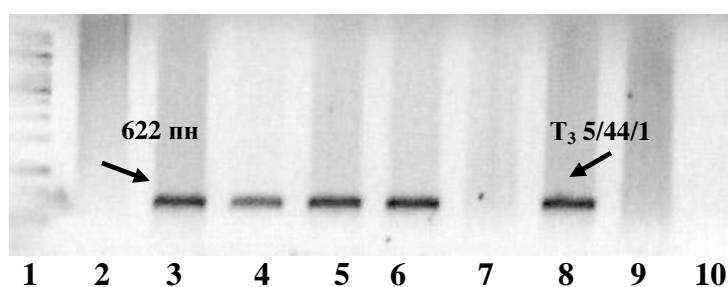


Рис. 3.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації сумарної ДНК рослин з праймерами до гена *nptII*:

1 – маркер молекулярних мас; 2 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Обрій; 3– 5 – первинні трансформанти ліній 18a, 18b, 18c (розділ 3.2.3), 6 – трансформант першого покоління лінії 18b/24 (розділ 3.2.3) ; 7 – первинний трансформант лінії Vn9/125/3 (розділ 3.2.4); 8 – трансформант третього покоління лінії Vn5/44/1; 9 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Калинівський, 10 – без ДНК, негативний контроль.

3.2.3. Генетичний аналіз рослинних ліній. Дев'ять ліній рослин первинних трансформантів (покоління Т₀), отриманих в результаті експериментів з векторною конструкцією рІСН 3744 на основі сорту Калинівський, що були відібрані на селективних середовищах з фосфінотрицином і для яких було показано наявність гена *bar* в ході ПЛР-аналізу, були висаджені в ґрунт в умовах теплиці. Адаптація до закритого ґрунту проходила без ускладнень. Усі висаджені рослини продовжували свій

ріст в теплиці. Вони мали нормальну морфологію вегетативних і, в більшості, генеративних органів. Цвітіння наставало за такий же час, що і у контрольних, нетрансформованих рослин. Квітки семи з дев'яти трансгенних ліній ріпаку не відрізнялись від контрольних. У двох ліній було відмічено явище гетеростилії: подовжена маточка і вкорочені тичинки. При самозапиленні (розд.2.4) у ліній Vn5/44/1, Vn5/44/2, Vn5/44/5, Vn5/44/11, Vn5/44/15, Vn5/44/17 і Vn5/44/19 сформувались стручки, які достовірно не відрізнялись за розмірами від стручків вихідних рослин (рис.3.6), і зав'язалось насіння (табл.3.3).



Рис.3.6. Стручки, отримані з вихідних рослин сорту Калинівський (А) і рослин лінії Vn5/44/19 (Б) в умовах теплиці.

Подібні результати були отримані в роботах Радчук [и др.] [17]; Cardoza, Stewart [90], Wang Y. et al. [467] та Wang W. et al. [468]. Слід також зазначити, що результати наших досліджень деякою мірою відрізняються від таких, що їх отримано в експериментах Ралдугиной и др. [18], де всі рослини T_0 мали аномалії в будові квіток, і тільки для одного з семи клонів вдалось отримати чотири нормальні насінини при примусовому самозапиленні. Автори припустили, що комплексна стерильність трансформантів може бути визвана порушенням гормонального балансу отриманих рослин. Ймовірно, в

наших дослідах умови проведення трансформації не вплинули з такою дезорганізуючою силою на рослинну систему, або дались ознаки сортові відмінності генотипів, що їх було задіяно в експерименти. Слід взяти до уваги і особливості векторних конструкцій: різні цільові гени – *bar* і ген дельта-ендотоксина із *Bacillus thuringiensis* підвиду *kustaki* HD-1-Dipel – можуть по-різному впливати на геном і фізіологічні властивості створених трансгенних рослин.

Таблиця 3.3

**Характеристика T₁ покоління трансгенних ліній ріпаку (сорт
Калинівський, вектор pICH 3744)**

Лінія	Маса 100 насінин (мг)	Схожість <i>in vitro</i> * (%)	Кількість рослин		Розщеплення	χ^2
			РРТ- стійких	РРТ- нестійких		
<i>Bn5/44/1</i> , T ₁	278	94	72	22	3:1	0,13
<i>Bn5/44/2</i> , T ₁	284	88	69	19	3:1	0,55
<i>Bn5/44/5</i> , T ₁	280	84	66	18	3:1	0,57
<i>Bn5/44/11</i> , T ₁	278	100	78	22	3:1	0,48
<i>Bn5/44/15</i> , T ₁	281	98	72	26	3:1	0,12
<i>Bn5/44/17</i> , T ₁	276	81	62	19	3:1	0,15
<i>Bn5/44/19</i> , T ₁	280	90	68	22	3:1	0,01
<i>Калинівський</i> (контроль)	310	90	-	90	-	-

* Пророщували по 100 насінин кожної лінії.

Насіння, отримане при самозапиленні первинних трансформантів, стерильно пророщували і тестували на стійкість до РРТ (розд.2.5). Схожість насіння з трансформованих рослин в умовах *in vitro* достовірно не відрізнялась від такої у контрольних рослин (табл.3.3). Розщеплення, що його спостерігали по експресії інтегрованого гена *bar* в умовах *in vitro*, становило

приблизно 3:1 (табл. 3.3). Це говорить про те, що у геномі аналізованих рослин знаходилась одна копія перенесеного гена *bar*.

Результати тестування на стійкість до РРТ у проростків T₁ корелювали з результатами ПЛР-аналізів. У рослин першого–третього покоління трансформантів зберігалась здатність рости на середовищах з канаміцином (рис. 3.7).

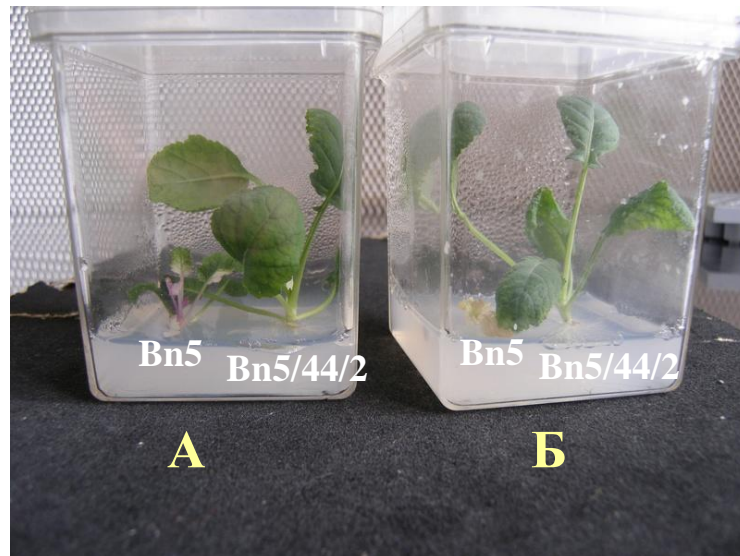


Рис. 3.7. Контрольна (Vn5) і трансгенна (Vn5/44/2, яка експресує ген *nptII* і безпромоторний ген *bar*) рослини після 4 тижнів росту на середовищах з канаміцином (А, 50 мг/л) і фосфіотрицином (Б, 10 мг/л).

Експланти листків з трансгенних рослин формували калюс на середовищах для калюсоутворення з канаміцином, в той же час контрольні експланти гинули (рис. 3.8). Це вказує на те, що введені гени (*nptII* і *bar*) успадковувались стабільно і зчеплено.

Таким чином, в ході роботи були відібрані стійкі до РРТ лінії ріпаку, які характеризувались наявністю в своєму геномі гена *nptII* і лише кодуючої послідовності гена *bar*. Подібні результати під час трансформації тютюну [48] були отримані раніше. Крім того, було показано, що безпромоторний ген *bar* експресується завдяки оригінальному розташуванню в конструкції, а саме, між двома інвертованими *lox*-сайтами в безпосередній близькості до правої границі T-ДНК [49].

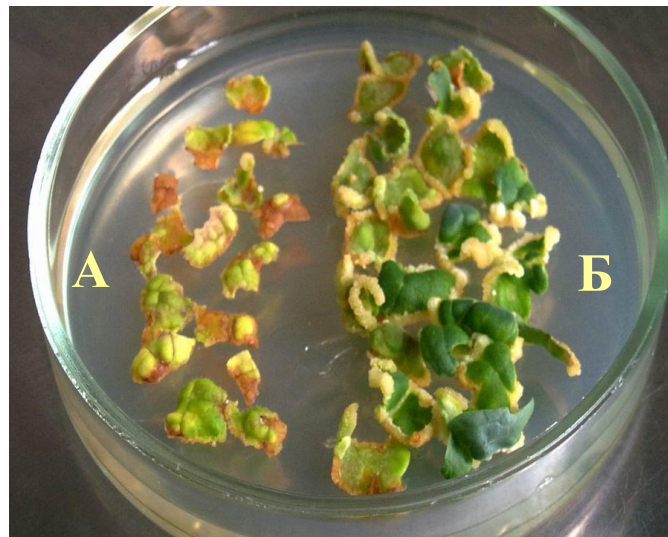


Рис. 3.8. Листові експланти ріпаку на середовищі для калюсоутворення з 50 мг/л канаміцина за три тижні від початку експерименту: А – контроль (сорт Калинівський), Б – експланти трансгенної лінії Bn5/44/1.

Інтегровані в геном ріпаку гени *nptII* і *bar* зберігали свою активність у наступних поколіннях T₁–T₃.

Результати опубліковано в [29, 398].

3.3. Отримання біотехнологічних рослин ріпаку з трансгеном *epsps*

3.3.1. Регенерація первинних трансформантів. Стійкі до гербіцидів, найчастіше до гліфосату і глюфозінату (рис.3.9), сільськогосподарські культури стабільно займають найбільшу площу серед біотехнологічних культур протягом всього періоду, що їх вирощують у світі, починаючи з 1996 року [168]. Наприклад, у 2013 р. такі сільськогосподарські культури вирощувались на площі 99,4 млн. га, що становило 57% від загальної площі посівів трансгенних культур (175,2 млн. га) у світовому виробництві. За перші 17 років комерціалізації (1996-2012) світовий прибуток від культивування стійких до гербіцидів сільськогосподарських культур оцінювався у 47,7 млрд. доларів США, що становило 41% від загального

отриманого прибутку від біотехнологічних культур у розмірі 116,9 млрд. доларів США. Річний прибуток від вирощування трансгенних гербіцид-стійких культур (на прикладі 2012 року) дорівнював 6,6 млрд. доларів США, загальний прибуток від вирощування біотехнологічних сільськогосподарських культур становив 18,7 млрд. доларів США.

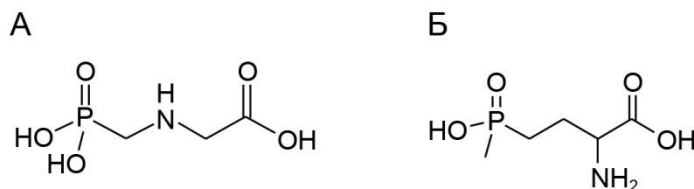


Рис. 3.9. Хімічна структура молекул гліфосата (А) і глюфозіната (Б).

Однією з шести комерціалізованих культур, стійких до гліфосату (*N*-фосфометилгліцин), окрім кукурудзи, сої, люцерни, цукрового буряка і бавовника, є ріпак [173]. Стійкий до гербіцидів ріпак (*Brassica napus*, т.з. аргентинський ріпак) зареєстрований в Австралії, Канаді, Чілі, Китаї, Європейському Союзі, Японії, Мексиці, Новій Зеландії, Філіппінах, Сінгапурі, Південній Африці, Південній Кореї, США. У Канаді вирощують також трансгенні рослини *Brassica campestris* (т.з. польський ріпак) [196].

В країнах ЄС зареєстровано 6 трансгенних подій ріпаку – GT73 і GT200 (Monsanto), MS8, RF3, MS8xRF3 і T45 (Bayer). Події, заявлені фірмою Монсанто, характеризуються стійкістю до гліфосату за рахунок експресії гена 5'-енолпируватшикиматфосфат синтази (*epsps*) [478]. Дозвіл на їх застосування дійсний до 2017 року [145]. Інші серед перерахованих вище зареєстрованих трансгенних подій мають стійкість до глюфозінату (фосфінотрицину), що її забезпечує експресія гена фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*).

Діючою речовиною гербіцида Раундап (Roundup Ready) є *N*-фосфометилгліцин (гліфосат). Він впливає на метаболічний шлях шикімової кислоти, блокуючи синтез деяких незамінних ароматичних

амінокислот, передусім, у точках росту стебла і кореня. Чутливий до гліфосату шлях метаболізму шикімової кислоти існує в клітинах бактерій, грибів, водоростей, рослин, протозоа, але відсутній у комах, рибах, птахів, ссавців. Тому гліфосат є безпечним для людини та інших організмів, у яких немає специфічної мішені – ферменту 5-енолпіруватшикімат-3-фосфат синтази (EPSPS).

Досягти стійкості трансгенних рослин до дії гліфосату можна декількома способами:

- за рахунок забезпечення надлишкового рівня фермента EPSPS в рослині;
- шляхом введення в рослину мутантного гена *epsps*, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосату;
- шляхом введення гена, що забезпечує деградацію гербіцида в рослині.

Найуспішнішим виявився другий напрямок. Ген, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосата і, таким чином, не інгібується, було виділено з агробактерії штама *CP4* і названо *CP4epsps*. В трансгенній рослині він забезпечує стійкість до дії гербіциду, повністю компенсуючи функцію нативного рослинного ферменту EPSPS, що її блокує гліфосат.

Стійкість трансгенних рослин ріпаку Roundup Ready до гліфосату продемонстрована у польових тестах у 1992 р. і додаткових польових випробовуваннях, які були проведені во всіх регіонах вирощування у США, Канаді, Європі і Австралії [208]. Ці рослини були вперше посіяні з комерційною метою у 1996 році у Канаді. У 2000 р. приблизно 2,2 млн га було засіяно ріпаком Roundup Ready у Канаді і США [208].

Метою даних експериментів було отримання рослин ріпаку зі стійкістю до гліфосата з використанням синтетичного гена *epsps*, конструкцію з яким було створено у відділі генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ к.б.н. І.К.Комарницьким. Крім того, важливо було поєднати стійкість до двох різних груп гербіцидів в одній рослині. Цей напрямок є сучасним підходом

до створення гербіцид-стійких трансгенних рослин, а саме отримання рослин, які поєднують стійкість до декількох гербіцидів одночасно. Це дасть змогу зменшити ризик виникнення спонтанно стійких бур'янів за рахунок чергування обробок гербіцидами з різними діючими агентами. Наразі створено сорт кукурудзи, в якому поєднано стійкість до гербіцидів на основі гліфосату і глюфозинату за рахунок схрещування трансгенних ліній Agrisure® і Duracade™ 5222 з експресією відповідних трансгенів [146]. Крім того, отримано рослини ріпаку з одночасною стійкістю до гліфосату і триазинів (Triazine tolerant Roundup Ready canola, Monsanto і Pacific Seeds) [476], також після схрещування трансгенних ліній.

В результаті експериментів з вектором pCB133, що несе ген *epsps* в якості цільового (розд.2.9), з використанням розробленої нами раніше методики (розд.3.1, [16]) отримано 17 незалежних фосфінотрицинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів, з них 7 ліній на основі сорту Ексголд, 4 лінії на основі сорту Титан, 3 лінії на основі сорту Обрій.

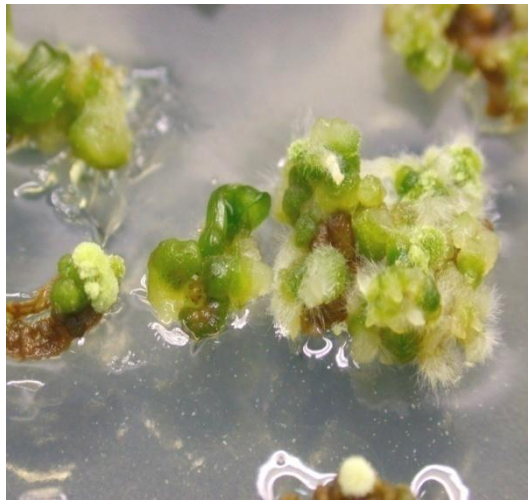


Рис. 3.10. Регенерація пагонів ріпаку на селективному середовищі з фосфінотрицином (трансформація вектором pCB133).

Регенеранти відбирались на середовищах з РРТ (рис. 3.10), тому що конструкція pCB133 мала також і ген *bar* (розд.2.6), а спроби провести селекцію на гліфосаті у нас виявились невдалими, хоча в деяких публікаціях

повідомлялось про використання фосфометилгліцину як селективного агента при відборі первинних трансформантів в асептичних умовах [300].

Відомо, що для отримання рослин ріпаку, стійких до гліфосату, використовували вектори зі зміненим амінокислотним складом фермента EPSPS [221], що дозволяло підсилити стійкість до гербіциду. Продовжуються роботи зі створення рослин, здатних до деградації гліфосату в рослині [313] шляхом експресії гліциноксидази з *Bacillus subtilis*.

3.3.2. ПЛР і ЗТ-ПЛР первинних трансформантів. Інтеграцію гена енолпірувілшікіматфосфатсинтази в рослинний геном показано за допомогою ПЛР (рис.3.11).

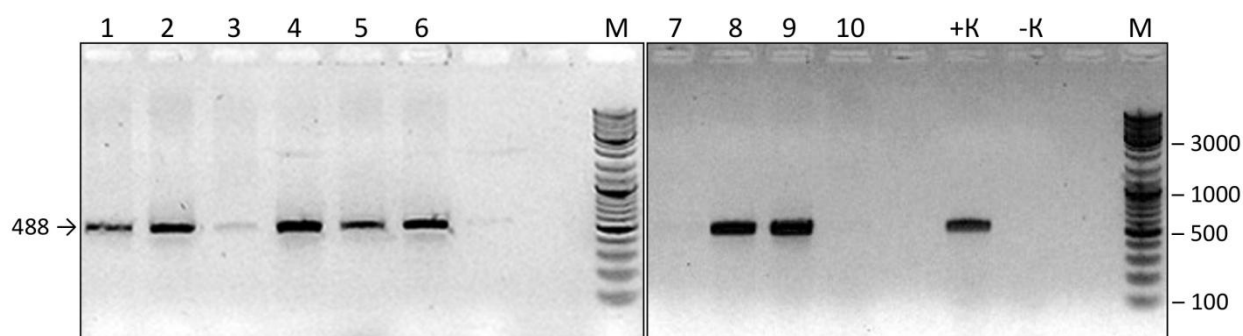


Рис.3.11. Електрофореграма продуктів ампліфікації зразків сумарної ДНК рослин ріпаку з праймерами, специфічними до гена *epsps* (вектор pCB133). Рослини були отримані на основі сортів Обрій (Bn18), Титан (Bn17) і Ексголд (Bn15): М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 1 – T₂15/133/2/9; 2 – T₂15/133/2/3; 3 – Bn12 (контроль, сорт Марія); 4 – 18a/2 (ген *desC* і *epsps*); 5 – T₁15/133/2/10; 6 – T₀15/133/5; 7 – Bn15 (контроль, сорт Ексголд); 8 – 18b/25 (ген *desC* і *epsps*); 9 – T₀17/133/4; 10 – T₂12c (ген *sup11A1*). +К – *Z.mays* GA21; -К – ТЕ буфер. Непідписані доріжки навмисно залишені порожніми у якості буферної зони.

В зразках негативного контролю не спостерігали синтезу фрагменту очікуваного розміру, тоді як у позитивному контролі і експериментальних

зразках детектували наявність фрагментів розміром 488 пн. Наявність генів стійкості до гербіцидів в ядерному геномі рослин ріпаку підтверджено у наступних поколіннях трансгенних рослин (T_1 і T_2), отриманих в умовах закритого ґрунту (рис. 3.11).

ПЛР зворотніх транскриптів підтвердила експресію введеного гена, що надає рослинам стійкості до гербіцидів на основі фосфометилгліцину (гліфосату), на рівні транскрипції. Синтез матричної РНК гена *epsps* не відбувався у зразках, взятих з регенованих після трансформації з використанням вектора рСВ133 рослин, без додавання зворотної транскриптази (негативний контроль), тоді як при її додаванні спостерігали синтез фрагментів розміром 488 пн (рис.3.12).

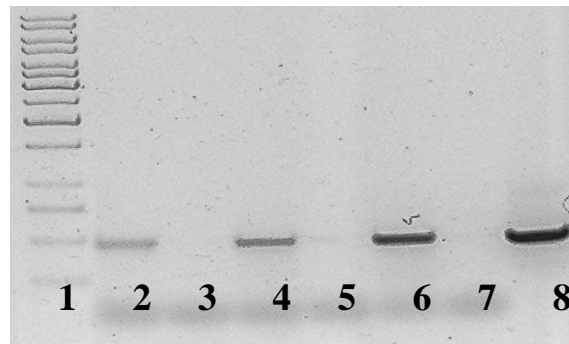


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ампліфікації зворотніх транскриптів: 1 – маркер молекулярних мас; 2,4,6 – продукти ампліфікації незалежних ліній трансгенних рослин ріпаку після синтезу першого ланцюга ДНК з додаванням ревертази М-MuLV; 3, 5, 7 – продукти ампліфікації незалежних ліній трансгенних рослин ріпаку після синтезу першого ланцюга ДНК без додавання ревертази (негативний контроль); 8 – ДНК вектора рСВ133, позитивний контроль.

3.3.3. Тестування на стійкість до обробки гліфосатом і генетичний аналіз. Лінії ріпаку, відібрані за допомогою молекулярно-біологічних аналізів серед регенованих на середовищах з РРТ (5 мг/л), були розмножені *in vitro* для подальшої висадки в закритий ґрунт:

- Vn15/133/1, Vn15/133/2, Vn15/133/3, Vn15/133/4, Vn15/133/9, створені на основі сорту Ексголд,
- Vn17/133/4, Vn17/133/5, Vn17/133/1, створені на основі сорту Титан.

Висаджені в умовах теплиці в ґрунт рослини легко адаптувались. За три тижні після висадки в ґрунт була проведена обробка розчином гліфосату (2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»). В результаті обприскування сформоване раніше листя контрольних рослин зів'яло, листочки, що були в процесі формування, набули світло-жовтого кольору (рис.3.13).

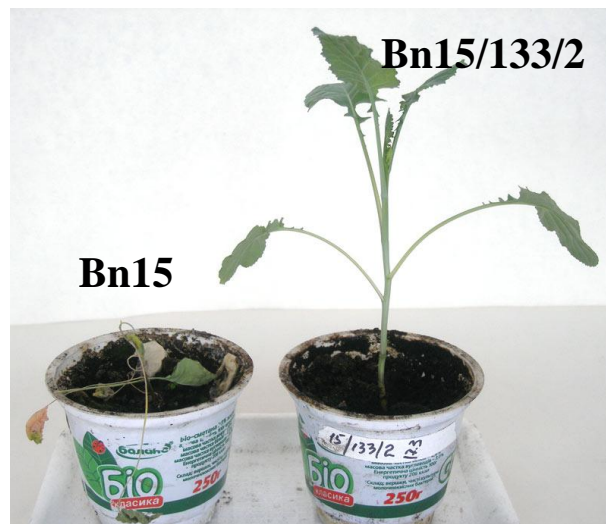


Рис.3.13. Результати обробки трансгенних рослин ріпаку з геном *epsps* розчином гліфосату в теплиці: Vn15 – вихідна рослина, сорт Ексголд; 15/133/2 – первинний трансформант.

Первинні трансформанти ліній Vn15/133/2, Vn15/133/4, Vn17/133/4, Vn17/133/5 не мали ознак зневоднення після обробки гербіцидом. Молоді листочки формувались зеленого кольору. Одна з аналізованих ліній, Vn15/133/3, загинула після обприскування гліфосатом, що може свідчити про низьку експресію введеного гена *epsps*.

З рослин, що витримали обробку гербіцидом, було отримано насіння в результаті самозапилення (розд.2.4). Його стерильно пророщували на середовищах з додаванням РРТ (10 мг/л) і спостерігали розщеплення за

стійкістю до гербіциду. У рослин лінії Vn15/133/4 розщеплення за ознакою стійкості до селективного агента не спостерігали (рис.3.14), що говорить про встроювання більш, ніж однієї копії трансгена.



Рис. 3.14. Пророщування насіння лінії Vn15/133/4 на безгормональному середовищі з додаванням фосфінотрицина (10 мг/л).

Для рослин лінії Vn15/133/2 виявлено розщеплення 3:1, що свідчить про однокопійну вставку чужорідного гена. Стійки до РРТ проростки T₁ покоління лінії Vn15/133/2 було розмножено *in vitro* і висаджено в теплицю, загалом десять ліній. При аналізі отриманого при самозапиленні насіння в другому поколінні трансгенних рослин виявлено шість гомозиготних ліній за ознакою стійкості до РРТ (табл.3.4). Обробка двох з цих ліній (T₂Vn15/133/2/3 і T₂Vn15/133/2/5) рослин, висаджених в закритий ґрунт показала, що вони проявляють і стійкість до гліфосату.

Таким чином, нами отримано 17 незалежних фосфінотрицинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів, що несуть в своєму ядерному геномі синтетичний ген енолпируватшкіматфосфатсинтази (*epsps*). Ці рослини характеризувались стійкістю одночасно до двох гербіцидів – BASTA і Roundup. Наявність інтегрованого гена *epsps* показана за допомогою ПЛР, синтез матричної РНК продемонстровано в результаті проведення ПЛР зворотніх транскриптів. Відібрано шість гомозиготних ліній ріпаку,

отриманих на основі сорту Ексголд, які є стійкими до обробки гліфосатом в умовах теплиці.

Таблиця 3.4

Генетичний аналіз рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar*

Лінія	Схожість насіння <i>in vitro</i> , %	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	χ^2 *
		PPT ⁺	PPT ⁻		
T ₁ 15/133/2	99	73	26	3:1	0,08
T ₁ 15/133/4	94	94	–	відсутнє	–
T ₁ 15/133/5	97	74	23	3:1	0,05
T ₁ 15/133/9	98	72	26	3:1	0,11
T ₁ 17/133/1	92	68	24	3:1	0,01
T ₁ 17/133/4	100	100	–	відсутнє	–
T ₁ 17/133/5	95	70	25	3:1	0,08
T ₁ 17/133/7	97	68	29	3:1	0,91
T₂ 15/133/2/1	98	98	–	відсутнє	–
T₂ 15/133/2/2	100	100	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/3	98	70	28	3:1	0,61
T₂ 15/133/2/4	99	99	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/5	97	68	29	3:1	1,11
T ₂ 15/133/2/6	97	71	26	3:1	0,08
T₂ 15/133/2/7	98	98	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/8	97	68	29	3:1	1,11
T₂ 15/133/2/9	100	100	–	відсутнє	–
T₂ 15/133/2/10	98	98	–	відсутнє	–
Vn15 (контроль)	96	–	96	відсутнє	–
Vn17 (контроль)	99		99	відсутнє	

Примітка: *- $\chi^2_{st} = 3,84$, Vn15 – сорт Ексголд; Vn17 – сорт Титан

Результати опубліковано в [34, 36, 37, 430].

3.4. Отримання рослин ріпаку з геном *desC* ціанобактерії

3.4.1. Регенерація рослин з трансгеном *desC* та їх молекулярно-біологічний і біохімічний аналіз. Через зміни кліматичних умов важливою стає така характеристика рослин як толерантність до стресових факторів різного походження, в тому числі до знижених температур і фітопатогенів.

Одним із механізмів адаптації рослин до холоду є збільшення ступеня ненасиченості залишків жирних кислот в клітинних мембранах, що забезпечує необхідну текучість мембран за знижених температур [269]. Так, наприклад, показано, що під час зниження середньодобової температури відбувається закономірне зменшення вмісту насичених і збільшення вмісту ненасичених жирних кислот в листках чотирьох досліджуваних видів лікарських рослин, характерних для Передбайкалля – вероники дібрової (*Veronica chamaedrys* L.), манжетки звичайної (*Alchemilla vulgaris* L.), деревію (*Achillea millefolium* L.) та кульбаби (*Leontodon helveticus* L.) [7]. В тканинах коренів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і пирійника сибірського (*Elymus sibiricus* L.) біосинтез α -ліноленової кислоти контролюється мікросомальною $\omega 3$ десатуразою. При цьому вміст α -ліноленової кислоти збільшувався з 6,1 до 17,1 % у пшениці та з 7,1 до 12,0 % у *E.sibiricus* [13]. Каталізують перетворення одинарного зв'язку між атомами вуглецю в ацильних ланцюгах (C–C) в подвійний зв'язок (C=C) десатурази жирних кислот. Згідно з наявними даними, у вищих рослин синтез $\Delta 9$ -мононенасичених жирних кислот відбувається у пластидах, а утворення додаткових подвійних зв'язків може проходити як в пластидах, так і в ендоплазматичному ретикулумі. Однак наявні повідомлення щодо клонування генів, які кодують $\Delta 9$ -ацил-ліпідні десатурази, які можуть забезпечувати проходження цих реакцій поза пластидами [204].

Із використанням біотехнологічних підходів на сьогодні отримано низку рослин з підвищеним вмістом моно- і поліненасичених жирних кислот у складі мембранних ліпідів. Шляхом агробактеріальної трансформації (*Agrobacterium tumefaciens*) в геном тютюну (*N. tabacum* L.) було введено ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Anacystis nidulans*. Цей фермент каталізує утворення *цис*-подвійного зв'язку в позиції $\Delta 9$ як в 16-, так і в 18-вуглецевих насичених жирних кислотах. Як наслідок у створених рослин значно зростала кількість ненасичених жирних кислот у більшості мембранних ліпідів, що приводило до суттєвого підвищення холодостійкості [204]. Схожі зміни холодостійкості спостерігали і у рослин тютюну, отриманих після прямої (за допомогою поліетиленгліколя) трансформації протопластів з використанням векторів, які мали в своєму складі або кДНК $\Delta 9$ -десатурази ціанобактерії *Anacystis nidulans*, або кДНК $\Delta 9$ -десатурази з картоплі *Solanum commersonii*, толерантної до низьких температур [107]. Введення гетерологічних десатураз різного походження приводило до схожих результатів щодо підвищення холодостійкості. Експресія $\Delta 9$ -десатурази ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* [321] і FAD7 десатурази *Arabidopsis thaliana* L. [240] у рослинах тютюну також давала трансформантам можливість витримувати значні холодові навантаження. Рослини картоплі (*Solanum tuberosum* L.) ставали більш стійкими до знижених температур після введення гена $\Delta 12$ десатурази із *Synechocystis* sp. PCC 6803 [280], а також гена $\Delta 9$ десатурази із дикої картоплі (*Solanum commersonii*) [120].

При вивченні впливу стресових чинників на плоди авокадо показано, що експресія $\Delta 9$ десатурази (AvFAD9) збільшувалась під дією багатьох факторів: при обробці їх етиленом або вуглекислим газом, при низькій температурі (4°C), при пошкодженні плодів, при інокуляції спорами патогенного гриба *Colletotrichum gloeosporioides*. Плоди з підвищеною активністю $\Delta 9$ десатурази були більш стійкими до ураження *S. gloeosporioides* [281]. Відмічали затримку появи симптомів ураження при

інокуляції суспензією зооспор гриба *Phytophthora infestans* листків рослин картоплі, що експресували десатуразу $\Delta 12$ *Synechocystis* sp. PCC6803 [46].

В конструкції pBISN-*desC::lic*BM3, переданої нам для експериментів, селективним був ген *nptII* (розд.2.9), що забезпечує рослинам можливість рости на середовищах з канаміцином. Відомо, що за використання цього селективного агента у роботі з рослинами родини хрестоцвітих виникає ряд труднощів на етапі регенерації [17, 20, 183, 436]. Низькі дози цього антибіотика провокують появу псевдотрансформантів, які за подальшого культивування під селективним тиском гинуть. Значні концентрації канаміцина перешкоджають самому процесу регенерації [17, 20, 183, 436]. Як вихід рекомендують зняття на певний час селективного тиску, що призводить до збільшення тривалості періоду, необхідного для отримання трансформантів. Раніше було показано, що використання фосфінотрицина сприяє збільшенню кількості регенерантів ріпаку [197]. Позитивний вплив PPT на регенерацію і трансформацію спостерігали і в експериментах з цукровою тростиною [286]. PPT виявився кращим селективним агентом для цієї культури, ніж канаміцин і женецитин.

Ми провели два типи експериментів з отримання рослин ріпаку з гетерологічним геном $\Delta 9$ десатурази ціанобактерії:

- Послідовна трансформація – вихідною рослиною для трансформації була трансгенна лінія 9/93/15 (отримана на основі сорта Магнат білоруської селекції, цільовий ген *sup11A1*, розд. 3.6). Ми вважали, що трансгенна лінія має бути більш адаптованою до умов асептичної культури, бо вона одного разу вже пройшла усі етапи трансформації. Ми сподівались, що інфікування агробактерією, яка несе вектор з геном десатурази і селективним геном *nptII*, та наступний відбір на регенераційних середовищах з канаміцином дозволять отримати нові трансформовані рослини.
- Експерименти щодо отримання подвійних трансформантів мали на меті створити рослини з цільовим геном *desC* у складі гібридного гена і

одночасно уникнути негативного впливу канаміцину як компонента середовища, який забезпечує селекцію під час регенерації трансформованих пагонів. Тому ми використали одночасно вектор рСВ133, Т-ДНК якого мала ген *bar*, що давало рослинам змогу рости на середовищах із РРТ, і вектор рBISN-*desC::licBM3* для інфікування рослинних експлантів. Вихідною була нетрансформована рослина, сорт Обрій.

В першій серії експериментів було отримано 10 стійких ліній рослин на регенераційних середовищах з канаміцином (50 мг/л). Толерантні до селективного агента пагони регенерували зеленими, а нестійкі мали зелено-пурпурові, пурпурові або білі листки і меристематичні центри (рис. 3.15).



Рис.3.15. Регенерація пагонів ріпаку з листових експлантів на середовищі з канаміцином (50 мг/л) в експериментах з використанням лінії 9/93/15 в якості вихідної і вектора рBISN-*desC::licBM3*.

Частина регенерантів мала мозаїчні за забарвленням листки (рис.3.16), що свідчить про химерність цих рослин.

У другій серії експериментів було отримано три лінії рослин ріпаку на основі сорта Обрій, які мали чотири гетерологічні гени: селективні (*nptII* і *bar*) і цільові (*epsps* і *desC::licBM3*) завдяки одночасному сокультуванню

експлантів ріпаку з двома агробактеріальними векторами (pCB133 і pBISN-*desC::licBM3*). Селекцію проводили на середовищах з PPT (рис. 3.17).



Рис.3.16. Хімерна рослина регенерант, селектована на регенераційному середовищі з канаміцином (50 мг/л) в експериментах з використанням конструкції pBISN-*desC::licBM3*.



Рис. 3.17. Регенерація пагонів ріпаку на середовищі з PPT (5мг/л) при одночасному використанні конструкцій pCB133 і pBISN-*desC::licBM3*.

В експериментах з одночасним введенням генів з двох векторів після селекції на PPT відібрано 17 ліній. ПЛР-аналіз виявив наявність введених

цільових генів (*epsps*, *desC::licBM3*) (рис.3.18) і селективних генів *nptII* і *bar* (рис.3.19) в ядерному геномі трьох ліній ріпаку– Vn18a, Vn18b, Vn18c.

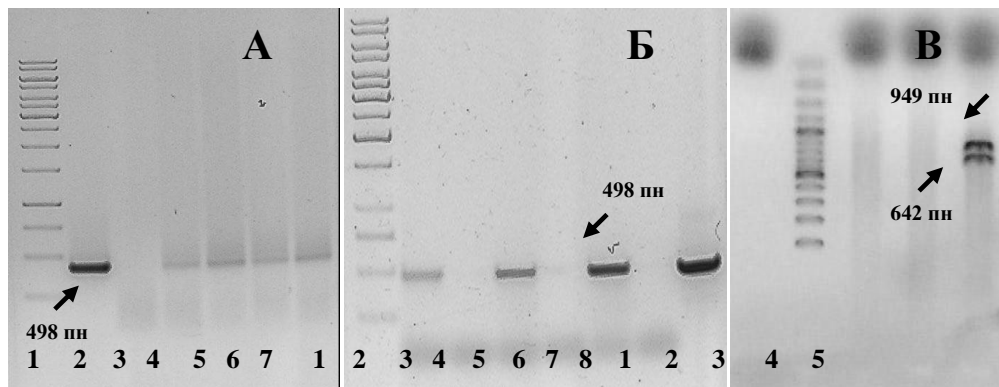


Рис.3.18. Електрофореграми продуктів ампліфікації зразків сумарної ДНК рослин ріпаку з праймерами, специфічними до гена *epsps* (А), злитого гена *desC* і *licBM3* (В) і зворотніх транскриптів, синтезованих на матриці *epsps* (Б):

А – 1 – маркер молекулярних мас; 2 – ДНК вектора pCB133; 3 – негативний контроль, ДНК вихідної рослини; 4–6 – незалежні трансгенні лінії Vn18/133;

Б – 1 – маркер молекулярних мас; 2, 4, 6 – первинних трансформантів ліній Vn18a, Vn18b і Vn18c після синтеза першого ланцюга ДНК без додавання ревертази (негативний контроль); 3, 5, 7 – продукти ампліфікації тих самих ліній рослин після синтеза першого ланцюга ДНК з додаванням ревертази; 8 – ДНК вектора pCB133, позитивний контроль.

В – 1 – негативний контроль, без ДНК; 2 – маркер молекулярних мас O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Литва); 3 – негативний контроль, вихідний ріпак сорта Обрій; 4 – негативний контроль, трансгенний ріпак с геном *sur11A1*, лінія Vn12/93/2 (розд.3.6); 5 – лінія Vn18a з генами *desC* і *licBM3*.

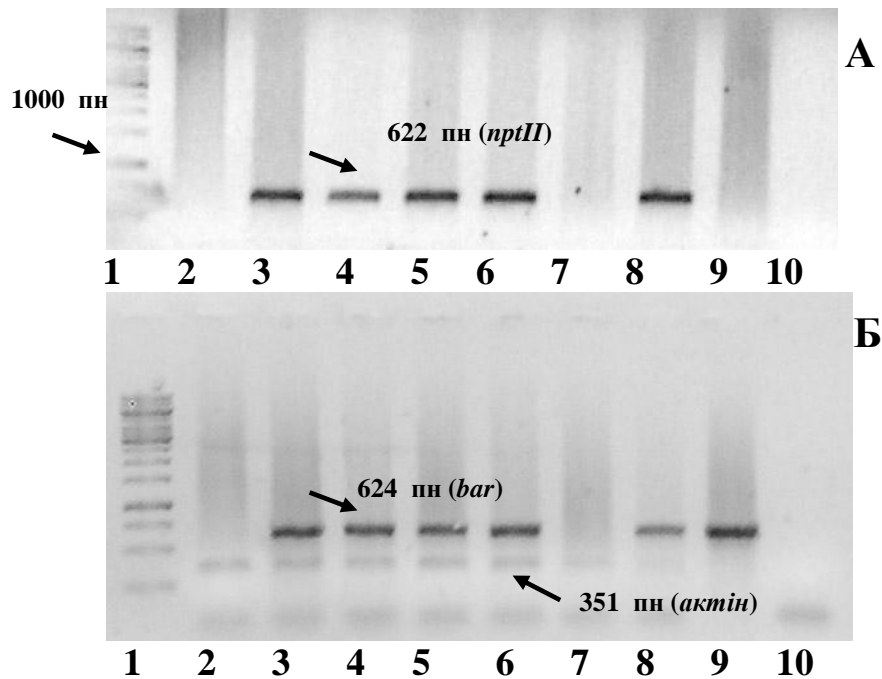


Рис.3.19. Електрофореграма продуктів ампліфікації зразків сумарної ДНК рослин ріпаку з праймерами, специфічними до генів *nptII* і *bar*:

А: 1 – маркер молекулярних мас; 2 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Обрій; 3–5 – первинні трансформанти ліній 18а, 18b, 18с, 6 – трансформант першого покоління лінії 18b/24; 7 – первинний трансформант лінії Vn9/125/3 (ген *HuInf- α 2b*, розділ 3.2.4); 8 – трансформант третього покоління лінії Vn5/44/1 (гени *bar* і *nptII*, розд.3.2.1); 9 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Калинівський, негативний контроль; 10 – без ДНК, негативний контроль;

Б: 1 – маркер молекулярних мас; 2 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Обрій; 3–5 – первинні трансформанти ліній 18а, 18b, 18с, 6 – трансформант першого покоління лінії 18b/24; 7 – ДНК нетрансформованої рослини, сорт Калинівський, 8 – трансформант третього покоління лінії Vn5/44/1 (розд.3.2.1); 9 – трансгенний ріпак с геном *sup11A1*, лінія Vn12/93/2 (розд.3.6); 10 – без ДНК, негативний контроль.

Інші лінії характеризувались наявністю двох гетерологічних генів із вектора pCB133 – *epsps* і *bar* (рис.3.19). Для детекції генів *desC* і *licBM3*, а

також гена *bar* проводили дуплексну ПЛР, тобто за один раунд аналізу визначали наявність двох генів: ліхенази і десатурази (рис.3.18, В) або актїна і РРТ (рис.3.19, Б). Актїн використовується в якості маркера якості виділеної ДНК. Умови проведення реакцій розроблені к.б.н. І.М. Герасименко (лабораторія біосинтезу природних сполук ІКБГІ НАНУ).

Одночасна інтеграція двох Т-ДНК наблюдалась з частотою 17,6 %. В експериментах з арабідопсисом також спостерігали встроювання двох і трьох Т-ДНК (з частотою 30% і 9,5%, відповідно) під час трансформації рослин одразу трьома векторами з різними генетичними конструкціями [353]. В інших експериментах з ріпаком також було отримано рослини, які несли два цільових гена, доставлені в різних векторах [117]. Інтеграція двох генів (*bar* і *gus*) після бомбардування двома плазмідними ДНК показана у регенерантів з частотою 50% [413].

Інтеграція різних генів в одній або декількох конструкціях є доцільною для вивчення метаболічних шляхів та забезпечення змін у їх функціонуванні, отриманні складних білків або білкових комплексів, для дослідження генетичного контролю і регуляції [229, 310]. Ми застосували цей підхід для отримання трансформованих рослин із заданими цільовими генами, використовуючи для відбору найбільш прийнятний для ріпаку селективний фактор (фосфінотрицин).

Подальші дослідження проводили, використовуючи лінії рослин, які мали чотири гетерологічні гени. Активність гена *epsps* в рослинах ріпаку була показана на рівні транскрипції в результаті ПЛР зворотніх транскриптів (рис.3.18, Б). Крім того, вона тестувалась в умовах *in vitro* при рості на середовищі з *N*-фосфонометілгліцином (2,5 мг/л) і після обробки рослин в теплиці (рис.3.20).

В асептичних умовах рослини всіх трьох ліній нормально розвивались, залишаючись зеленими і зберігаючи здатність до коренеутворення без додаткової стимуляції на селективному середовищі з *N*-

фосфометілгліцином (2,5 мг/л) (рис.3.20, А). Контрольні нетрансформовані рослини жовтіли, не утворювали нових листків і коренів.

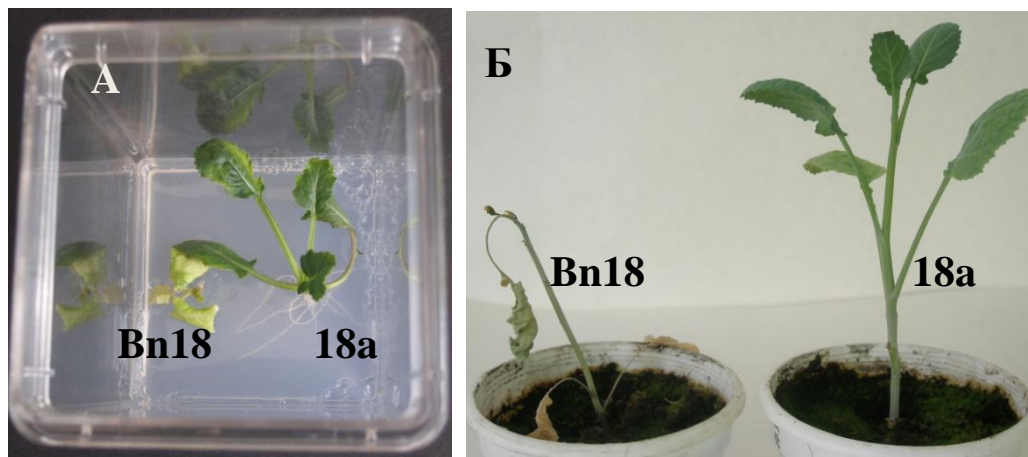


Рис. 3.20. Тестування стійкості до гліфосату: А – 2-тижневі рослини вихідного сорта Обрій (Bn18) і лінії 18а в умовах *in vitro* на безгормональному агаризованому середовищі MS із *N*-фосфометілгліцином (2,5 мг/л); Б – 3- тижнева нетрансформована рослина (Bn18) і трансформант лінії 18а після обробки в теплиці гербіцидом Ураган Форте 500 SL.

В умовах закритого ґрунту трансформанти витримували обприскування робочим розчином гліфосата, в той час як контрольні рослини в'яли і не були здатні до подальшого росту (рис. 3.20, Б).

Ліхеназний чашечний тест був позитивним для всіх трьох ліній, що свідчило про експресію гібридного гена *desC::licVM3* (рис. 3.21). Поява світлих плям в місцях гідролізу ліхенана після інкубації рослинних екстрактів з ліхенаном з наступним фарбуванням розчином Конго червоного говорить про активність гена ліхенази. Раніше було показано, що за активністю репортерного білка, ген якого є транскрипційно злитим з геном цільового білка, можна судити про активність цільового білка [12]. В лунку № 2 було внесено білковий екстракт з нетрансформованої рослини, і гідролізу ліхенана не спостерігається. В інших лунках були внесені екстракти

різних трансгенних рослин, для яких показано наявність гібридного гена *desC::licVM3*. Місця гідролізу ліхенана мають різну площу, що може свідчити про різний рівень активності репортерного і, відповідно, цільового гена.

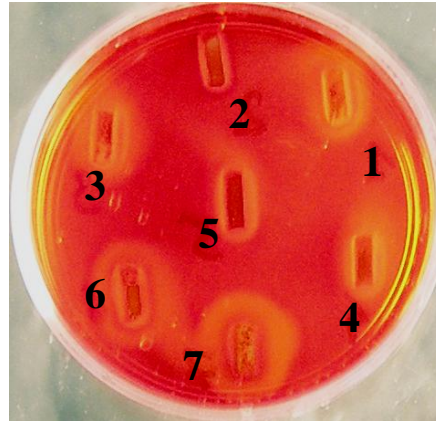


Рис. 3.21. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази в рослинах ріпаку, в яких наявний ген *desC-licVM3*. В лунки з агаризованим середовищем, яке має в своєму складі ліхенан, внесено рослинні екстракти ліній: 1 – первинного трансформанта 18b; 2 – вихідного сорта Обрій; 3 – первинного трансформанта 18a; 4–6 – трансформантів першого покоління ліній 18a/6, 18a/2, 18b/25; 7 – лінії тютюну, що експресує ген *desC::licVM3* (позитивний контроль).

Первинні трансформанти (18a, 18b) було висаджено в ґрунт в умовах теплиці. Вони легко адаптувались, зацвітали (рис.3.22) і дали фертильне насіння після самозапилення.

Отримане насіння стерильно пророщували на середовищах з РРТ (10 мг/л). Не спостерігали розщеплення серед проростків, що свідчить про встроювання більш ніж однієї копії трансгена *bar*. Потім проростки переносили на середовище з канаміцином (рис. 3.23), де відмічали розщеплення у співвідношенні 1:2 (стійкі : не стійкі).

Подібна ситуація описана в роботі Spencer T.M. et al. [413], де після біолістичної трансформації були отримані регенеранти кукурудзи, які мали

гени *bar* і *gus*. Гетерологічні гени знаходились в різних векторах, селекція велась на середовищах з PPT. Вісім з шістнадцяти аналізованих регенерантів мали ген *gus*.

Виявилось, що після трьох років субкультивування в умовах асептичної культури для трансгенних рослин ріпаку, отриманих в даних експериментах, характерна незмінна активність гетерологічних генів і не спостерігається явище замовкання трансгенів.



Рис. 3.22. Цвітіння первинного трансформанта лінії 18а (покоління T_0) за умов теплиці.

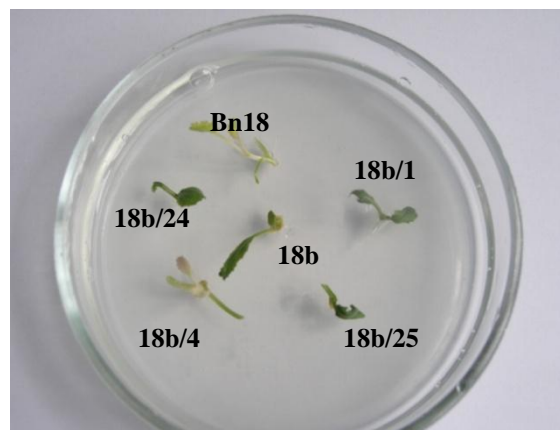


Рис. 3.23. Культивування на середовищах з канаміцином (100 мг/л) пагонів T_0 і T_1 покоління трансформантів лінії 18b: Vn18 – контроль, сорт Обрій; 18b – первинний трансформант; 18b/1, 18b/4, 18b/24, 18b/25 – рослини T_1 покоління, отримані в результаті самозапилення лінії 18b.

Пагони рослин T_1 покоління, висаджені на середовища із відповідними селективними агентами, розвиваються нормально, залишаються зеленими, формують корені, в той час як нетрансформовані, контрольні пагони жовтіють (у випадку додавання до середовища PPT) або набувають пурпурового за рахунок синтезу антоціанів і потім білого забарвлення (у випадку додавання до середовища канаміцину) і гинуть (рис.3.24).

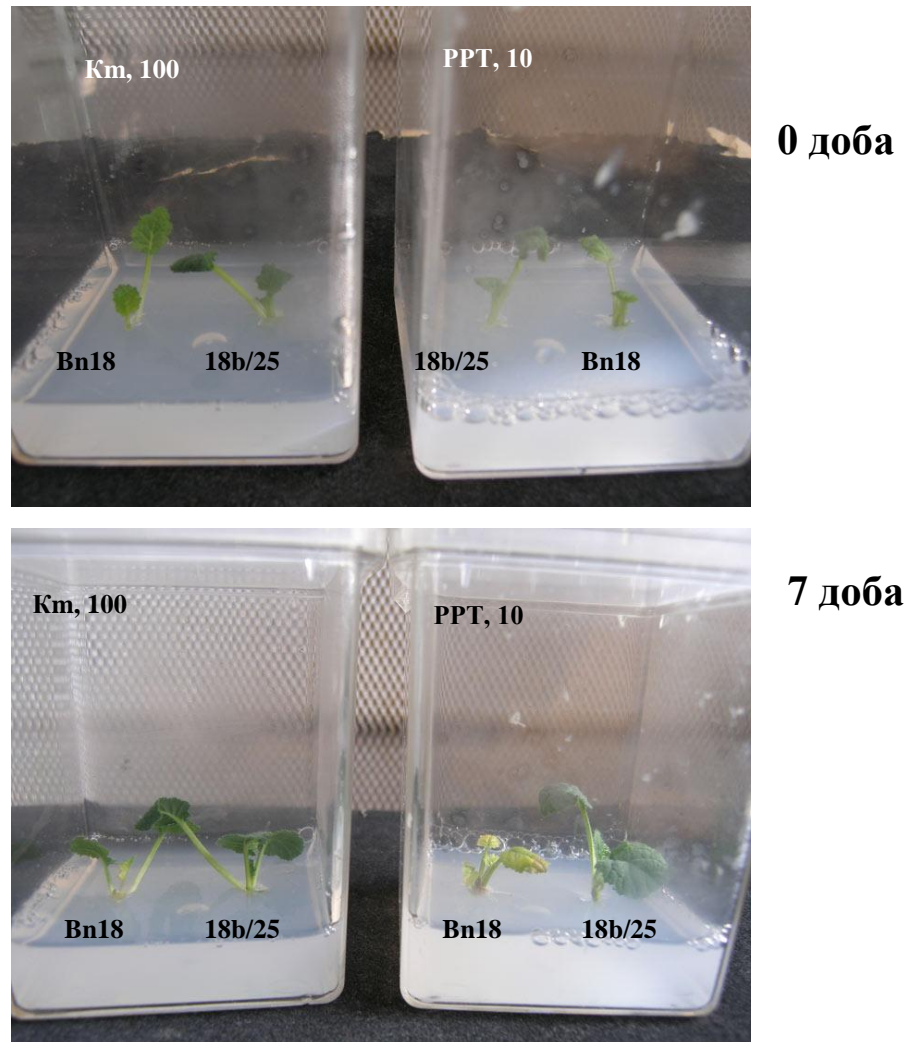


Рис.3.24. Тестування стійкості до канаміцину і фосфінотрицину пагонів контрольної (Bn18) і трансгенної (18b/25) ліній за тиждень росту на селективних середовищах з канаміцином (100 мг/л) і фосфінотрицином (10 мг/л). Лінії підтримувались в умовах *in vitro* шляхом мікророзмноження верхівкових або адвентивних бруньок три роки.

Стійкі до канаміцину і PPT проростки тестували на активність ліхенази (рис. 3.21). Експресія ліхенази, визначена за допомогою чашечного теста,

позитивно корелювала зі стійкістю проростків до канаміцину (табл. 3.5). Кількісне визначення активності фермента показало, що в контрольних рослинах її не спостерігалось, а серед проаналізованих трансгенних ліній виявлялись відмінності у рівні експресії (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Активність ліхенази в рослинах ріпаку, що мають ген *licBM3*
термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum***

№	Назва лінії	Активність ліхенази (чашечний тест)	Стійкість до канаміцину	Активність ліхенази, мкМ глюкози*10 ⁻⁶ / (мкг білка*сек)
1	Vn18 (контроль)	–	–	Не детектується
2	18b	+	+	9,28
3	18a	+	+	5,52
4	18a/6	+–	+	2,64
5	18a/2	+–	+	Не детектується
6	18b/25	+	+	5,02
7	Vn9/93/15 (контроль)	–	–	Не детектується
8	9a	–	–	Не детектується
9	9c	–	–	Не детектується

Найвищою активністю ліхенази характеризувалась лінія 18b. Лінії 18a і 18b/25 мали подібні між собою показники активності, але значно нижчі, ніж у лінії 18b (менше приблизно на 40%). Активність термостабільної ліхенази у запропонованих умовах реакції детектувати не вдалось для лінії 18a/2. У лінії 18a/6 (T₁ покоління) експресія ліхенази дорівнювала 47,57% активності цього фермента в листках лінії 18a (T₀ покоління). Первинні трансформанти ріпаку (18b і 18a) мали більш високу активність ліхенази у порівнянні з рослинами першого покоління, отриманими в результаті самозапилення вихідних ліній (18b/25, 18a/2, 18a/6).

Наявність активності термостабільної ліхенази свідчить про експресію гібридного гена, і, в його складі, цільового гена $\Delta 9$ -десатурази. Можна зробити висновок, що спостерігається різний рівень експресії цільового білка ($\Delta 9$ -десатурази в складі гібридного продукта) в трансгенних рослинах ріпаку, що може залежати від місця інтеграції чужорідної ДНК і кількості копій трансгена, що вбудувались. Схожі результати отримано методом зимограм при оцінюванні експресії ліхенази в складі гібридного білка Cru3aM-LicBM2 в рослинах картоплі, трансформованих для забезпечення захисту від колорадського жука [5]. Також різний рівень експресії ліхенази в складі гібридного білка DesA-LicBM3 детектовано в рослинах картоплі, які характеризувались підвищеним вмістом ліпідів в листках і збільшеною кількістю ненасичених жирних кислот в мембранних ліпідах [280].

Відсутність активності ліхенази в контрольних рослинах (Vn9/93/15 – лінія отримана на основі сорта Магнат білоруської селекції, цільовий ген *sup11A1*, розд. 3.6, і Vn18 – нетрансформована рослина) свідчить на користь адекватності контролю. Відсутність цієї активності у трансформантів з першої серії експериментів, коли вихідною була трансгенна лінія Vn9/93/15, говорить про відсутність активності цільового гена $\Delta 9$ -десатурази в складі гібридного білка. Використання для трансформації вектора з геном ліхенази в якості репортера є зручним і надійним інструментом для оцінки експресії злитого з ним цільового гена. На виконання чашечного теста потрібно 60 хв, одночасно можна тестувати декілька (в запропонованих нами умовах – 7) зразків. Первинний скринінг регенерантів дозволяє зменшити затрати часу і реагентів та навантаження на устаткування, наприклад, на газовий хроматограф, для підтвердження активності введеного гена.

Таким чином, нами показано, що у разі одночасного введення чотирьох генів у двох незалежних векторах вдалося отримати рослини, у яких гетерологічні гени були функціональними. Активність гена *epsps* в рослинах ріпаку підтверджена на рівні транскрипції в результаті ПЛР зворотніх транскриптів, в умовах *in vitro* при культивуванні на безгормональному

середовищі з *N*-фосфометілгліцином (2,5 мг/л) і після обробки рослин гербіцидом Ураган Форте у теплиці. Ген *desC* десатурази $\Delta 9$ ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* був злитий в одній рамці зчитування з репортерним геном термостабільної ліхенази (*licVM3*) *Clostridium thermocellum*. Наявність послідовності гена *licVM3* в складі гібридного продукта дозволило якісно (за допомогою чашечного теста) і кількісно (фотометрично) оцінити експресію злитого з ним гена десатурази. Прослідковано успадкування інтегрованих генів та їхня експресія в першому поколінні, отриманому в результаті самозапилення первинних трансформантів за умов закритого ґрунта.

Результати опубліковано в [2, 3, 28, 45, 458].

3.4.2. Склад жирних кислот у ліпідах листків. Склад жирних кислот у ліпідах листків вивчали у рослин ріпаку, що були отримані в другій серії експериментів з введення гена ціанобактерії, для яких було показано активність ліхенази. В результаті аналізу газо-хроматографічних даних, отриманих для трансгенних і контрольних, нетрансформованих рослин ріпаку, які культивувались в асептичних умовах, було виявлено, що експресія десатурази $\Delta 9$ (*DesC*) ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* не приводила до якісних змін в складі жирних кислот ліпідів листків трансформантів (рис.3.25). Однак спостерігались відмінності у їх кількісному складі.

Вміст насичених жирних кислот в листках ріпаку змінювався за рахунок пальмітинової кислоти, який зменшувався у ліній 18b і 18a/6 в порівнянні з контрольними рослинами на 14% і 16%, відповідно. В той же час у рослин ліній 18a і Vn18b/25 вміст C16:0 кислоти залишався на рівні контролю. Вміст стеаринової кислоти в листках трансгенних ліній не відрізнявся від контрольних (рис. 3.25).

Двуненасичені жирні кислоти у листках ріпаку з трансгеном *desC* представлені лінолевою кислотою. Її вміст достовірно зменшувався до 3,45M% (на 40%) у первинних трансформантів лінії 18b. У інших

проаналізованих трансгенних ліній не спостерігали змін за даним параметром у порівнянні з контролем (рис. 3.25).

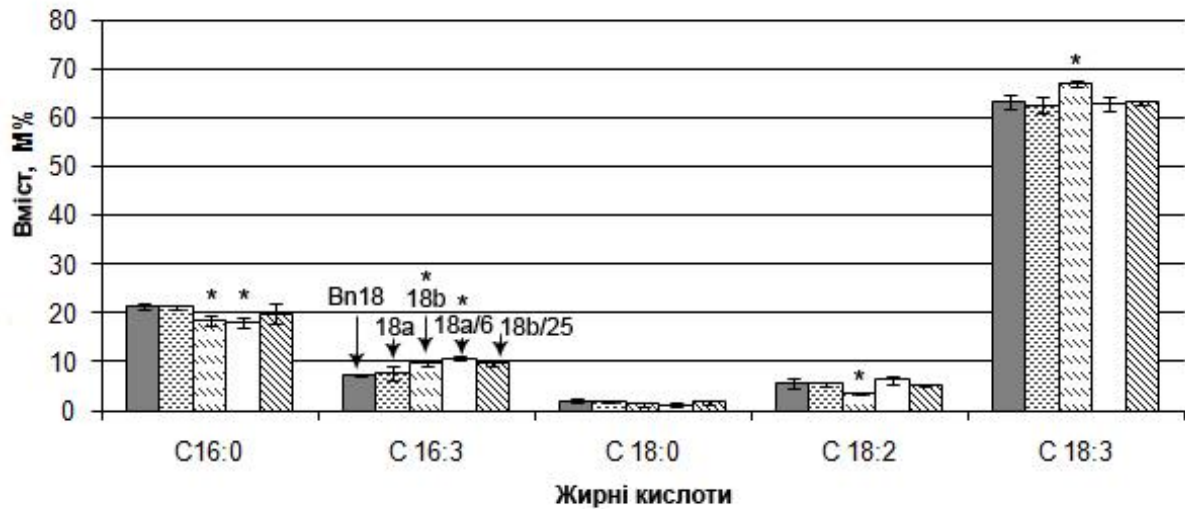


Рис. 3.25. Склад жирних кислот у ліпідах 4-тижневих рослин ріпаку, які зростали за умов *in vitro*: Vn18 – рослини вихідного сорту Обрій; 18a, 18b – первинні трансформанти; Vn18a/6, Vn18b/25 – рослини T₁ покоління; жирні кислоти – пальмітинова (C16:0), 7,10,13-гексадекатриєнова (C16:3), стеаринова (C18:0), ліолева (C18:2), ліолоєнова (C18:3). * – відмінності достовірні в порівнянні з контролем за $P \leq 0,05$.

Збільшувався вміст триєнових (16:3 і 18:3) жирних кислот в листках трансгенного ріпаку. Вміст 7,10,13-гексадекатриєнової (C16:3) кислоти зростав у трьох із чотирьох трансгенних ліній, максимально на 33% у рослин лінії 18a/6. Вміст ліолоєнової кислоти (C18:3) достовірно збільшувався у лінії 18b до 67,03 М%.

Зменшення вмісту насичених і збільшення вмісту триєнових жирних кислот в листках створюють передумови для зростання толерантності ліній 18b і 18a/6 до осмотичного і холододового стресів [495].

Якісний і кількісний вміст жирних кислот в листках ріпаку не корелює з цими показниками у його насінні. Але показано, що зручною модельною системою для вивчення накопичення запасних ліпідів, яка відповідає такому в насінні ріпаку, виявилась культура ембріодів, які отримують із мікроспор

[311]. Важливим є той факт, що для біохімічного аналізу береться всього один котиледон кожного ембріода; з відібраних ембріодів можна регенерувати рослини, потім висадити їх в теплицю, і таким чином проводити селекцію на ранніх етапах розвитку [311].

В результаті наших експериментів було виявлено, що експресія десатурази DesC ціанобактерії *S.vulcanus* приводила до підвищення загального вмісту жирних кислот в листках деяких трансгенних ліній (рис. 3.26).

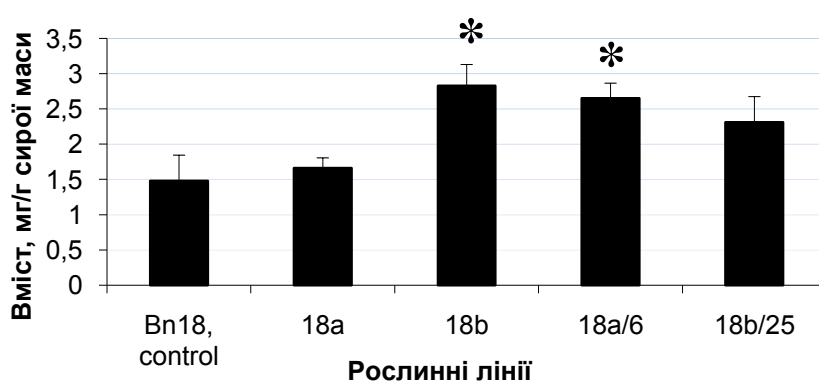


Рис. 3.26. Загальний вміст жирних кислот в листках 4-тижневих рослин ріпаку *in vitro*: Vn18 – рослини вихідного сорта Обрій; 18a, 18b – первинні трансформанти; Vn18a/6, Vn18b/25 – рослини T₁ покоління. * – відмінності достовірні в порівнянні з контролем за P≤0,05.

Так, у листках первинних трансформантів він достовірно збільшувався у порівнянні з нетрансформованим контролем, максимально на 48% у лінії 18b. У рослин першого покоління вміст жирних кислот в листках зростав на 45% (рослини лінії 18a/6), а у другої проаналізованої лінії (растения 18b/25) не відрізнявся від контрольного. Підвищення вмісту жирних кислот спостерігали також у рослин картоплі після введення гена десатурази $\Delta 12$ *Synechocystis* sp. PCC 6803 [280] і тютюну з трансгеном *desC* ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* [321].

Індекс ненасиченості зростав у ліній 18b і 18a/6 на 0,07% і 0,05%, відповідно, в той час як у двох інших трансгенних ліній він не відрізнявся від

контрольних рослин (рис. 3.27). Підвищення індекса ненасиченості було достовірним, але невисоким. Зростання індекса ненасиченості корелювало зі змінами у вмісті жирних кислот у аналізованих рослин.

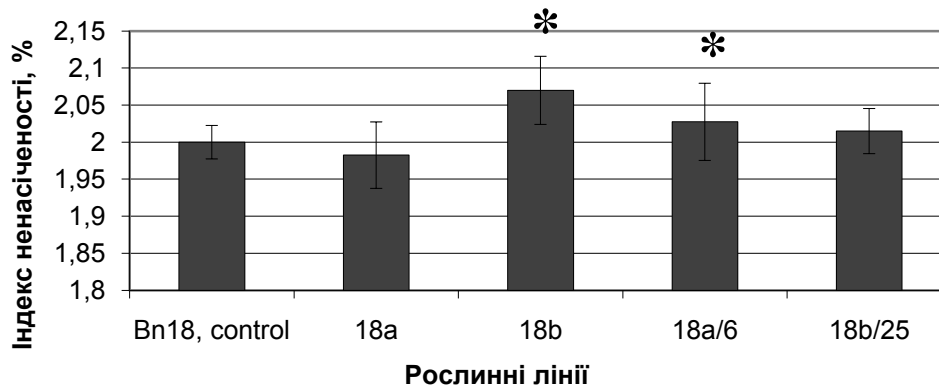


Рис. 3.27. Індекс ненасиченості мембранних ліпідів в листках 4-тижневих рослин ріпаку *in vitro*: Bn18 – рослини вихідного сорта Обрій; 18a, 18b – первинні трансформанти; Bn18a/6, Bn18b/25 – рослини T₁ покоління. * – відмінності достовірні в порівнянні з контролем за P ≤ 0,05.

Таким чином, нами показано, що результатом введення трансгена *desC* *Synechococcus vulcanus* в рослини ріпаку було зменшення вмісту насичених (C16:0, на 16%) і збільшення вмісту триєнових (C16:3, на 33%) жирних кислот, підвищення загального вмісту жирних кислот і індекса ненасиченості в листках деяких трансгенних ліній (18b і 18a/6).

Зростання індекса ненасиченості корелювало зі змінами у загальному вмісті жирних кислот у аналізованих рослин. Лінії зі змінами в складі жирних кислот ліпідів листків можуть бути більш толерантними до холодого і фітопатогенного пошкодження у порівнянні з контрольними.

Результати опубліковано в [25, 26].

3.5. Рослини ріпаку з геном альфа-2b інтерферону людини

3.5.1. Отримання первинних трансформантів та їх молекулярно-біологічний аналіз. В останні десятиліття інтенсифікувались дослідження з отримання в рослинах біологічно активних речовин фармацевтичного спрямування (антитіл, цитокінів, гормонів, вакцин для людини і сільськогосподарських тварин) [114, 218, 399]. Інтерферони альфа-2 людини (ІНФ) відносяться до класу цитокінів, до групи альфа-інтерферонів, які секретуються практично всіма типами вірус-інфікованих клітин. Лікарські форми ІНФ є препаратами широкого спектра дії. Вони мають імуномодулюючу, протівірусну і протипухлинну активність. На сьогодні лікарські засоби на основі ІНФ є найбільш поширеними і необхідними протівірусними препаратами для лікування різних вірусних захворювань, в тому числі вірусних гепатитів В і С, які потребують терапії протягом всього життя пацієнта.

Наразі отримано низку рослин, які завдяки трансгенезу накопичують рекомбінантний інтерферон людини в значній кількості. Це рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) [62], картоплі (*Solanum tuberosum*) [317], рису [291, 507], ряски (*Lemna minor*) [119], моркви (*Daucus carota*) [274], томату (*Lycopersicon esculentum*) [139], алое (*Aloe vera*) [270], цикорію (*Cichorium intybus*) і салату (*Lactuca sativa*) [294].

Метою нашого дослідження було створення трансгенних рослин ріпаку, які продукують ІНФ альфа-2b людини.

Трансформацію прекультивованих листових пластинок, взятих з 3–4-тижневих асептичних рослин, проводили за розробленою нами раніше методикою [16], використовуючи в якості експлантів сегменти листків. Перші регенеранти з'являлись за 5–6 тижнів від початку експеримента в умовах селективного тиску РРТ (5 мг/л) (рис. 3.28, А). Ще за 7–14 діб стійкі пагони формувались повністю (рис. 3.28, Б). Після пересадки на

безгормональне середовище MS укорінення регенерантів відбувалось без додаткової індукції протягом наступних 2-3 тижнів.

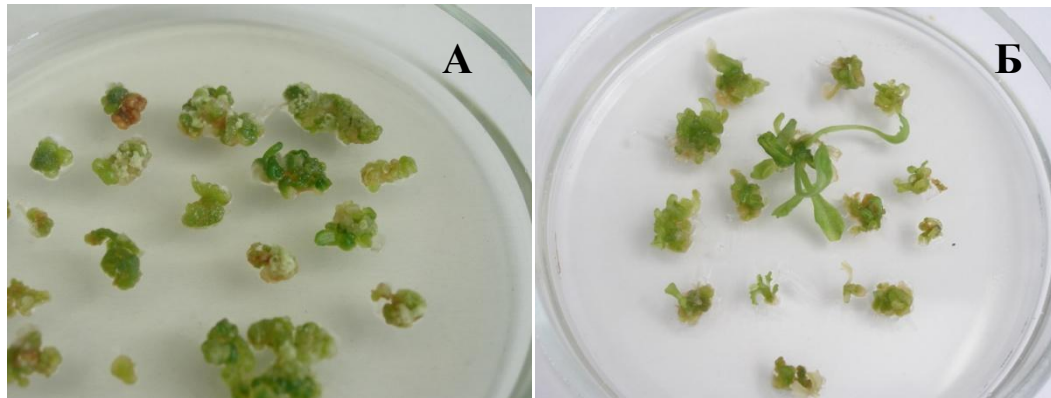


Рис.3.28. Регенерація з листових експлантів ріпаку в умовах селективного тиску фосфінотрицина (5 мг/л): А – початок регенерації, Б – сформовані регенеранти.

В результаті експериментів отримано 52 незалежні фосфінотрицинстійкі лінії ріпаку на основі двох промислових ярих сортів: Магнат селекції Національного аграрного університету УААН (18 ліній) і Магнат селекції «Науково-практичного центра НАН Білорусі по землеробству» (34 лінії). Розмножені *in vitro* рослинні лінії було протестовано на наявність цільового гена і відсутність агробактеріального забруднення. ПЛР-аналіз виявив присутність введеної ДНК в ядерному геномі отриманих ліній (рис.3.29). Бактеріальна контамінація була відсутня.

На початку 80-х років минулого сторіччя виник первинний інтерес до вивчення експресії генів інтерферону в рослинах [320, 366]. Вважалось, що трансгенні рослини мають бути стійкішими до вірусних захворювань, якщо у них буде додатковий захист за рахунок експресії цього цитокіна. Однак неоднозначність результатів привела до згортання досліджень. Друга хвиля зацікавленості у використанні трансгенезу для отримання трансгенних рослин з геном інтерферону сформувалася під час розробки такого напрямлення як "істівні вакцини" [218].

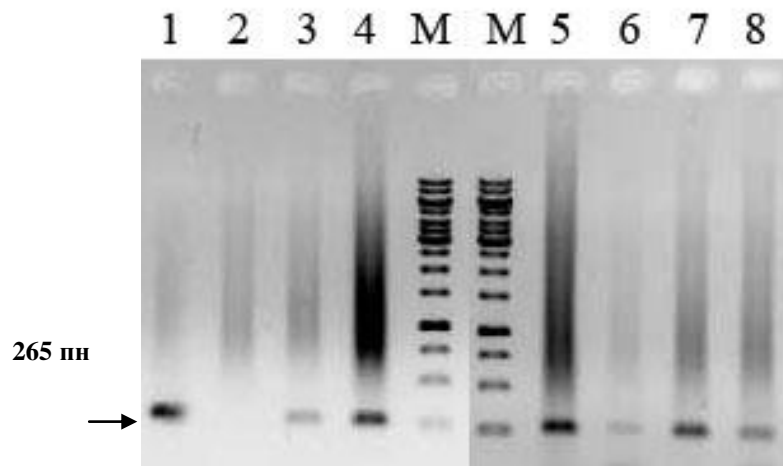


Рис.3.29. Електрофореграма продуктів ампліфікації тотальної рослинної ДНК з праймерами, специфічними до гена *HuInf- α 2b*:

1 – ДНК трансгенного тютюну, трансформованого генетичною конструкцією рСВ073 (має в своєму складі ген *HuInf- α 2b*), позитивний контроль; 2 – ДНК нетрансформованого ріпаку, негативний контроль; 3 – 8 – ДНК трансформованого ріпаку, лінії 1, 3, 9, 10, 15, 22; М – маркер молекулярних мас (1 kb Fermentas).

Однак в обох випадках не було досліджено вплив експресії гетерологічного інтерферону на функціонування рослинного організму в цілому, а не тільки з точки зору стійкості до вірусних інфекцій або можливості сверхпродукції саме інтерферону. Цікаво порівняти описану ситуацію з дослідженнями у галузі антиоксидантних ферментів, зокрема, СОД. Незабаром після відкриття [297] і вивчення на клітинах тварин і людини були спроби інтегрувати гени СОД у рослини з метою створення рослин, суперстійких до стресів. Деякі з них були невдалими [432]. Рослини, у яких детектували високі активності гетерологічної СОД не проявляли себе більш стійкими до стресів. Однак дослідження продовжувались, позитивних результатів ставало все більше. На сьогодні наука має значний доробок в цій галузі, хоча нез'ясованих аспектів ще достатньо [336].

Ми отримали рослини ріпаку з трансгеном *HuInf- α 2b*, підтвердили інтеграцію гетерологічного гена у ядерний геном з метою подальшого вивчення і виявлення можливих біохімічних особливостей створених рослин.

Результати опубліковано в [165, 166, 295, 373].

3.5.2. Аналіз біологічної активності екстрактів рослин ріпаку з геном *HuInf- α 2b*. Рослинні екстракти для аналізу активності інтерферону готували, використовуючи листя асептичних рослин (розд. 2.22). Виявлено різницю за інтерфероподібною активністю рослинних екстрактів, отриманих з різних трансгенних ліній (рис. 3.30, табл.3.6).

Інтерфероподібна активність у екстрактів з листків первинних трансформантів ріпаку за умови вирощування *in vitro* варіювала від повної відсутності (лінія Vn9/125/23) до 4500 МО/г сирової маси. Максимальною активністю гетерологічного білка характеризувались рослини двох ліній – Vn9/125/20 і Vn9/125/10. У семи лініях активність ІНФ була нижчою, ніж 500 МО/г сирової маси, у більшості ліній (14) активність варіювала від 900 до 2250 МО/г сирової маси.

Варіабельність за активністю інтерферону серед трансгенних ліній рослин спостерігали у більшості отриманих трансформантів з генами інтерферонів людини [62, 119, 139, 270, 274, 291, 294, 317, 507].

Лінії з високою активністю ІНФ були висаджені в ґрунт в умовах теплиці. Вони легко адаптувались до умов закритого ґрунта, зацвітали без аномалій і формували фертильне насіння. Іноді спостерігається негативний вплив інтеграції гетерологічного гена на генеративну сферу рослин. Так, в експериментах з рослинами тютюну з трансгеном *HuInf- α 2b*, отриманими в результаті *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації, було виявлено явище гетеростілії під час цвітіння у закритому ґрунті. Крім того, у 5-ти з 17-ти рослин була знижена насіннева продуктивність через відсутність пилкових зерен у пиляках [11].

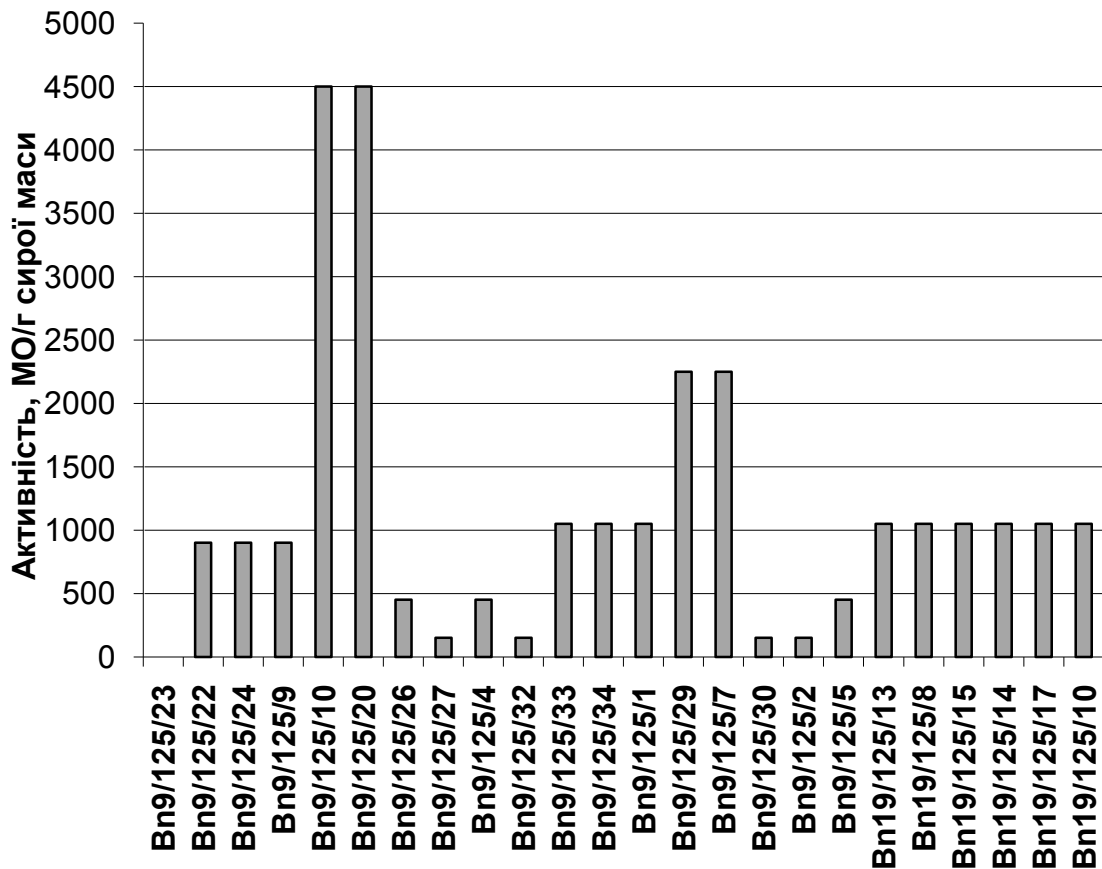


Рис. 3.30. Інтерфероподібна активність у первинних трансформантах ріпаку за результатами тесту на здатність листкових екстрактів пригнічувати цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматиту в фібробластах людини.

За чотири тижні після висадки в ґрунт рослин ріпаку з геном *HuInf- α 2b* з другого від апексу листка брали частину для отримання білкового екстракту і оцінки біологічної активності ІНФ в ньому. Виявилось, що у ліній з найвищою активністю ІНФ (Vn9/125/20 і Vn9/125/10) вона залишалась на тому ж рівні, що і в умовах асептичної культури.

Із метою вивчення змін в адаптаційній здатності рослин ріпаку з введеним геном ІНФ людини було досліджено антиоксидантну активність тканин листків. В результаті показано, що деякі лінії трансгенного ріпаку мають підвищену антиоксидантну активність тканин листа (рис.3.31).

Таблиця 3.6

Інтерфероподібна активність у листках трансгенних рослин ріпаку

№	Назва	Титр інтерферона	Активність, МО/мл	Активність, МО/ г сирі
1	Bn9/125/23	1:160	0	0
2	Bn9/125/22	1:640	300	900
3	Bn9/125/24	1:640	300	900
4	Bn9/125/9	1:640	300	900
5	Bn9/125/10	1:2560	1500	4500
6	Bn9/125/20	1:2560	1500	4500
7	Bn9/125/26	1:160	150	450
8	Bn9/125/27	1:80	50	150
9	Bn9/125/4	1:160	150	450
10	Bn9/125/32	1:160	50	150
11	Bn9/125/33	1:640	350	1050
12	Bn9/125/34	1:640	350	1050
13	Bn9/125/1	1:640	350	1050
14	Bn9/125/29	1:1280	750	2250
15	Bn9/125/7	1:1280	750	2250
16	Bn9/125/30	1:160	50	150
17	Bn9/125/2	1:160	50	150
18	Bn9/125/5	1:320	150	450
19	Bn19/125/13	1:640	350	1050
20	Bn19/125/8	1:640	350	1050
21	Bn19/125/15	1:640	350	1050
22	Bn19/125/14	1:640	350	1050
23	Bn19/125/17	1:640	350	1050
24	Bn19/125/10	1:640	350	1050

Антиоксиданти захищають клітинні структури рослин від пошкодження їх вільними радикалами [14]. Основні природні антиоксиданти – вітаміни Е і С (токофероли і аскорбінова кислота), жирні кислоти, поліфеноли (антоціани, флавоноїди, ароматичні оксікислоти). Підвищення антиоксидантної активності в тканинах рослин позитивно впливає на їхню спроможність протидіяти стресовим факторам різного походження [232, 486]. За даними Chen I.-C. et al. [88], листки ріпаку характеризуються антиоксидантною активністю, яка перевищує таку у багатьох традиційно культивованих рослин. В перерахунку на аскорбінову кислоту вона становила 710 мкг/г сирі маси. В листках салату і шпинату цей показник був

нижчим (446 і 434 мкг/г, відповідно), в листках червоноголовної капусти – майже вдвічі вищим (1217 мкг/г).

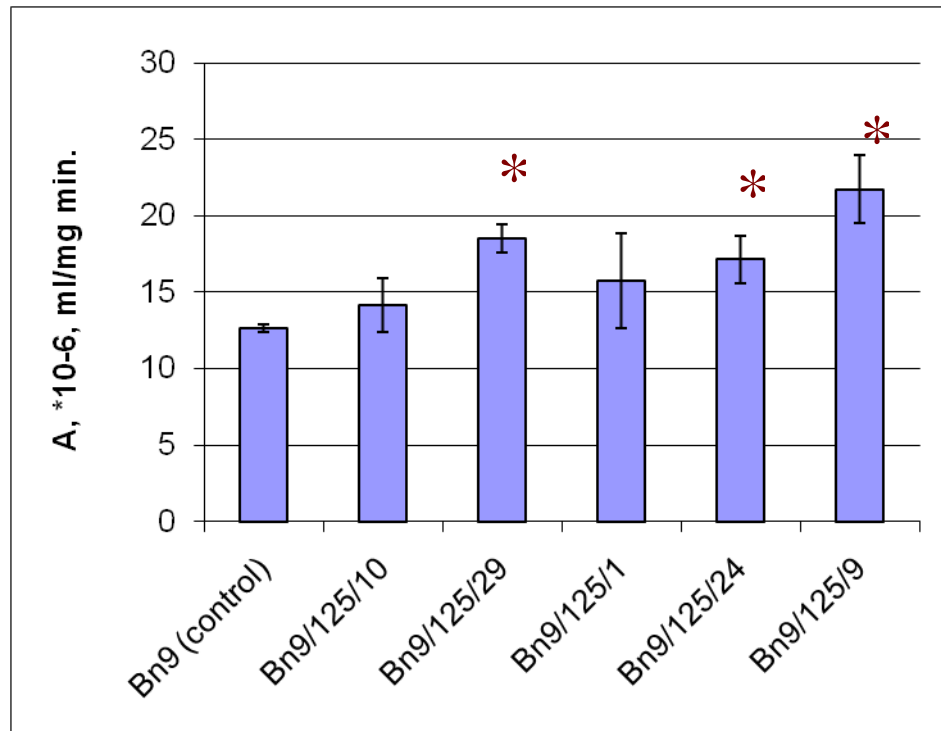


Рис.3.31. Антиоксидантна активність в тканинах листків вихідних (Bn9 (control), сорт Магнат) і біотехнологічних (Bn9/125/10, Bn9/125/29, Bn9/125/2, Bn9/125/24, Bn9/125/9) ліній ріпаку з геном α -2b інтерферону людини. * відмінності достовірні за $P \leq 0,05$.

Використання отриманих рослин з підвищеною антиоксидантною активністю в якості домішки до кормів тварин мало б профілактично впливати на їх організм, підвищуючи стійкість до інфекцій різного походження.

Не виявлено кореляції між інтерфероподібною і антиоксидантною активністю в тканинах листків асептично вирощуваних рослин ріпаку (табл.3.7).

Таблиця 3.7

**Антиоксидантна і інтерференоподібна активність в тканинах листків
біотехнологічних ліній ріпаку з геном *HuInf-α2b***

№	Лінія	Антиоксидантна активність, x 10 ⁻⁶ , мл/мг хв	Інтерференоподібна активність, МО/мл
1	Vn9, контроль	12,67±0,27	0
2	Vn9/125/10	14,13±1,76	1500
3	Vn9/125/29	18,50±0,82	750
4	Vn9/125/1	15,77±3,11	350
5	Vn9/125/24	17,17±1,55	300
6	Vn9/125/9	21,73±2,23	300

Таким чином, нами отримано трансгенні рослини ріпаку, які характеризувались наявністю в ядерному геномі гена α -2b інтерферону людини. Показано, що біотехнологічні лінії мають різну біологічну активність введеного гена, визначену як здатність листових екстрактів пригнічувати цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматита у тестикулах поросят. Максимальне значення її дорівнювало 4500 МО/г сирої маси. Створені лінії ріпаку мали також таку біохімічну особливість як підвищена антиоксидантна активність тканин листків за умов вирощування *in vitro*. Це дає підстави сподіватись на підвищення толерантності отриманих ліній до стресів різного походження.

Результати опубліковано в [165, 166, 295, 373].

3.6. Біотехнологічні рослини ріпаку з геном *sup11A1*

3.6.1. Регенерація рослин та їх молекулярно-біологічний аналіз. В останні роки зростає зацікавленість до вивчення впливу введення різних

генів цитохрома P450 тваринного походження на фізіологію рослин. Вона пов'язана з перспективою отримання рослин з новими цінними характеристиками: стійкістю до гербіцидів та здатністю до відновлення ґрунтів і повітря за рахунок експресії генів, що задіяні у ссавців у метаболізмі ксенобіотиків (*сyp1A1*, *сyp2B6*, *сyp2C19*, *сyp2E1*) [135, 228, 484], а також пришвидшенню темпів росту завдяки синтезу не притаманних рослинним тканинам біологічно-активних молекул (*сyp11A1*) [413]. Рослини риса [228] здатні рости на ґрунтах, які були забруднені атразином і метолахлором, і акумулювати їх, очищуючи ґрунт. Картопля з активним геном *сyp1A1*, виділеним із печінки щура, демонструвала стійкість до гербіцидів хлортолуруну і метабензтіазуруну [484]. Тополі, які експресували ген *сyp2E1* цитохрома P450 із печінки кроля, здатні поглинати такі отруйні речовини, як трихлоретилен, вінілхлорид, чотирихлористий вуглець, хлороформ і бензен [135], позитивно впливаючи на стан ґрунтів і повітря.

В експериментах з тютюном було показано, що трансгенні рослини, до ядра яких було інтегровано ген *сyp11A1*, що кодує цитохром P450_{SCC} тваринного походження, випереджають контрольні в середньому на два тижні за темпами росту і розвитку [39]. Автори пояснюють ці зміни фізіології впливом нових біологічно-активних стероїдних сполук, які не характерні для рослин дикого типу. Скорочення періода вегетації та можливість більш раннього збору врожаю є привабливими для сільгоспвиробників.

Рослинні монооксигенази також представляють інтерес як потенційні джерела стійкості до гербіцидів. Так, експресія гена *CYP81A6* рису, інтегрованого в рослини арабідопсиса і тютюну, приводила до їх стійкості проти гербіцидів бентазона і сульфонілсечовини [262]. Крім того, було показано, що цей ген можна використовувати в якості селективного. Його ефективність була порівняна із ефективністю гена *bar* при відборі трансгенних рослин арабідопсиса.

Для отримання трансгенних рослин з геном *sur11A1* використовували розроблену нами методику (розд.3.1), де в якості експлантів використовували сегменти листків асептичних рослин (рис. 3.32, А).

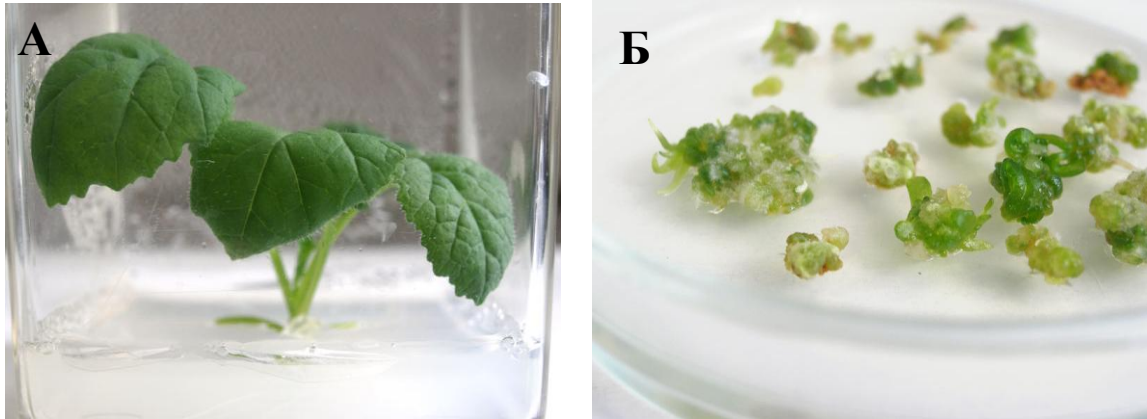


Рис.3.32. Фенотип вихідної рослини ріпаку сорту Марія (Bn12) у асептичних умовах (А) і формування меристематичних центрів та регенерація пагонів з експлантів, задіяних у трансформації з вектором pCB093 (Б).

Регенерацію проводили на середовищах з PPT (5 мг/л) (рис. 3.32, Б). В результаті експериментів з використанням вектора pCB093 (розд.2.9) було отримано загалом 38 ліній рослин ріпаку, які формувались в умовах селективного тиску PPT, з них 27 ліній на основі сорта Марія, 11 ліній – на основі сорта Магнат (вихідне насіння люб’язно надане А.М. Шишловою, відділ молекулярної генетики і біотехнології Інституту генетики і цитології НАН Білорусі, Мінськ, 2008 р.). Останні лінії було передано для подальшого аналізу в Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, Мінськ. Лінія 9/93/15 була використана для повторної трансформації в експериментах з трансгеном *desC* (розд.3.4.1).

Первинні трансформанти аналізували за допомогою ПЛР на наявність введених генів, відсутність забруднення агробактерією та експресію цільового гена (*sur11A1*) на рівні транскрипції (рис. 3.33).

Виявлено, що серед 9 тестованих рослин, отриманих на основі сорту Марія, сім мають гетерологічні гени *bar* і *cyp11A1*, агробактеріальна контамінація в тканинах відсутня. Серед 14 регенерантів, отриманих на основі сорта Магнат, гетерологічні гени виявлено у рослин одинадцяти ліній (табл. 3.8).

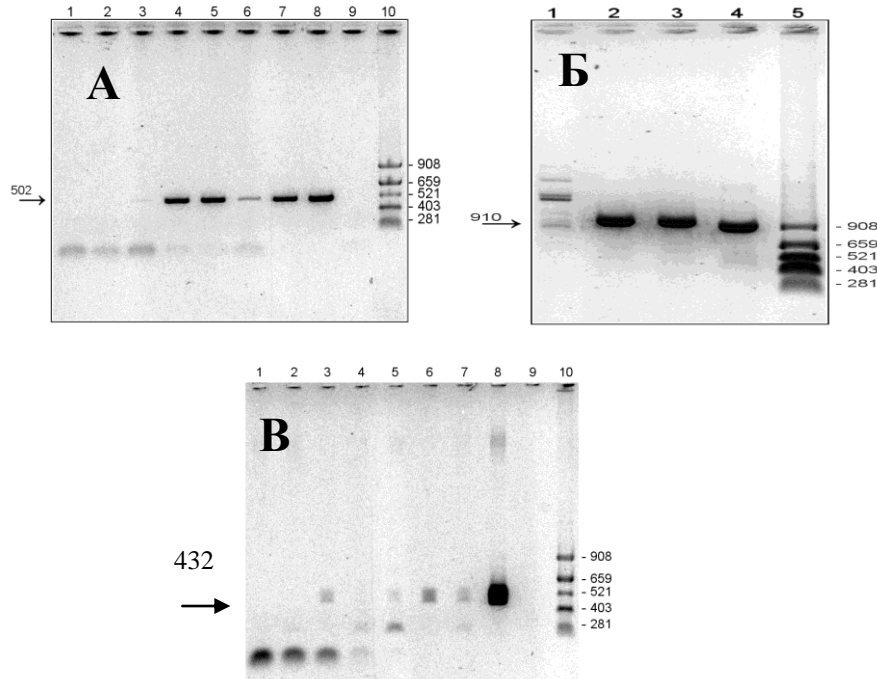


Рис. 3.33. Електрофореграми продуктів ампліфікації сумарної ДНК рослинних зразків з праймерами, специфічними до генів:

А – *cyp11A1*: 1–7 – лінії первинних трансформантів Vn12/93/13, Vn12/93/17, Vn12/93/4, Vn12/93/1; Vn12/93/12; Vn12/93/14, Vn9/93/3; 8 – ДНК плазміді рGBP450f, позитивний контроль; 9 – негативний контроль, без матриці; 10 – 200 нг ДНК плазміді рBR322, гідролізованої ендонуклеазою AluI, в ролі маркера молекулярних мас;

Б – *bar*: 1 – ДНК плазміді рGBP450f, позитивний контроль; 2–4 – лінії Vn12/93/2; Vn12/93/11, Vn9/93/3; 5 – 280 нг маркера, ДНК плазміді рBR322, гідролізованої ендонуклеазою AluI, в ролі маркера молекулярних мас;

В – *virD1*: 1–7 – лінії Vn12/93/1; Vn12/93/12; Vn12/93/4, Vn12/93/11, Vn12/93/13, Vn12/93/17, Vn12/93/14; 8 – геномна ДНК агробактерії GV3101, позитивний контроль; 9 – негативний контроль, без матриці; 10 – маркер молекулярних мас.

Таблиця 3.8

Результати молекулярно-біологічного аналізу первинних трансформантів ріпаку, отриманих в результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації з використанням вектору pCB093

Сорт	Лінія	Характеристика ліній				
		РРТ- стійкі	ПЛР			
			<i>virD1</i>	<i>bar</i>	<i>cup11A1</i>	
Марія	Bn12/93/1	+	-	+	+	
	Bn12/93/2	+	-	+	+	
	Bn12/93/7	-	-	-	-	
	Bn12/93/8	-	-	-	-	
	Bn12/93/10	+	-	+	+	
	Bn12/93/11	+	-	+	+	
	Bn12/93/12	+	-	+	+	
	Bn12/93/14	+	-	+	+	
	Bn12/93/15	+	-	+	+	
	Магнат	Bn9/93/2	+	-	+	+
		Bn9/93/3	+	-	+	+
		Bn9/93/4	+	-	+	+
		Bn9/93/5	-	-	-	-
		Bn9/93/6	+	-	+	+
		Bn9/93/7	+	-	+	+
Bn9/93/9		-	-	-	-	
Bn9/93/10		+	-	+	+	
Bn9/93/12		-	-	-	-	
Bn9/93/13		+	-	+	+	
Bn9/93/14		+	-	+	+	
Bn9/93/15		+	-	+	+	
Bn9/93/19		+	-	+	+	
Bn9/93/21		+	-	+	+	

Підтвердженням проходження процесу транскрипції гетерологічного гена в трансгенних лініях було виявлення фрагмента розміром 502 пн після ПЛР-ампліфікації зворотніх транскриптів, синтезованих на матриці РНК, виділеної з аналізованих зразків (рис. 3.34).

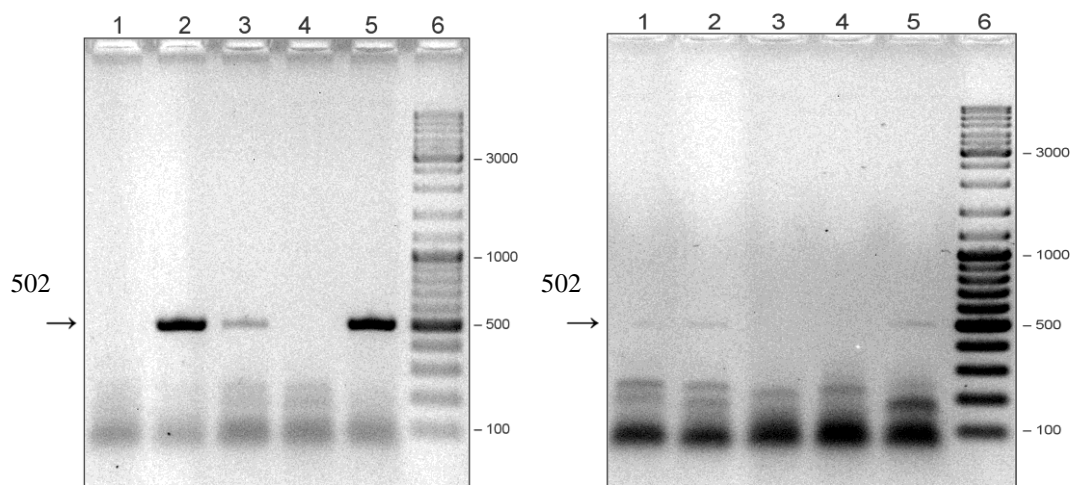


Рис. 3.34. Електрофореграма продуктів ампліфікації зворотніх транскриптів: А – з додаванням ревертази; Б – без додавання ревертази (1- Vn 12 (негативний контроль), 2–4 – лінії Vn12/93/2, Vn9/93/3, Vn12/93/7, 5 – позитивний контроль, 6 – маркер молекулярних мас).

3.6.2. Генетичний аналіз рослинних ліній. Проаналізовані за допомогою ПЛР (рис. 3.33, рис.3.34, табл. 3.8) первинні трансформанти ріпаку на основі сорту Марія, у яких було показано наявність генів *bar* і *sup11A1* і відсутність агробактеріального забруднення, були розмножені *in vitro* і висаджені в теплицю для отримання насіння і тестування на стійкість до обробки гербіцидом BASTA.

За морфологією вегетативні і генеративні органи трансгенних рослин не відрізнялись від контрольних. Під час цвітіння (рис.3.36) після самозапилення у ліній Vn12/93/1, Vn12/93/12, Vn12/93/14, Vn12/93/2, Vn12/93/11, Vn12/93/10 зав'язалось фертильне насіння (табл.3.9), яке за зовнішнім виглядом не відрізнялось від насіння вихідної лінії (рис. 3.36). Схожість насіння трансгенних рослин достовірно не відрізнялась від такої у нетрансформованих рослин.

Проростки тестували на стійкість до фосфінотрицину, висаджуючи їх на середовища з додаванням 10 мг/л PPT (розд.2.5, рис. 3.37). Стійкі до селективного агента рослини аналізували на наявність введених чужорідних генів і відсутність бактеріальної контамінації. Виявилось, що як у первинних

трансформантів, так і у стійких до РРТ їх нащадків детектується наявність обох введених генів і відсутність гена *virD1*, що підтверджує їх агробактеріальну чистоту.



Рис. 3.35. Цвітіння трансгенної лінії Bn12/93/1 в умовах теплиці.



Рис. 3.36. Насіння контрольної (Bn12) і трансгенної (Bn12/93/14) ліній ріпаку.

При аналізі успадкування гена *bar* в другому поколінні трансформантів виділено гомозиготні за даним геном лінії T₂1a, T₂2c, T₂12a, T₂12c, T₂14c. Для них було характерним розщеплення 3:1 за ознакою стійкості до РРТ в поколінні T₁ (табл.3.9) і відсутність його у другому поколінні при самозапиленні.

За три тижні після висадки в ґрунт проводили обробку розчином BASTA (розд.2.6). Трансформовані рослини не реагували на обробку

гербицидом, в той час як листя контрольних жовтіло і висихало, становлячись схожим на газетний папір (рис. 3.38).

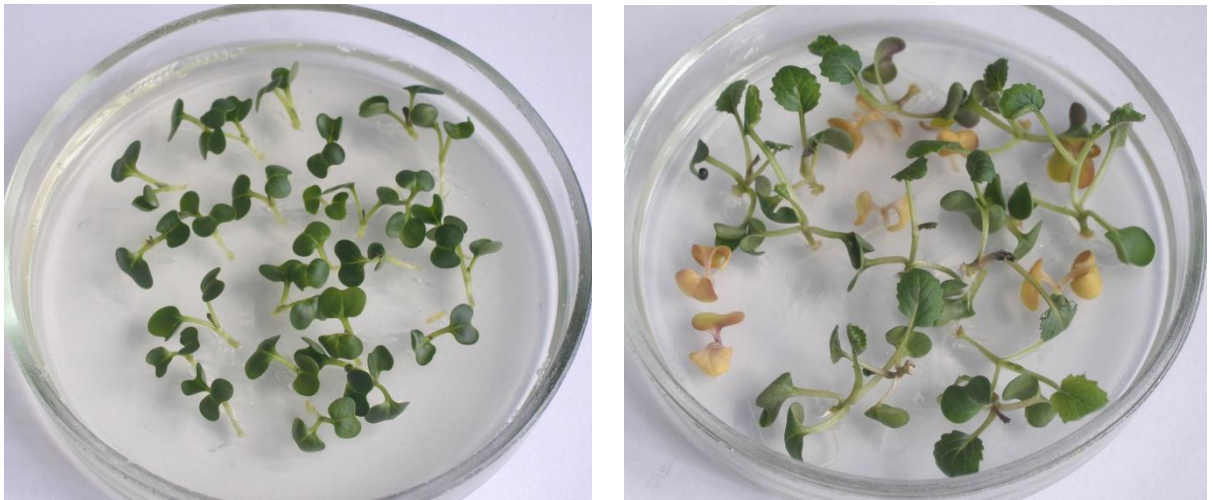


Рис. 3.37. Тест на стійкість проростків до фосфінотрицину:

А – 5-добові проростки T₁Bn12/93/14 на середовищі без РРТ;

В – 14- добові проростки T₁ Bn12/93/14 на середовищі з РРТ (10 мг/л).

Таблиця 3.9

Характеристика T₁ і T₂ поколінь трансгенних рослин ріпаку (сорт Марія, вектор рСВ093)

Лінія	Схожість насіння <i>in vitro</i> , %	Кількість рослин, шт.		Розщеплен- ня	χ^2 (χ^2_{st} = 3,84)
		РРТ ⁺	РРТ ⁻		
1	2	3	4	5	6
T ₁ Bn12/93/1	99	73	26	3:1	0,08
T ₁ Bn12/93/2	96	73	23	3:1	0,05
T ₁ Bn12/93/11	94	94	-	відсутнє	-
T ₁ Bn12/93/12	98	72	26	3:1	0,11
T ₁ Bn12/93/14	90	68	22	3:1	0,01
T₂ Bn12/93/1a	100	100	-	відсутнє	-

Продовження таблиці 3.9

1	2	3	4	5	6
T ₂ Bn12/93/2a	95	70	25	3:1	0,08
T ₂ Bn12/93/2b	96	68	28	3:1	0,91
T₂ Bn12/93/2c	98	98	-	відсутнє	-
T₂ Bn12/93/12a	100	100	-	відсутнє	-
T ₂ Bn12/93/12b	98	70	28	3:1	0,61
T₂ Bn12/93/12c	99	99	-	відсутнє	-
T ₂ Bn12/93/14a	97	68	29	3:1	1,11
T ₂ Bn12/93/14b	97	71	26	3:1	0,08
T₂ Bn12/93/14c	98	98	-	відсутнє	-
Bn12 (контроль)	96	-	96	відсутнє	-

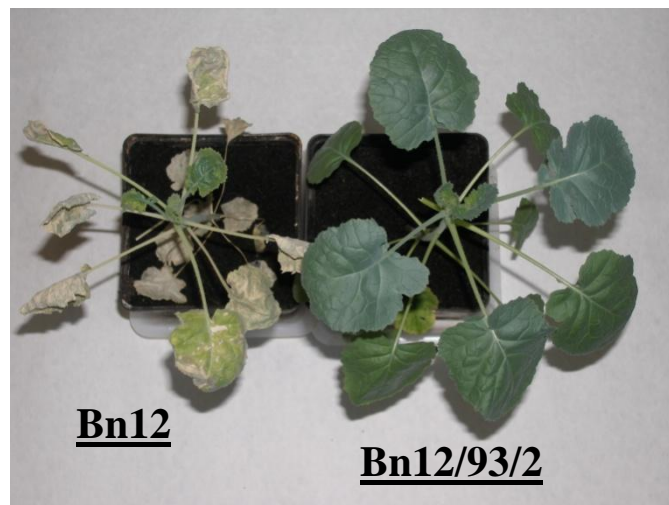


Рис. 3.38. Тест на стійкість до обприскування гербіцидом БАСТА рослин вихідної (Bn12) і трансгенної (Bn12/93/12) ліній в умовах теплиці.

Таким чином, отримано трансгенні рослини ріпаку з геном тваринного походження *sup11A1*, які експресують також ген *bar*. За допомогою ПЛР показано наявність гетерологічних генів і відсутність бактеріального забруднення. Активність гена *bar* підтверджена в асептичних умовах при

пророщуванні насіння на середовищах з РРТ і в умовах теплиці при обприскуванні рослин гербіцидом БАСТА. Активність гена цитохрома P450_{SCC} на рівні транскрипції показана за допомогою ПЛР-аналіза зворотніх транскриптів. Показано успадкування введених генів у першому і другому поколінні трансформантів, отриманих після самозапилення первинних ліній в умовах теплиці. Відібрано гомозиготні лінії для подальшого дослідження.

Результати опубліковано в [27, 47].

3.6.3. Аналіз сумарного розчинного білка в листі трансгенних рослин. Для визначення сумарного розчинного білка в листі рослин використовували метод Бредфорда (розд.2.14). Виявилось, що вміст СРБ в листках асептично вирощуваних рослин первинних трансформантів (рис. 3.40) збільшується, а у деяких ліній (Вn12/93/11) цей показник значно зростає, перевищуючи контроль більш, ніж на 30 %.

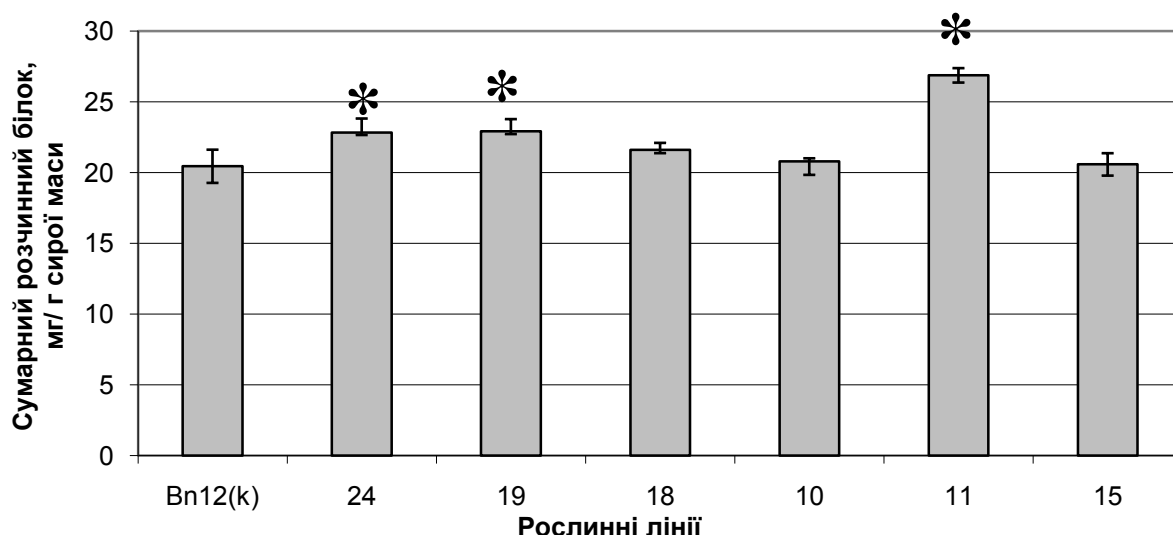


Рис. 3.39. Аналіз сумарного розчинного білка в листках контрольної (Vn12, сорт Марія) лінії і у первинних трансформантів ріпаку, вирощених в умовах асептичної культури.

Відмінності за СРБ між трансгенними лініями можуть залежати від рівня експресії трансгена, на який впливає ряд чинників, наприклад, кількість копій введеного гена, місце його інтеграції, рівень метилування та ін. Збільшення вмісту СРБ в листках і насінні трансгенного тютюну з інтегрованим геном *sup11A1* спостерігали в роботі [39].

Ріпак можна з успіхом вирощувати для виробництва кормів (зелена маса, силос, сінаж, трав'яне борошно) в основних, проміжних і поукосних посівах, в чистому вигляді та в сумішах з іншими культурами [6]. На посівах ріпаку випасають худобу, тому що ця культура має здатність інтенсивно відростати після поїдання тваринами або скошування.

За біохімічним складом ріпак перевершує більшість кормових культур. У 1 кг зеленої зазвичай міститься до 30 г протеїна, який легко засвоюється. У великих кількостях є аскорбінова кислота (505-1070 мг/кг у озимого і 515-786 мг/кг у ярого) і каротин (19,4-42,9 мг/кг у озимого і 20,6-37,4 мг/кг у ярого) [1; 6]. Збільшення вмісту білка підвищує кормову цінність даної культури і може вважатися позитивною зміною. Крім того, підвищений вміст білка має бути вигідним для збагачення ґрунта азотом за вирощування ріпаку в якості сидератної культури.

Підвищений вміст сумарного розчинного білка порівняно з рослинами дикого типу спостерігали також у листках картоплі з трансгеном *gdhA* (ген глютаматдегідрогенази з гриба *Aspergillus nidulans*) як при достатньому забезпеченні азотом, так і при низькому вмісті азоту в ґрунті [142].

3.6.4. Оцінка антиоксидантної активності. Визначення константи інгібування (K_i) реакції окиснення DPIP (розд. 2.13) екстрактами листків другого покоління трансформантів, які вирощувались в умовах теплиці, показало, що антиоксидантна активність у них є вищою, ніж у вихідних рослин (рис. 3.40), на 38%–130%.

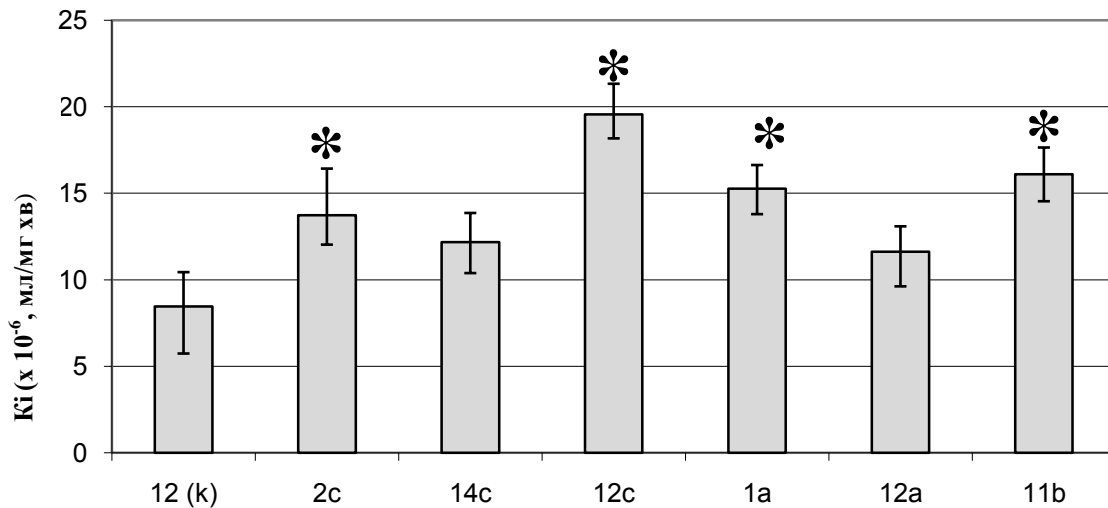


Рис. 3.40. Антиоксидантна активність в тканинах листків вихідних (12(к), сорт Марія) і біотехнологічних (Т₂2с, Т₂14с, Т₂12с, Т₂1а, Т₂12а, Т₂11) ліній ріпаку. *- відмінності достовірні за P≤0,05.

Листки ріпаку трансгенної лінії другого покоління Т₂12с мали антиоксидантну активність, яка в 2,3 раза перевищувала таку у вихідного сорту Марія. Зміни антиоксидантної активності, можуть бути пов'язані з підвищеним синтезом низькомолекулярних антиоксидантів, таких, як аскорбінова кислота і каротин, або з посиленням активності ферментів антиоксидантної системи.

Трансгенні рослини ріпаку з підвищеною до чотирьох разів антиоксидантною активністю за рахунок експресії регуляторного гена арабідопсісу *AtPAP1* (*Production of Anthocyanin Pigment 1*) були створені Li X. et al. [257]. Характерним для них було п'ятикратне перевищення вмісту кверцетину і синапової кислоти в листі, а рівень цианідіна і пеларгоніна збільшувався у 50 разів. Листки отриманих рослин мали різну ступінь прояву пурпурово-зеленого забарвлення.

Отримані в результаті проведених експериментів лінії Т₂2с, Т₂12с, Т₂1а є перспективними для вивчення їхньої стійкості до підвищених температур і посухи. Це актуально для ріпаку в кліматичних умовах України, тому що підвищення температури в період дозрівання насіння веде до зниження

олійності [6]. Крім того, ці лінії можуть бути більш стійкими до грибних патогенів [134].

Результати опубліковано в [27, 47].

3.6.5. Аналіз вмісту аскорбінової кислоти. Вміст аскорбінової кислоти визначали у ліофільно висушеному листі рослин другого покоління, вирощених в умовах теплиці, згідно методики (розд. 2.16) з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

В результаті проведених експериментів виявлено, що немає достовірної різниці за вмістом аскорбінової кислоти в листі між вихідною та трансгенними лініями (рис.3.41). Кількість вітаміну С варіює в межах 1,11-1,2 мг/ г сухої маси. Отже, підвищена антиоксидантна активність тканин листків, показана для цих ліній (розд.3.6.4), не може бути пояснена змінами вмісту аскорбінової кислоти як складової антиоксидантної системи рослин.

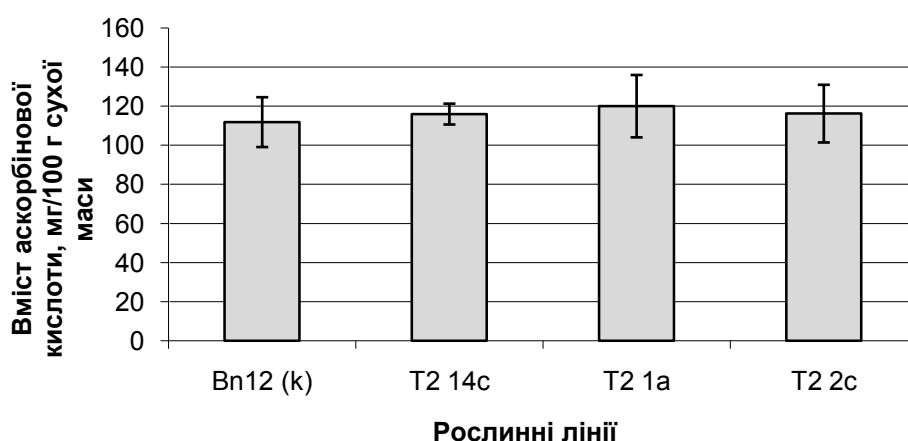


Рис.3.41. Вміст аскорбінової кислоти в листках рослин ріпаку, які експресують ген *sur11A1* тваринного походження: Bn12 (K) – вихідна рослина, сорт Марія; T₂14c, T₂1a, T₂2c – біотехнологічні лінії.

Рослини і більшість тварин можуть синтезувати L-аскорбінову кислоту (вітамін С). В рослинах це відбувається по шляху D-глюкоза → D-манноза →

L- галактоза → L-галактоно-γ-лактон → аскорбінова кислота. У тварин шлях синтезу вітаміну С інший. Він включає утворення D-глюкуронату, д-гулонату, L-гулоно-γ-лактону. Перетворення останньої сполуки у аскорбат каталізує L-гулоно-γ-лактооксидаза (GLOase). Експресія цього фермента з печінки щура у рослинах тютюну і салату дозволила підвищити вміст аскорбінової кислоти в тканинах трансгенних рослин від 4 до 7 разів [207].

Крім того, показано підвищену стійкість трансгенних рослин картоплі, які експресували *GLOase* щура у бульбах, до метилвіолоджену, сольового стресу (100 мМ NaCl) і манітолу в умовах *in vitro*. Рослини трансгенної картоплі характеризувались підвищенням на 41% вмістом аскорбінової кислоти порівняно з нетрансформованими рослинами [195]. Дегідроаскорбатредуктаза (DHAR) підтримує редокс-пул аскорбінової кислоти в циклі окиснений аскорбат – відновлений аскорбат. Експресія гена *DHAR* пшениці у рослинах тютюну і кукурудзи приводила до підвищення експресії відповідного білка в 32 і 100 разів, відповідно, у порівнянні з нетрансформованими рослинами. Це забезпечувало підвищення вмісту аскорбінової кислоти у листках і зерні, відповідно, до 2-х і 4-х разів [97]. Рослини рису, які надекспресували власний ген *OsDHAR1*, мали достовірно вищу фотосинтетичну здатність і активність антиоксидантних ферментів за польових умов [234]. У них спостерігали збільшення врожаю зерна і загальної біомаси завдяки підвищенню маси стебел і коріння і збільшенню кількості колосків і волотей. Вміст аскорбата був підвищений у цих рослинах рису в 1,32 разів. Аскорбатоксидаза – ще один фермент, що контролює редокс-пул аскорбінової кислоти. Рослини томату (*Solanum lycopersicum*) зі зменшеною активністю аскорбатоксидази через РНК-інтерференцію формували більший врожай плодів за умов водного дефіциту і опадання листків [164]. Вони характеризувались також збільшеною провідністю продихів і вмістом цукрів у листках і плодах, а також зміненим співвідношенням гексоз до сахарози у апопласті.

Підвищення вмісту аскорбінової кислоти спостерігали у трансгенних рослин арабідопсиса з експресією гена міо-інозітолмонофосфатази (*CaIMP*), що кодує літій-чутливу фосфатазу нуту (*Cicer arietinum*) з широкою субстрат-специфічністю порівняно з рослинами дикого типу і трансгенними рослинами, які експресували лише селективний ген *hpt* (гігроміцинфосфотрансфераза), що надає рослинам стійкості до гігроміцина [388].

Таким чином, експресія деяких генів рослинного і тваринного походження позитивно впливала на вміст аскорбінової кислоти в трансгенних рослинах. Експресія гена *sup11A1* тваринного походження в рослинах ріпаку не приводила до змін у вмісті аскорбату в листках цих рослин.

3.6.6. Газова хроматографія ефірів жирних кислот, виділених з насіння. За хімічною природою олія ріпаку – це суміш складних ефірів гліцерину і жирних кислот, головним чином, пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої і ліноленової. Пластичність ріпаку і передові наукові підходи дозволили створити за останні 50 років по суті нову культуру. До шестидесятих років 20 століття основною жирною кислотою у ріпаковій олії була ерукова (40–45%). Зараз існують харчові сорти (канола), у яких основна жирна кислота – олеїнова (60-89%), а кількість ерукової кислоти знижена до 0,3–3%. Олія ріпаку технічного спрямування характеризується підвищеним вмістом ерукової кислоти (72%). Крім того, отримано рослини, які накопичують в насінні непритаманні ріпаку жирні кислоти, наприклад, лаурилову або γ -ліноленову, що надає їм особливої хімічної або фармацевтичної цінності [21, 30].

Оцінка здатності фітостеринів ріпакової олії взаємодіяти з цитохромом P450scс з мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби показала, що β -сітостерин, як і холестерин (природний субстрат P450scс) здатен викликати I тип спектральних змін (збільшення поглинання в

діапазоні $A_{390-420\text{nm}}$), що вказує на те, що він може бути субстратом цього ферменту. β -сітостерин і кампестерин з фітостеринової фракції ріпакової олії перетворюються в прегненолон ферментною системою цитохром P450_{scs} – аденодоксин – аденодоксин-редуктаза – НАДФН *in vitro* [44]. Введення гетерологічного гена *sup11A1* в геном ріпаку і можливе змінення за рахунок цього гормонального статусу рослин мало б вплинути на кількісний і якісний склад жирних кислот ліпідів в насінні, отриманому з трансформованих рослин ріпаку.

Вивчення газ-спектрів зразків ефірів жирних кислот (розд.2.18), які було отримано з насіння вихідного сорту і другого покоління гомозиготних транс генних рослин ріпаку, виявило, що якісний склад жирних кислот всіх проаналізованих біотехнологічних ліній не відрізнявся від такого у контрольних рослин (рис.3.42).

Якісні зміни спостерігали у експериментах з інтеграцією у геном ріпаку гетерологічних $\Delta 6$ - і $\Delta 12$ -десатураз гриба *Mortierella alpina* і додаткової власної $\Delta 15$ -десатурази [442]. Введення трьох генів в одній касеті приводило до накопичення до 16% стеаридонової ($C_{18:4}^{\Delta 6,9,12,15}$) кислоти від загальної кількості жирних кислот. В той же час при трансформації окремо генами десатураз гриба і окремо геном $\Delta 15$ -десатурази ріпаку з наступною гібридизацією трансгенних рослин цей показник зростав на 7% [442]. Введення у геном ріпаку кДНК $\Delta 5$ -десатурази гриба *Mortierella alpina* дозволило забезпечити синтез таксолової ($C_{18:2}^{\Delta 5,9}$) (з олеїнової) і піноленої ($C_{18:3}^{\Delta 5,9,12}$) (з ліноленої) кислот завдяки ферментативній активності гетерологічного білка [238].

Одночасна експресія генів $\Delta 6$ – і $\Delta 12$ -десатураз того ж гриба привела до накопичення цінної фармацевтичної речовини - γ -ліноленої кислоти; її вміст сягав 43% [263].

Введенням кДНК, отриманої з насіння трихозанта (*Tricosanthes kirilovii*), яка кодує кон'югазу, що перетворює лінолеву кислоту у пунікову ($C_{18:3}^{\Delta 9,11,13}$), вдалося досягти накопичення останньої у насінні ріпаку, хоча і

у незначних кількостях (~2,5% від загального вмісту жирних кислот) [239]. Пунікова кислота впливає на зниження маси тварин за рахунок зменшення накопичення жирів. Вміст 0,25% (за вагою) пунікової кислоти у дієті мишей протягом чотирьох тижнів приводив до зниження їх маси за рахунок змінення ліпідного метаболізму (зростання карнітін-пальмітилтрансферазної активності). Вплив олії ріпаку, отриманої з насіння генетично модифікованих рослин, виявився більш ефективним, ніж рівної кількості олії з насіння гранату (*Punica granatum*), природного джерела цього кон'югованого ізомера ліноленової кислоти.

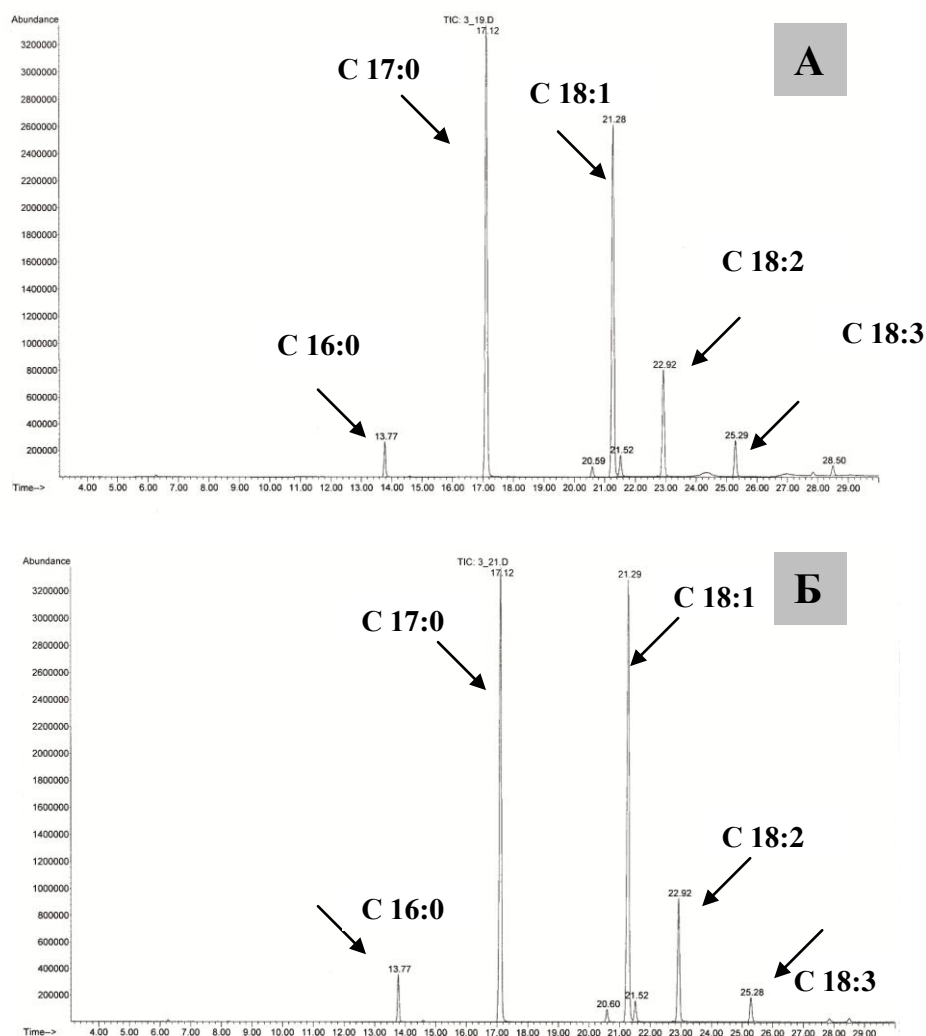


Рис. 3.42. Хроматограми ефірів жирних кислот з насіння: А – контрольна лінія ріпаку, Б – трансгенна лінія Т₂14с.

Змін у складі жирних кислот у бік синтезу лауринової кислоти (C12:0) вдалося досягти в результаті введення в ядерний геном гена MCTE-лауріл-АСР-тіоестерази лавра каліфорнійського (*Umbellularia californica*) під контролем або насіння-специфічного напінового промотору, або 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти [456, 140]. У першому випадку спостерігалось накопичення лаурата в кількості до 60 М/% від загального вмісту триглицеридів в насінні, що майже співпадає з рівнем накопичення лауринової кислоти в донорній рослині, лаврі каліфорнійському (65 М%).

Відмічено, що пряма залежність між рівнем експресії ферменту MCTE і вмістом лауринової кислоти була лінійною у межах 30–35 М/% її накопичення. У трансформантів з більш високим рівнем експресії гена спостерігалась інша картина: підвищення активності MCTE у 8–10 разів приводило до збільшення лише вдвічі акумуляції лауринової кислоти (від 30 до 59 М%). Було з'ясовано, що висока активність MCTE індукує β-оксидазну активність. У порівнянні з контролем остання зростає у 3–10 разів. В усіх аналізованих випадках – у межах кожної досліджуваної частини рослини (листки, насіння), під контролем кожного з уведених промоторів (напіновий, 35S) – швидкість окиснення лауріл-СоА була пропорційна рівню MCTE. Таким чином, рослини з найвищою тіоестеразною активністю характеризувались і найвищою оксидазною активністю лауріл-СоА. Загальна кількість жирних кислот у насінні суттєво не змінювалась [140].

Одночасна експресія генів *MCTE* і *12:0-CoA LPAAT* кокоса (*Cocos nucifera*) дозволила досягти у трансгенних рослинах ріпаку накопичення до 40% лауратів за рахунок встроювання лауринової кислоти у позиції *sn-2*. Загальний вміст C12:0 підвищився до 67%. Слід наголосити, що для поєднання двох трансгенів в одній рослині провели схрещування двох трансформованих ліній [238], тобто застосували метод класичної селекції.

Нехарактерні для ріпаку каприлова (C8:0) і капринова (C10:0) кислоти накопичувались у значних кількостях (до 40%) у трансгенному насінні

завдяки експресії гена *FatB2* з *Cuphea hookeriana*, при цьому спостерігалось зменшення вмісту лінолевої (C18:2) і α -ліноленової (C18:3) кислот [123].

В результаті трансформації ріпаку генами тіоестерази і 3-кетоацил-АСР-синтази з *Cuphea lanceolata* отримано рослини зі зміненим рівнем накопичення каприлової, капринової, лауринової і мірістінової кислот [75]. У складі ацилгліцеридів трансгенних рослин переважали такі, що мали каприлову, капринову, лауринову, мірістінову, пальмітинову, стеаринову, олеїнову, лінолеву, арахінову (C20:0), бегенову (C22:0), лігноцерінову (C24:0) кислоти. У вихідних рослин насамперед синтезувались ліпіди, до складу яких входили пальмітинова, стеаринова, олеїнова, лінолева кислоти. Жирні кислоти із середньою довжиною вуглецевого ланцюга приєднувались до гліцерину у позиціях *sn*-1 і *sn*-3, у положенні *sn*-2 встроювались, головним чином, молекули лінолевої і α -ліноленової кислот.

В насінні рослин ріпаку з трансгеном *cup11A1* спостерігались відмінності у кількості основних жирних кислот ріпакової олії як між контрольною і трансформованими лініями, так і між різними трансгенними лініями (рис.3.43 – 3.47).

Основною жирною кислотою ріпакової олії харчового спрямування, так званих «00» сортів, є олеїнова (C18:1) (табл.3.10).

У чотирьох проаналізованих трансформованих ліній її кількість зростала (рис.3.43). Для лінії T₂14с збільшення вмісту олеїнової кислоти найбільш суттєве (72,67±1,52 моль%) в порівнянні з вихідним сортом Марія (66,31±1,13 моль%).

Підвищення вмісту олеїнової кислоти в насінні ріпаку разом з підвищенням олійності залишається основною метою селекції ріпаку [354].

Максимального підвищення рівня олеїнової кислоти шляхом трансгенезу (до 89%) вдалось досягти в експериментах Stoutjesdijk P.A. et al. [417] за рахунок блокування процесу десатурації цієї кислоти десатуразою $\Delta 12$ при введенні косупресійної плазмиди. Подібні зміни в кількості олеїнової кислоти були характерні для відібраних спонтанних (85–90%) [390] та

індукованих(80-86%) [238] мутантів ріпаку. Сорти Clear Valley 75 і MONOLA, що їх вирощують у наш час у Канаді, накопичують до 70–75 % олеїнової кислоти [391].

Збільшення вмісту олеїнової кислоти в бобах сої спостерігали у рослин з трансгеном *ThIPK2* (інозитолполіфосфаткіназа із *Thellungiella halophila*) [266].

Таблиця 3.10

Склад жирних кислот в оліях з різних культур, % [6]

Жирні кислоти (спрощена формула)	Ярова суріпиця	Ріпак еруковий	Канола	Канола високоолеїнова	Оливи	Пальма	Соя	Кукурудза	Соняшник
Насичені									
Пальмітинова (16:0) і стеаринова (18:0)	16	19	7	7	15	51	15	13	12
Мононенасичені (ω-9)									
Олеїнова (18:1)	32	22	61	70	75	39	23	29	16
Ерукова (22:1)	23	40	сліди	сліди	сліди	-	-	-	-
Поліненасичені (ω-3 і ω-6)									
Лінолева (18:2), ω -6	19	12	21	20	9	10	54	57	71
α -ліноленова (18:3), ω -3	10	7	11	3	1	-	8	1	1

Вміст пальмітинової кислоти (C16:0) у насінні рослин з трансгеном *sur11A1* залишався на рівні контролю (рис. 3.44).

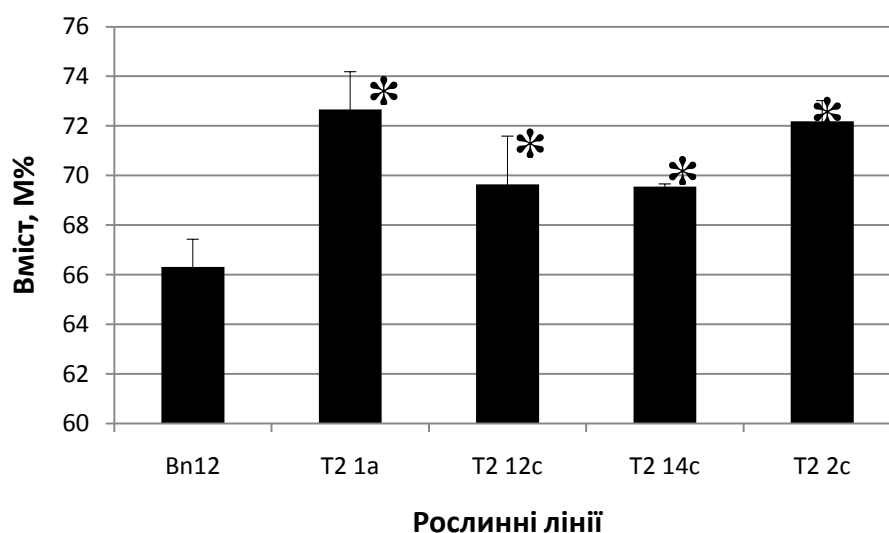


Рис. 3.43. Вміст олеїнової кислоти в насінні ріпаку з трансгеном *sur11A1*: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – трансгенні лінії. Різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна при $P \leq 0,05$.

При вивченні індукованого мутанта ріпаку з підвищеним вмістом пальмітинової (C16:0) кислоти з'ясувалось, що цей показник негативно корелює із загальною олійністю. Так, за підвищення вмісту пальмітинової кислоти з 4,5% (вихідний генотип) до 9,2% (мутантна лінія) накопичення олії знижувалось на третину (з 61,6% до 44,2%, відповідно) [375, 376].

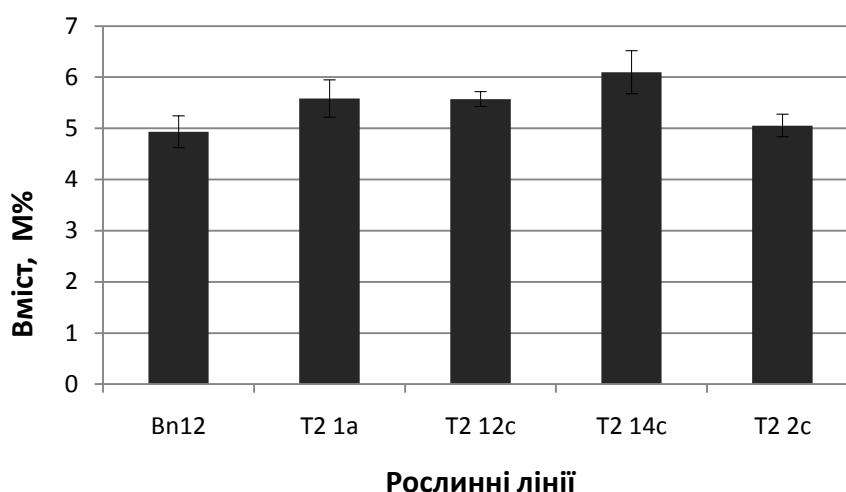


Рис. 3.44. Вміст пальмітинової кислоти в насінні ріпаку з трансгеном *sur11A1*: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – трансгенні лінії.

Для ліній T₂2c і T₂12c з трансгеном *sur11A1* спостерігалось зниження кількості стеаринової кислоти, для двох інших ліній рослин цей показник залишався на рівні контролю (рис. 3.45).

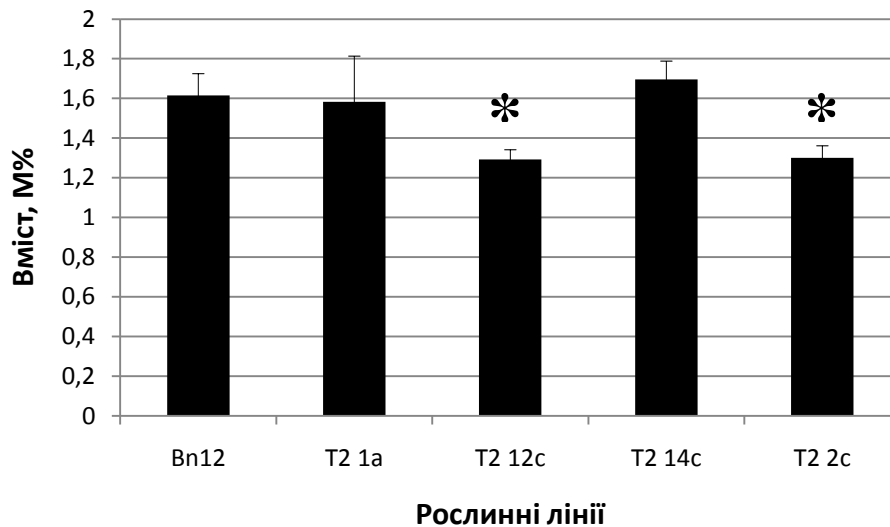


Рис. 3.45. Вміст стеаринової кислоти в насінні ріпаку з геном *sur11A1*: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – трансгенні лінії. Різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна при $P \leq 0,05$.

Підвищення вмісту олеїнової кислоти в експериментах [418] не супроводжувалось змінами вмісту насичених жирних кислот. Слід зазначити, що завдяки трансгенезу вдалося отримати рослини ріпаку, які накопичували в насінні до 40% стеаринової кислоти. Так, трансгенні рослини ріпаку, які експресували насіння-специфічну антисенсову генетичну конструкцію з геном стеарил-АСР (*acyl carrier protein*) десатурази з суріпиці (*Brassica rapa*) [238], синтезували і накопичували, головним чином, стеаринову кислоту (18:0). Для вихідного ріпаку характерним був вміст лише 1% стеаринової кислоти. У трансформованих рослинах концентрація і ферментативна активність стеарил-АСР десатурази у дозріваючому насінні зменшувалась, накопичення стеаринової кислоти збільшувалось до 2–40%. Зміни не зачіпали складу ліпідів у листках, що говорить про ефективність насіння-

специфічного промотору, що його використовували. Подібні рослини були отримані і при введенні антисенсової послідовності власної стеарил-АСР десатурази під контролем FatB4 насіння-специфічного промотору з *Cuphea lanceolata*, що привело до збільшення синтезу стеаринової кислоти в 10 разів (до 32%) у генотипів з низьким вмістом ерукової кислоти і в 4 рази (до 4%) при використанні для трансформації високоерукової лінії [497]. Інша стратегія, спрямована на збільшення активності ферменту FatA, який гідролізує щойно синтезовані в пластидах C18:1-ацил-АСР, що приводить до зростання кількості C18:0, дала можливість отримати рослини ріпаку сорта Westar, які накопичували до 10,1% стеаринової кислоти за рахунок експресії гена *FatA* сої (*Glycine max*), і сорта Quantum, у яких акумулювалось до 22% цієї кислоти завдяки експресії гена *FatA* мангостина (*Garcinia mangostana*) [191]. Стеаринової кислоти акумулювалось більше на 55-68% в результаті трансформації мутованим геном *FatA* мангостина, ніж після трансформації нативною формою [147].

Вміст лінолевої кислоти (C18:2) в насінні досліджуваних рослин з геном *sup11A1* зменшувався максимально на 3,5 моль% (16,15±1,53 моль% у лінії T₂1a в порівнянні з 19,62±0,18 моль% у контрольній лінії) (рис. 3.46).

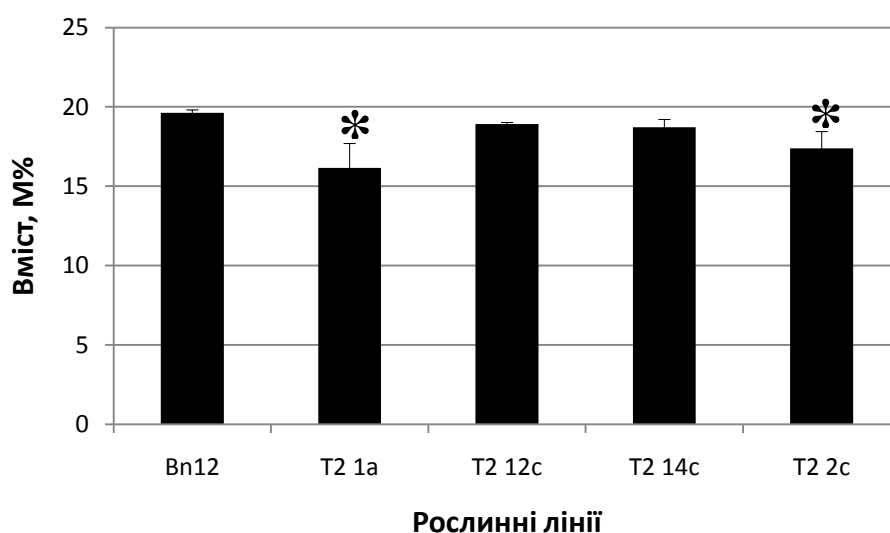


Рис. 3.46. Вміст лінолевої кислоти в насінні ріпаку з геном *sup11A1*: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – трансгенні лінії. Різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна при P≤0,05.

Одночасно спостерігалось зниження кількості ліноленової кислоти в насінні всіх трансформованих ліній ріпаку на 30–40%, максимально до $3,89 \pm 0,13$ моль% у лінії T₂14с (рис. 3.47).

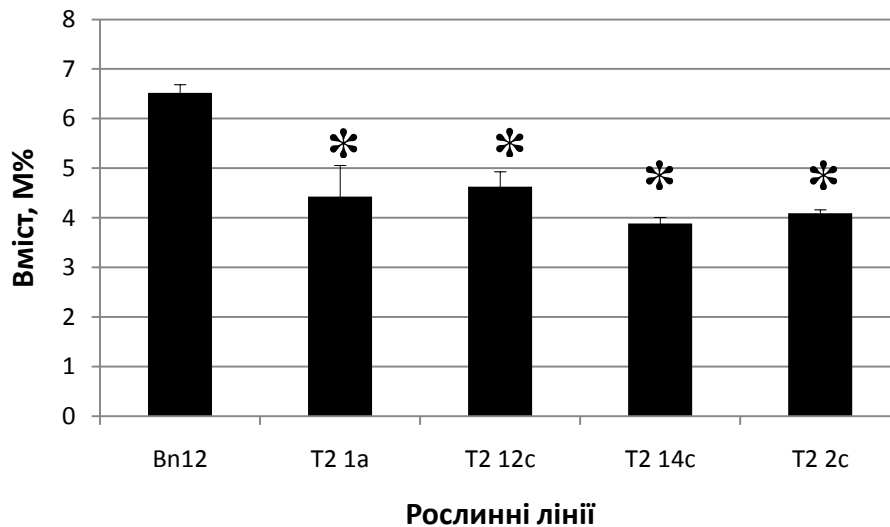


Рис. 3.47. Вміст ліноленової кислоти в насінні ріпаку з геном *sup11A1*: Bn12 – контроль, сорт Марія; T₂1a, T₂12c, T₂14c, T₂2c – трансгенні лінії. Різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна при $P \leq 0,05$.

Подібний ефект спостерігали і у трансгенних рослин ріпаку, які несли антисенс-копію гена власної $\Delta 12$ десатурази [417]. Рівень поліненасичених (лінолева і ліноленова) жирних кислот в насінні цих рослин знижувався до 4%. Поліненасичені жирні кислоти за рахунок здатності до більш швидкого окиснення через наявність більшої кількості подвійних зв'язків в молекулі в порівнянні з мононенасиченою (олеїною) в складі насіння приводять до прогоркання олії, що з нього отримана. Тому зменшення їх вмісту бажано як для збільшення вмісту основної жирної кислоти – олеїнової, так і для підвищення строків зберігання виробленої олії.

У рослин нетрансформованого сорту Марія і аналізованих ліній рослин з трансгеном *sup11A1* не знайдено ерукової (C22:1) кислоти серед жирних кислот насіння. Наші результати відрізняються від даних, отриманих в експериментах [8], в яких після трансформації “пустим” вектором (вектором,

який має в своєму складі лише селективний ген *nptII*), було показано збільшення вмісту ерукової кислоти в насінні трансгенного ріпаку з 1% до 3%.

Вихідний для трансформації у наших експериментах сорт Марія належить до сортів харчового призначення, т.з. “00” сортів. В олії з насіння таких сортів ріпаку має бути 0 – 0,3% ерукової кислоти і до 30 мкМ / г сухого залишку глюкозинолатів. Подібні сорти ріпаку отримали загальну назву «канола». Олію, яку отримують з їх насіння, за смаковими і дієтичними характеристиками можна порівняти із оливковою (табл.3.10). Термін «канола» є на сьогодні зареєстрованою торгівельною маркою канадської організації Canola Council of Canada. Поява високоврожайних безерукових і низькоглюкозинолатних сортів ріпаку в зв'язку з ростом попиту на олії і кормовий білок була причиною значного розширення посівів цієї культури і зростання виробництва насіння з 70-х років 20-сторіччя.

Однак ведеться селекційна робота і по отриманню високоерукових сортів ріпаку, тому що олія з такого насіння незамінна у хімічній промисловості і для виробництва біодизелю. Першим сортом категорії HEAR, з підвищеним (>45%) вмістом ерукової кислоти і низьким вмістом глюкозинолатів, був сорт Hero [393]. Потім створені сорти Mercury (54%) [392], Castor і MilleniUM01 (55%), в яких вміст ерукової кислоти у насінні зріс на 10% у порівнянні із вихідними рослинами.

При схрещуванні капусти (*Brassica oleracea*) і суріпиці (*B.campestris*), диплоїдних батьківських видів для амфідиплоїдного ріпаку (*B.napus*), вдалося отримати рослини ріпаку, у яких накопичення ерукової кислоти в насінні сягало 60% [275].

Для подолання міжвидової несумісності під час віддалених схрещувань із успіхом застосовували біотехнологічний метод соматичної гібридизації. У результаті у соматичних міжродових гібридів ріпаку з видами родини хрестоцвітих, які накопичують значні кількості С22:1, спостерігали збільшення вмісту ерукової кислоти у насінні. Асиметричні соматичні

гібриди між *B.napus* (безеруковий сорт Hanna) і лескереллой Фендлера (*Lesquerella fendleri*), які накопичували до 16,5% ерукової кислоти [406] після низки схрещувань з сортом Gulle (35% 22:1) і лінією HEAR (50% 22:1) в F₆ накопичували вже до 61,5% ерукової кислоти [397].

У гібридів між *B.napus* і катраном абісінським (*Crambe abyssinica*) вміст ерукової кислоти збільшувався у порівнянні з вихідним ріпаком майже на 3% і дорівнював 51% [473].

При схрещуванні високоерукової лінії HEAR (50% ерукової кислоти) з лінією, яка накопичує до 85% олеїнової кислоти, не спостерігали підвищення вмісту ерукової кислоти, хоча вважалось, що така комбінація генів дозволить зменшити 18:1 десатурацію і збільшити кількість олеїл-СоА, що мало б привести до збільшення синтеза С22:1. Виявилось, що в F₃ поколінні загальний вміст мононенасичених жирних кислот збільшувався до 89%, а також зменшувався вміст поліненасичених (<8%) і насичених (<3,5%) жирних кислот [386].

Методами генетичної інженерії були отримані біотехнологічні рослини ріпаку зі зміненим вмістом С22:1 за рахунок експресії генів гетерологічних ацилтрансфераз лізофосфатидової кислоти (*LPAAT*) [247] і власної β-кетоацил-СоА синтази (*Bn-FAEI.1*) [186], а також одночасного функціонування двох названих генів [312].

Відомо, що насичені і ненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга більше С18, входять до тригліцеридів хрестоцвітих у позиціях *sn-1* і *sn-3* (найчастіше пальмітинова і стеаринова), у положенні *sn-2* найчастіше зустрічаються олеїнова, лінолева і ліноленова кислоти [293]. Висока субстратспецифічність *LPAAT* ріпаку не дозволяє встроювання ерукової кислоти у тригліцериди у положенні *sn-2*. Для насіння пінника білого (*Limnanthes alba*) характерно накопичення до 90% ненасичених жирних кислот за рахунок їх встроювання і у положенні *sn-2* [334].

У трансгенних рослин ріпаку, які експресували кДНК гена *LPAAT* пінника білого під контролем насіння-специфічного напінового промотора

[248], ерукова кислота включалась і в позиції *sn-2*, однак це не приводило до збільшення її накопичення у цілому. Виявилось, що домогтися синтезу триеруцинів таким шляхом не вдається: знижується кількість реакцій за участю ерукової кислоти у положеннях *sn-1* і *sn-3* [248].

У рослин ріпаку, трансформованих *LPAAT* із *Limnanthes douglasii* (пінника Дугласа), виявлено до 40% встроювання ерукової кислоти у тригліцериди у положенні *sn-2*, при цьому відмічено до 9% утворення триеруцинів [474].

Введення насіння-специфічного гена β -кетואцил-СоА синтази ріпаку (*Bn-FAE1.1*), що його було виділено з високоерукового сорта Askari, в геном рослин низькоерукового сорта Drakkar привело до суттєвого збільшення рівнів акумуляції ейкозанової і ерукової кислот. В той же час трансформація високоерукового сорта не привела до значних змін в кількості С20:1 і С 22:1 [186].

Останнім на сьогодні досягненням в галузі створення рослин ріпаку, які акумулюють підвищені кількості ерукової кислоти, є робота німецьких вчених [312], де вдалося досягти накопичення 72% ерукової кислоти в насінні. Це стало можливим за рахунок гібридизації трансгенної лінії 361.2В, для якої характерна надекспресія гена елонгази жирних кислот (*FAE1*) і експресія гена *Ld-LPAAT Limnanthes douglasii*, що веде до накопичення близько 63% ерукової кислоти [311], з мутантною лінією 6575-1 HELP, що акумулює до 50% ерукової кислоти [386]. До цього моменту були припущення, що максимальна кількість ерукової кислоти, яка може акумулюватися в насінні ріпаку, має границю у 66% [397]. Накопичення ерукової кислоти (до 72%) і поліненасичених жирних кислот (<4%), що було характерним для F₂, залишалось стабільним у поколінні F₄. В результаті експериментів виділено перспективні високоерукові лінії з низьким вмістом поліненасичених жирних кислот. Автори вважають, що подальше збільшення вмісту ерукової кислоти можливе за рахунок зменшення кількості інших кислот, головним чином, олеїнової, ейкозанової і поліненасичених жирних

кислот. Цього можна досягти, на їх думку, інтеграцією антисенс-послідовності гена *FAD2* одночасно з генами *FAE1* і *LD-LPAAT* [312].

Загальна кількість жирних кислот в насінні ріпаку біотехнологічних ліній залишалась на рівні контрольних рослин (рис. 3.48).

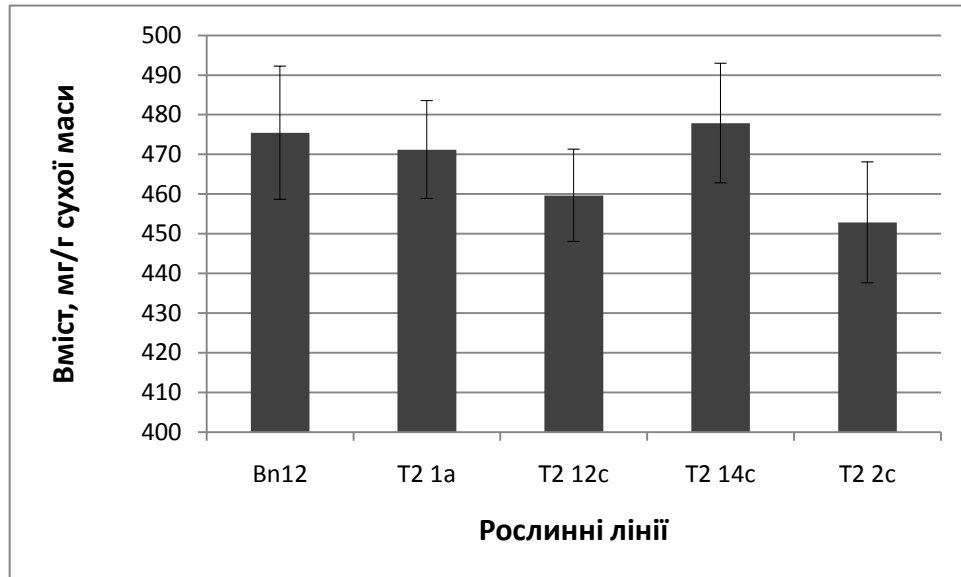


Рис. 3.48. Загальна кількість жирних кислот в насінні ріпаку: Bn12 – контроль, сорт Марія; T2 1a, T2 12c, T2 14c, T2 2c – трансгенні лінії.

У більшості досліджень трансгенних рослин характеризуються тільки якісні зміни в жирнокислотному складі ліпідів насіння. Однак введення гетерологічних генів може приводити як до зменшення, так і до збільшення кількості жирних кислот. Так, надекспресія власних ключових генів біосинтезу жирних кислот *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* і *LEC1-LIKE (LIL)* в насінні трансгенного ріпаку за рахунок введення додаткової копії під контролем насіння-специфічного промотора дала можливість підвищити олійність на 20%. При цьому експресія гетерологічних генів не приводила до змін інших важливих агрономічних характеристик [427].

На накопичення жирних кислот може впливати активність епсилонциклази, які задіяні в біосинтезі каротиноїдів. За зменшення (завдяки трансформації) експресії лікопенепсилонциклази в трансгенному насінні ріпаку накопичувалось більше (в порівнянні з контролем) β -каротина,

зеаксантина, віолаксантина і лютеїна, однак одночасно спостерігалось зменшення загальної кількості жирних кислот і незначні зміни в їх співвідношенні [489].

Введення гена *BoPPT1*, що кодує пластидний фосфоенолпируват/фосфат транслокатор PPT1, під насіння-специфічним промотором у геном рослин тютюну також приводило до підвищення вмісту ліпідів у насінні до 13% у порівнянні з нетрансформованим контролем [160].

Для підвищення олійності насіння ріпаку була проведена успішна експресія гена дріжджів, що кодує цитозольну гліцерол-3-фосфат-дегідрогеназу (*GPDH*), під контролем насіння-специфічного напінового промотору [453]. При цьому в 3-4 рази зростав рівень гліцерол-3-фосфатів у насінні, яке розвивалось, зі збільшенням на 40% вмісту ліпідів при збереженні притаманного вмісту білків. Отримані результати свідчать про те, що концентрація гліцерол-3-фосфата є одним з лімітуючих факторів у накопиченні ліпідів в насінні ріпаку.

Експресія РНК-зв'язаних доменів (RRMs) локусу А білка, контролюючого цвітіння (FCA), у рослинах ріпаку приводила до збільшення накопичення олії у насінні на 4-7% у трансгенних ліній в порівнянні з контролем [347].

Підвищення вмісту олії до 8% в насінні ріпаку показано в рослинах, у яких завдяки РНК-інтерференції неактивні гени *SUGAR-DEPENDENT1* триацілгліцеролліпаз. У таких рослин відбувається мінімальне зниження олійності на кінцевій стадії розвитку насіння, яке зазвичай сягає 10%. Пригнічення ліполіза може бути новим методом підвищення олійності в олійних культур [231].

Інтеграція гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} тваринного походження під контролем конститутивного (35S) промотору не впливала на загальну кількість жирних кислот в насінні.

Серед проаналізованих слід звернути увагу на лінію T₂14с, яка характеризувалась найсуттєвішим збільшенням олеїнової і зменшенням

лінолевої і ліноленової кислот в насінні при збереженні сумарної кількості жирних кислот, специфічної для вихідного сорта Марія. Приймаючи до уваги, що вона також є стійкою до РРТ, ця лінія може бути задіяна в роботі з отримання сортів ріпаку, стійких до гербіцидів на основі фосфінотрицина і зі зміненим складом олії. Їх можна використовувати як у харчових цілях, так і в якості сировини для виробництва біодизеля.

Крім того, заслуговують на увагу і лінії T₂c та T₂1a. Вони мають стійкість до гербіцидів на основі фосфінотрицина; вони синтезують більше, ніж контрольна лінія, сумарного розчинного білка; антиоксидантна активність тканин листків у них підвищена; зацвітають в умовах теплиці на 5-7 діб раніше. Вони накопичують олію в тій же кількості, що і контрольна лінія; для них характерним є склад жирних кислот вихідної форми за винятком зменшеної кількості ліноленової кислоти, що покращує якість олії.

Нами показано, що введення гена *sup11A1* тваринного походження під контролем конститутивного (35S) промотору впливало на кількісний склад ріпакової олії. Однак збільшення кількості олеїнової кислоти було менш значним, ніж в роботі [417]. Можливо, функціонування цього гена під насіння-специфічним промотором привело б до більш суттєвих змін.

Введення гена *sup11A1* тваринного походження в геном ріпаку не приводило до кардинальних змін в якісному складі олії. Але підвищення кількості олеїнової кислоти на 6% і зниження кількості ліноленової кислоти вдвічі покращує як харчову цінність олії, так і її здатність до більш тривалого зберігання без втрати якості. Водночас досліджувані трансформовані рослини ріпаку мають ряд переваг перед вихідними рослинами: збільшену кількість сумарного розчинного білка, підвищену антиоксидантну активність тканин листа, скорочений вегетативний період розвитку.

Таким чином, введення гена *sup11A1* цитохрому P450_{SCC} тваринного походження в ядерний геном ріпаку вплинуло на кількісний склад жирних кислот в його насінні. Трансгенні лінії характеризувались підвищенням максимально на 6% (до 72,67 моль%) кількості олеїнової і зменшенням

майже вдвічі (до 3,89 моль%) кількості ліноленової кислоти. Загальна кількість жирних кислот залишалась на рівні контрольних рослин.

Результати опубліковано в [21, 30, 33, 375, 376].

РОЗДІЛ 4

АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ РІПАКУ

Активні форми кисню (АФК) постійно генеруються у рослинних клітинах у результаті фотосинтезу, фотодихання, β -окиснення жирних кислот. Умови оточуючого середовища, такі як екстремальні температури, водний дефіцит або надлишок вологи, особливо у поєднанні із високою інтенсивністю світла, і деякі патогени можуть провокувати оксидативне пошкодження за рахунок надпродукції АФК. Першим ферментом у процесі детоксикації АФК виступає супероксиддисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1). Вона перетворює супероксид-радикали (O_2^-) на пероксид водню та кисень.

У останні роки значно зросла зацікавленість у вивченні функціонування антиоксидантних ферментів, включаючи СОД, на різних етапах онтогенезу рослин [130, 292, 403]. Особливості активності СОД аналізуються, крім того, на прикладі різних генотипів у межах одного виду [217, 506], а також мутантних і трансгенних рослин, які експресують гетерологічні гени *SOD* різного походження [169, 181-182, 184, 298-299, 384, 441, 463]. Трансгенні рослини тютюну, які експресували химерний ген, що кодував Cu/ZnSOD із хлоропластів гороху, мали втричі більшу активність СОД, ніж контрольні [181]. Це сприяло зростанню толерантності до високої інсоляції за низьких температур [182]. Трансгенні рослини люцерни (*Medicago sativa*) з гетерологічними генами *SOD* характеризувались підвищеною морозостійкістю, посухостійкістю і більшим продукуванням біомаси, ніж нетрансформовані рослини, за польових випробовувань [298, 299, 381, 382]. Рослини рису, які мали у хлоропластах MnSOD з гороху під контролем *SWPA2* промотору, який індукується оксидативним стресом, демонстрували менший вихід електролітів у порівнянні з контрольними рослинами і виявляли менше пошкоджень за умов водного дефіциту, спровокованого поліетиленгліколем 6000, що підтверджено при вимірюванні

інтенсивності фотосинтезу [463]. Рослини китайської капусти (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*, сорт Tropical Pride), які експресували у хлоропластах Cu/ZnSOD із кукурудзи, виявляли зростання толерантності до сольового стресу і SO₂ у порівнянні з рослинами дикого типу [441]. Фотосинтетична активність у трансгенних рослин китайської капусти (*B. campestris*), у яких одночасно були активні гетерологічні гени Cu/ZnSOD і каталази CAT, зменшувалась лише на 6% за умов високого засолення (200 mM NaCl протягом чотирьох тижнів), тоді як у нетрансформованих рослин вона знижувалась на 72% [441]. Надекспресія Mn SOD3.1, мітохондріальної СОД з пшениці, в трансгенних рослинах ріпаку підвищувала їх толерантність до дії високих температур, посухи і холоду як у лабораторних, так і польових експериментах [184]. Трансгенні рослини арабідопсису, що експресували цитозольну Cu/ZnSOD із перстачу (*Potentilla atrosanguinea*), демонстрували кращу толерантність до сольового стресу під час проростання насіння і росту проростків за рахунок більшої довжини корінців, більшої площі розетки і більшої кількості листків, що супроводжувалось високими рівнями активності СОД [169]. Таким чином, рослини, які характеризуються вищою активністю СОД, можуть бути більш стійкими до дії стресових чинників, формувати більшу біомасу, зацвітати раніше, що дозволить отримати врожай за коротший проміжок часу [184].

Ми протестували активність СОД в листках отриманих нами трансгенних рослин ріпаку (розд.3) і відповідних контрольних нетрансформованих рослин, вирощуючи їх в асептичних умовах у пробірках Sigma 25×150 мм (Sigmawave™) з 15 мл безгормонального агаризованого середовища MS (розд.2.2.1). Виявлено відмінності за активністю СОД тканин листків між вихідними сортами ярого ріпаку, залученими до трансформації (рис.4.1). У рослин сорту Марія активність СОД була достовірно вищою у порівнянні з рослинами сортів Ексголд, Обрій, Магнат і Калинівський. Різниця у активності СОД між рослинами з найнижчим (сорт Калинівський) і найвищим (сорт Марія) її значенням становила 35%.

Трансгенні рослини ліній 5/44/1 і 5/44/2, отримані на основі сорту Калинівський (Vn5), які експресували безпромоторний ген *bar* і ген *nptII* (розд.3.2), і нетрансформовані рослини виявляли схожу активність СОД (рис.4.2). Продукт гена *bar* – це ензим, який ацетилює фосфінотрицин або диметилфосфінотрицин [110, 435]. Він забезпечує стійкість до відповідних гербіцидів, наприклад, BASTA. Реакція ацетилювання і експресія гена *bar* не супроводжуються продукуванням супероксид-радикалів.

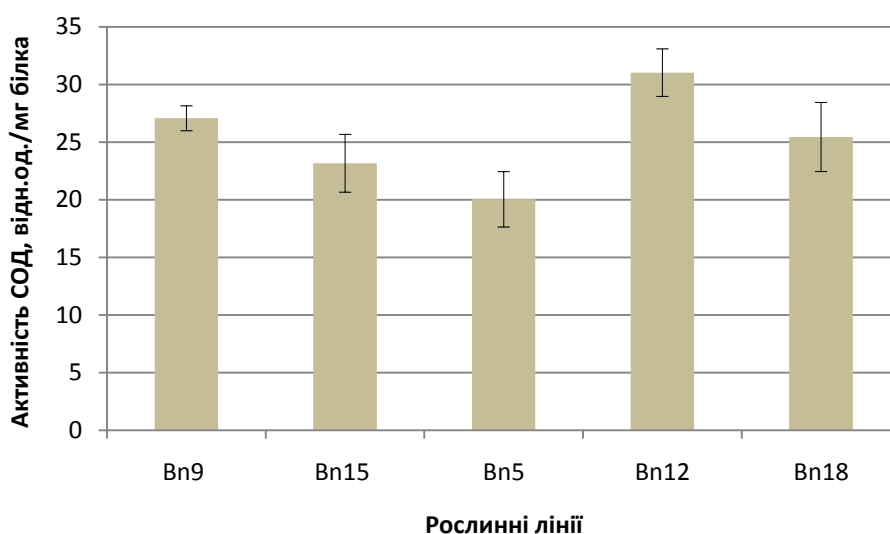


Рис.4.1. Активність СОД нетрансформованих рослин деяких сортів ярого ріпаку.

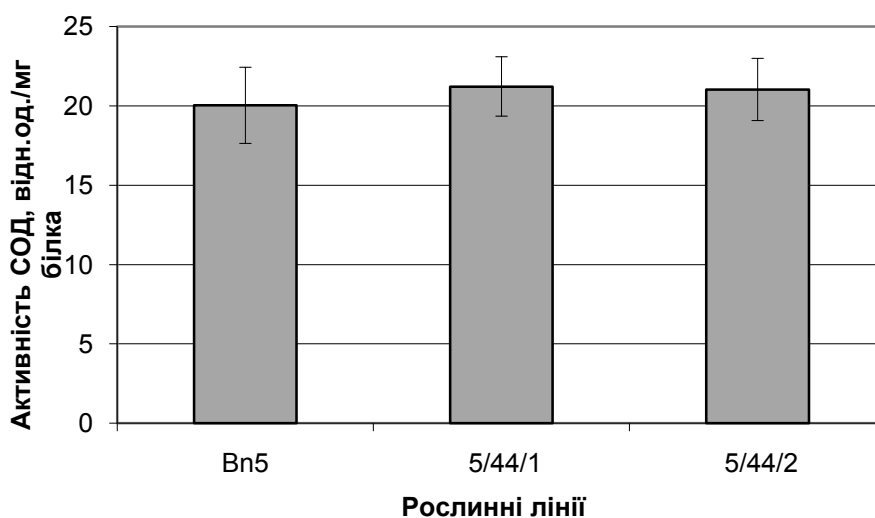


Рис.4.2. Активність СОД рослин ріпаку, що експресують ген *nptII* і безпромоторний ген *bar*: Vn5 – контроль, сорт Калинівський, 5/44/1 і 5/44/2 – трансгенні лінії.

Ген *bar* часто використовується у якості селективного під час генетичних маніпуляцій з рослинами. У двох дослідженнях було виявлено зниження активності СОД у трансгенних рослин, які експресували ген *bar*. Це продемонстровано на культивованих *in vitro* пагонах лядвенцю рогатого (*Lotus corniculatus*) [387] і насінні ріпаку, отриманому в польових умовах з рослин, запропонованих фірмою Monsanto і дозволених до вирощування – подія MS1/RF1 [479]. У рослин іншої події ріпаку з трансгеном *bar*, MS8/RF3, активність СОД в насінні не відрізнялась достовірно від такої у нетрансформованого контролю [482]. Підвищення активності СОД за рахунок експресії гена *bar* зафіксовано не було.

У наших експериментах не виявлено достовірних відмінностей в активності СОД тканин листків рослин ріпаку ліній 15/133/5 та 15/133/9, у яких одночасно функціонують гени *bar* і *epsps* (розд.3.3), в порівнянні з контрольними (рис.4.3).

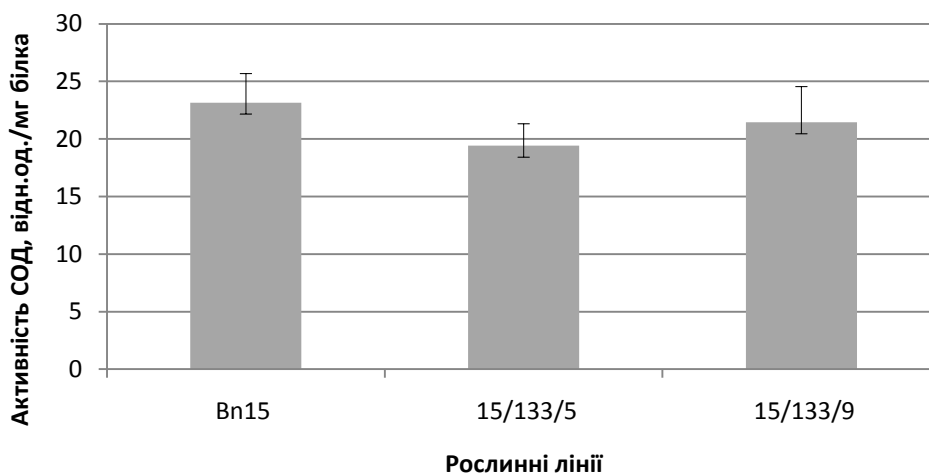


Рис. 4.3. Активність СОД рослин ріпаку, що експресують гени *bar* і *epsps*: Vn15 – контроль, сорт Ексголд, 15/133/5 і 15/133/9– трансгенні лінії.

Ген *epsps* кодує 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат (EPSP) синтазу, що каталізує наступну реакцію: фосфоенолпіруват+3-фосфошикімат \rightleftharpoons фосфат+5-енолпірувілшикімат-3-фосфат (EPSP) [161]. Гербіциди, такі як Раундап із гліфосатом в якості діючої речовини, блокують фермент 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат (EPSP) синтазу, функціональність якого

абсолютно необхідна для виживання рослин. Гліфосат-стійкі (Roundup Ready) рослини мають ген, що кодує гліфосат-нечутливу форму цього ферменту, отриману зі штама CP4 агробактерії (*Agrobacterium* sp.) [478]. Експресія синтаз, зокрема EPSPS, не створює передумов для продукування O_2^- і змін у активності СОД.

Трансгенні рослини, що мали в своєму ядерному геномі та експресували одночасно гени *bar*, *epsps*, *nptII* і *desC::licBM3* (лінії 18a і 18b, розд.3.4), не відрізнялись достовірно від нетрансформованих за активністю СОД (рис.4.4).

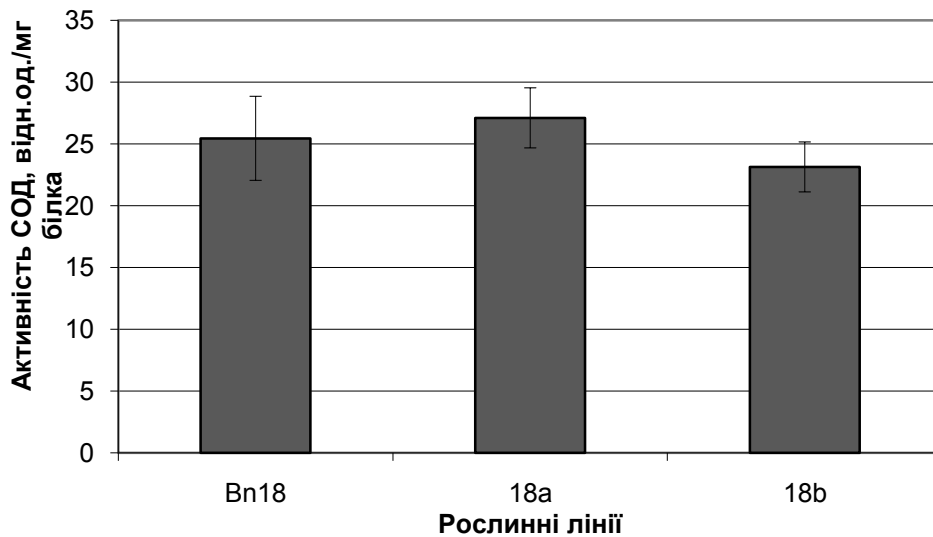


Рис.4.4. Активність СОД рослин ріпаку, що експресують гени *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC::licBM3*: Vn18 – контроль, сорт Обрій, 18a і 18b – трансгенні лінії.

Десатурази жирних кислот каталізують реакції перетворення одинарного зв'язку між атомами вуглецю в ацильному ланцюзі (C-C) у подвійний (C=C) [269]. На прикладі трансгенних рослин тютюну було показано, що активність гена *desC* забезпечує переваги за умов низької температури. У цих рослин активність СОД підвищується під час стресу більше, ніж у контрольних рослин. Але за нормальних умов активність СОД у рослинах тютюну з трансгеном *desC* не відрізнялась від такої в контрольних [339], як і в наших рослинах ріпаку.

Активність СОД у ліній Т₂с (39,1±5,5) і Т₂1а (49,11±3,53) була на 25% і 58% вище, ніж у контрольних (31,02±2,06) за фізіологічних умов (рис.4.5). Ці лінії експресують гени *bar* і *сyp11A1*, останній кодує цитохром Р450_{SCC} із мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби (розд.3.6, [27]). У ссавців цитохром Р450_{SCC} каталізує триетапне окиснення холестерина у прегненолон (рис.4.6) [102, 314, 443].

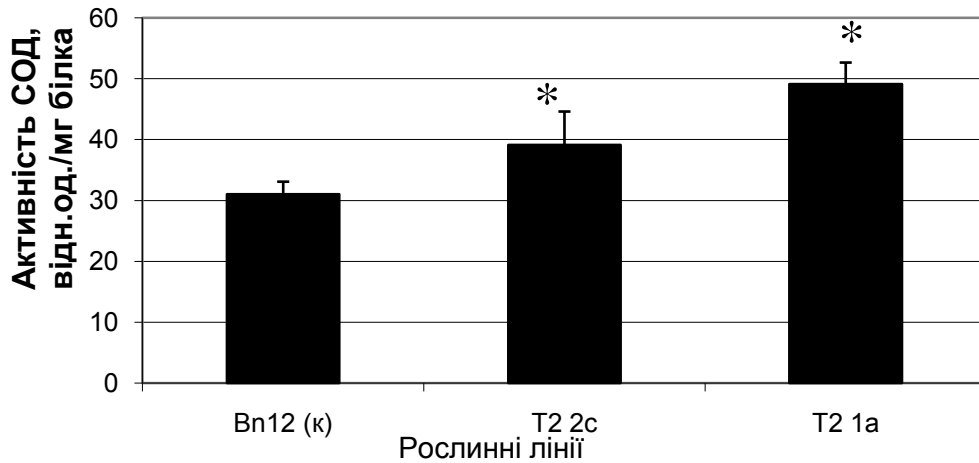


Рис.4.5. Активність СОД рослин ріпаку, що експресують гени *bar* і *сyp11A1*: Bn12 (к) – контроль, сорт Марія, Т₂с і Т₂1а – трансгенні лінії.

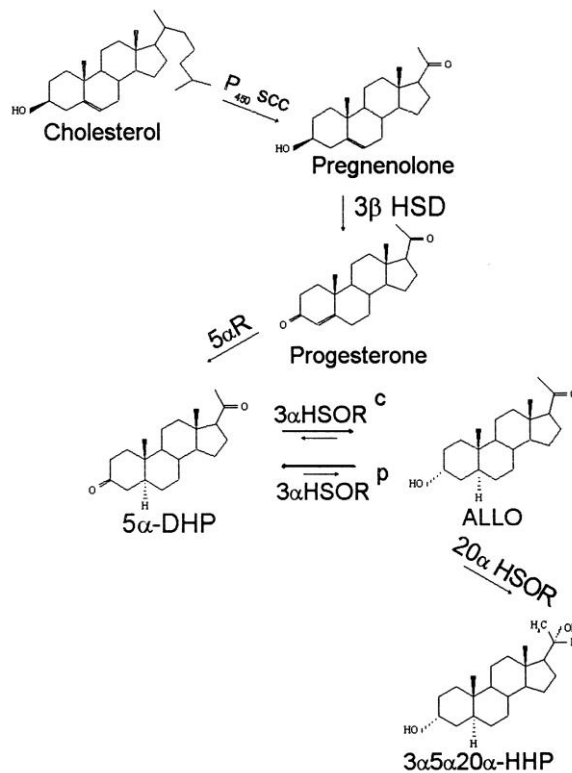


Рис. 4.6. Каталітична функція цитохрому Р450_{SCC} у клітинах тварин [443].

В ході цих реакцій можливе утворення супероксид-радикалів в результаті витока електронів у ланцюзі адреносинредуктаза → адреносин → P450_{SCC} і взаємодії їх з киснем [187]. Таким чином, активність СОД у рослин ріпаку з трансгеном *sup11A1* може зростати за рахунок експресії гетерологічного білка P450_{SCC}. Субстратом для гетерологічного цитохрома може бути β-сітостерол [44].

Підвищення активності СОД в умовах без стресу зафіксовано й у листі рослин ріпаку з трансгенами *bar* і *HuInf-α2b* (рис.4.7). Вона сягала 35,96±2,1 (лінія 9/125/10), 31,24±1,5 (лінія 9/125/20) і 27,02±1,08 од./мг білка (контрольні рослини). В цій групі трансгенних рослин ріпаку активність СОД зростала максимально у 1,33 рази. Підвищення активності СОД за нормальних умов росту *in vitro* показано і в листках трансгенних рослин цикорію з геном альфа-2b інтерферону людини, при чому в якості селективного гена в цих рослинах експресувався або ген *bar*, або ген *nptII* [245].

В клітинах тварин обробка екзогенним альфа-інтерфероном супроводжувалась утворенням супероксид-радикалів і підвищенням активності СОД [57, 271]. Так, попереднє інкубування інтактних нейтрофілів людини з інтерфероном альфа і наступна стимуляція іонофором кальція A23187 достовірно підвищували продукування супероксид-радикалів, які редукують нітроблакитний тетразолій до формагану [57]. Крім того, антиоксидантна активність інтерферону-альфа вивчалась на гепатоцитах миші при оксидативному стресі, на первинній культурі клітин печінки миші HSC і на ізольованих мітохондріях печінки [271]. Активність ІНФ-альфа приводила до підвищення рівнів активності Cu/ZnСОД і MnСОД у всіх аналізованих типах клітин, що залежало від дози ІНФ. Вона також спричинювала інгібування активації клітин HSC і окиснення ліпідів у мітохондріях печінки.

Ми вважаємо, що саме експресія гетерологічного білка (альфа-2b інтерферону людини) є причиною зростання активності СОД в отриманих нами трансгенних рослинах ріпаку за нормальних умов росту.

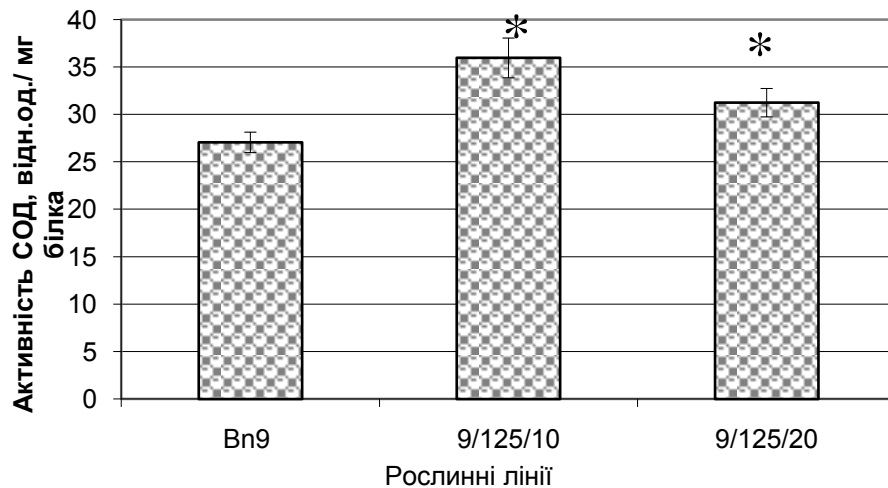


Рис.4.7. Активність СОД рослин ріпаку, що експресують гени *bar* і *HuInf-α2b*: Bn9 – контроль, сорт Магнат, 9/125/10 і 9/125/20– трансгенні лінії.

Зростання СОД активності за умов росту без стресу може сягати 2,5 разів (ріпак) [70], 3 разів (тютюн) [181], 4 разів (кукурудза) [235], якщо експресуються гетерологічні гени *SOD*. Ми спостерігали підвищення активності СОД за сприятливих умов росту у листках рослин з трансгенами *sup11A1i HuInf-α2b* (до 58% і 33%, відповідно). Таким чином, було показано, що підвищення активності СОД у трансгенних рослинах може викликатися експресією не тільки гетерологічних генів СОД, але й інших генів. Подібні результати отримано в експериментах з томатом (*Solanum lycopersicum*), що експресував ген *ZAT12* із *Brassica carinata*, який кодує C₂H₂ zinc finger транскрипційний фактор [356]. Крім того, рослини арабідопсису, які мали ген *TsRfBP* (ген білка, що зв'язує рибофлавін) з черепахи *Trionyx sinensis japonicus* [126], також характеризувались підвищеною активністю СОД за фізіологічних умов. Активність СОД була у 1,69 і 1,1 разів вищою у

трансгенних рослин томата і арабідопсиса, відповідно, у порівнянні з нетрансформованими контролями. Ці рослини розвивались краще контрольних за умов посухи у теплиці [126, 356].

Відомо про зниження активності СОД у деяких трансгенних рослин. Крім згадуваних раніше ріпаку і лядвенцю з трансгеном *bar*, це було характерним для рослин томату черрі з трансгеном *HbsAg* (вірус гепатита Б). Крім зменшеної на 30% активності СОД листків, ці помідори відрізнялись від контролю підвищеними вмістом сумарного розчинного білка і відносним вмістом води у листках, а також неспроможністю продукувати фертильне насіння [176].

Таким чином, не спостерігали відмінностей за активністю СОД в листках рослин ріпаку з трансгенами *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC::licBM3* у порівнянні з нетрансформованими за сприятливих умов росту. За тих же умов у рослин з трансгенами *cup11A1* і *HuInf- α 2b* активність СОД була підвищена порівняно з контрольними. Підвищення активності СОД за сприятливих умов росту може бути викликана експресією гетерологічних білків (цитохрома P450_{SCC} та інтерферону-альфа2b людини). Підвищена активність СОД може бути передумовою для збільшення толерантності цих рослин до стресорів різного походження.

Результати опубліковано в [379, 380, 381, 438].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНУ НА РІСТ РОСЛИН РІПАКУ

5.1. Вплив обробки насіння ріпаку розчином інтерферону людини на фізіологічні і біохімічні параметри проростків

На фізіологічні характеристики рослин мають вплив фізичні, хімічні і біологічні умови під час росту. Значні зусилля багатьох дослідницьких груп спрямовано на рішення проблеми збільшення рослинної біомаси, особливо за несприятливих умов, шляхом використання підходів класичної селекції, застосуванням обробки рослин речовинами різного походження та методів трансгенезу [333, 361, 378].

Обробка біологічно активними молекулами та гетерологічна експресія відповідного(-их) гена(-ів), що забезпечує накопичення таких молекул за рахунок відповідних білків, часто приводить до схожих результатів щодо впливу на ріст і розвиток.

Коренева біомаса проростків рису (*Oryza sativa*) збільшувалась за рахунок видовження корінців як у трансгенних форм, що експресували серотонін N-ацетилтрансферазу вівці та накопичували завдяки цьому мелатонін, так і у звичайних проростків рису після обробки екзогенним мелатоніном [328].

Прогестерон, тестостерон, андростерон, естріол, 17 β -естрадіол – статеві гормони ссавців – впливають на ріст рослин [143, 210]. Рослини тютюну, які акумулювали прегненолон (попередник прогестерону) за рахунок експресії трансгена *sup11A1* [414], продукували більшу біомасу і більшу кількість насіння в порівнянні з контрольними рослинами (нетрансформованими і трансгенними, що експресували лише селективний ген *bar* [39].

Обробка поліамінами приводила до збільшення рослинної біомаси [73]. В той же час, рослини рису, в яких була зменшена експресія S-аденозилметіонін декарбоксилази (ключового фермента синтеза поліамінів),

характеризувались зниженою життєздатністю пилку, зменшеною швидкістю зав'язування зерна і кількістю зерна на рослину через знижені рівні спермідина і путресцина [96].

Обробка кріптогеїном (елісатором гриба *Phytophthora cryptogea*), так само як і експресія трансгена *crypt*, яка веде до накопичення цього білка, що виводить стероли, підвищували накопичення біомаси і вторинних метаболітів у лікарської рослини *Withania somnifera* і дикого виду *Convolvulus sepium* [93].

Лінії м'якої пшениці (*Triticum aestivum*) з трансгеном *BetA*, що кодує холіндегідрогеназу з *Escherichia coli*, менше потерпали від посухи, маючи більш довгі і товщі корені в порівнянні з нетрансформованими рослинами завдяки накопиченню гліцин-бетаїна [192]. Обприскування листків і обробка насіння гліцин-бетаїном покращували ріст рослин рису як за умов достатнього забезпечення водою, так і за посухи завдяки підвищенню активності антиоксидантних ферментів і збільшенню стабільності мембран [80], що дозволяло підтримувати ефективний фотосинтез [151].

Інтерферони (ІНФ) – це білки, що індуються у хребетних тварин вірусами, дволанцюговими РНК і деякими іншими агентами [332]. Обробка екзогенним ІНФ клітин ссавців супроводжується утворенням супероксид-радикалів і ростом активності СОД [58, 244]. НАДФН-оксидази відповідають за утворення супероксида [66]. У клітинних лініях миші (L, L929, L1210 S6, and L1210 R3) і людини (WISH), спочатку оброблених гомологічними ІНФ, а потім – інгібітором НАДФН-оксидази, діетилдітіокарбаматом, відбувалось зниження активності СОД, що залежало від дози і тривалості обробки, та одночасного зниження антивірусного захисту, що його забезпечував екзогенний ІНФ [341].

Для рослин було показано гальмування вірусної інфекції, спричиненої вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ), в листових дисках тютюну різними препаратами лейкоцитарного ІНФ людини: нефракціонованим ІНФ; високо очищеним альфа- і бета-ІНФ; продукованим бактеріями рекомбінантним ІНФ

[320]. Таку ж дію мали і 2'-5' олігоаденілати – похідні ІНФ в клітинах людини [127]. Покращення росту рослин завдяки індукуванню антивірусної активності було продемонстровано у дурману (*Datura stramonium* L.), інфікованого ВТМ, і у гомфрени (*Gomphrena globosa* L.), інокульованої вірусом Х картоплі, після обробки γ -ІНФ і $\alpha 2b$ -ІНФ людини [452]. Обробка γ -ІНФ і 2'-5' олігоаденілатами збільшувала цитокінінову активність і індукувала синтез білків температурного шоку і білків, пов'язаних з патогенезом, в тканинах тютюну і пшениці [241]. Рослинні гомологи тваринних НАДФН-оксидаз були виявлені [175, 230] і інтенсивно вивчаються останнім часом [155, 236, 368, 422]. Рослини *Arabidopsis thaliana*, у яких була неактивна зв'язана з тілакоїдами Cu/ZnСОД, майже не росли і не розвивались, при цьому рівень транскриптів НАДФН-оксидаз був значно знижений [363]. Інгібітор НАДФН-оксидаз, діфеніленейодоніум, практично повністю перешкоджав збільшенню кількості активних форм кисню і підвищенню активності антиоксидантних ферментів, індукованих водним стресом або обробкою абсцизовою кислотою у кукурудзи (*Zea mays*) [213].

Вплив обробок ІНФ у будь-якій формі на фізіологічні і біохімічні параметри цілих рослин або насіння за нормальних умов росту на сьогодні не вивчений. Ми досліджували схожість, загальну біомасу проростків і біомасу їх окремих органів (коренів, гіпокотилів, сім'ядолей), а також визначали сумарний розчинний білок і активність СОД у проростків, які не оброблялись розчинами інтерферону альфа-2b людини або були витримані у розчинах інтерферону різної концентрації (розд.2.7).

Проростання насіння ріпаку в умовах термостата (без світла, температура +24°C) спостерігали за дві доби після обробки. Не було зафіксовано відмінностей між контролем і насінням, обробленим ІНФ, за схожістю (рис.5.1).

Проростки, отримані із насіння, замоченого в розчинах ІНФ альфа-2b людини, мали більшу біомасу в порівнянні з контрольними (рис. 5.2, 5.3).

У семидобових проростків вимірювали загальну біомасу і біомасу сім'ядолей, гіпокотилів і коренів, розраховуючи ці параметри для одного проростка (рис.5.3).

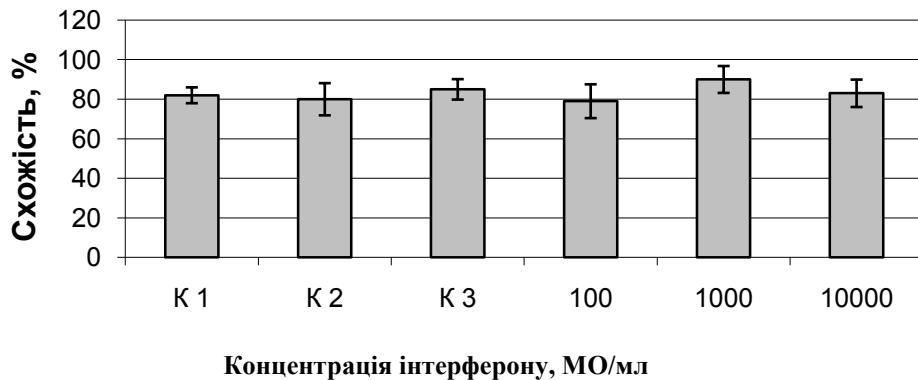


Рис.5.1. Схожість насіння ярого ріпаку сорту Ліга. Похибка представляє значення±стандартне відхилення.



Рис.5.2. Загальний вигляд 7-добових проростків ріпаку сорту Ліга, які сформувались на агаризованому безгормональному середовищі MS в термостаті за температури 24°C після обробки насіння водними розчинами ІНФ в концентраціях 10^2 МО/мл ІНФ (ліворуч) і 10^3 МО/мл ІНФ (праворуч), а також 10^2 МО/мл ІНФ, інактивованим кип'ятінням (посередині).

Результати показують, що обробка насіння ріпаку інтерфероном в концентраціях 10^2 , 10^3 і 10^4 МО/мл стимулювала продукування проростками

більшої біомаси, ніж у контролі, у 2; 2,4 і 1,7 разів, відповідно. Більша біомаса формувалась за рахунок біомаси гіпокотилів і коренів, біомаса сім'ядолей не відрізнялась у тестованих групах проростків.

При вивченні вмісту сумарного розчинного білка виявлено, що сім'ядолі не відрізняються за цим параметром між проростками, отриманими з обробленого інтерфероном насіння ($6,01 \pm 0,42$; $5,64 \pm 0,41$ і $5,66 \pm 0,3$ мг/г сирової маси при обробці розчинами інтерферону 10^4 , 10^3 і 10^2 МО/мл, відповідно) і контролями ($6,19 \pm 0,5$; $6,22 \pm 0,48$ і $5,94 \pm 0,4$ мг/г сирової маси при обробці водою, розчином інтерферону після кип'ятіння та розчином інтерферону з додаванням діетилдітіокарбамата натрію, відповідно) (рис.5.4).

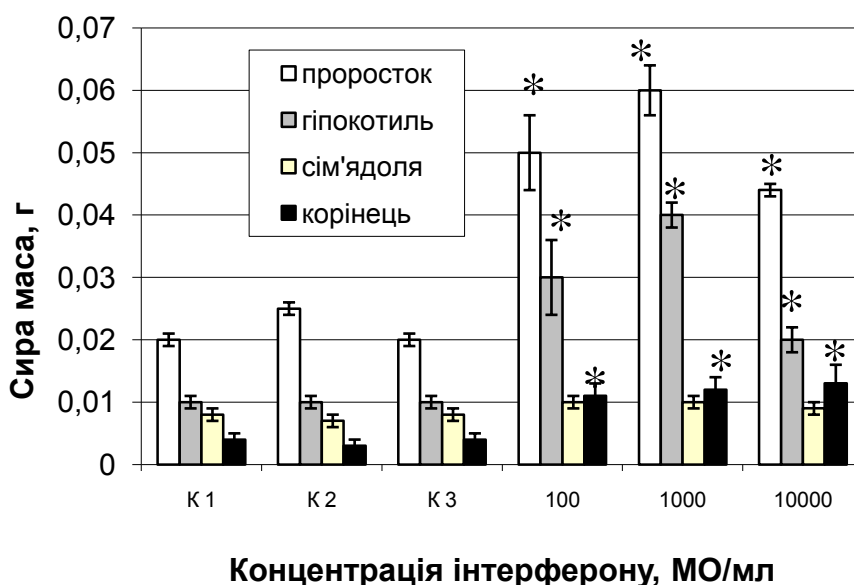


Рис.5.3. Сира біомаса 7-добових проростків ріпаку, отриманих після замочування в розчинах інтерферону людини (ріст в термостаті при 24°C): K1- контроль, без інтерферону; K2 – контроль, інтерферон після кип'ятіння; K3 – контроль, 10^2 МО/мл інтерферону з додаванням діетилдітіокарбамата натрію. *Похибка* представляє значення \pm стандартне відхилення і *зірочка* * відображає достовірні відмінності між експериментальними значеннями і контролем ($p \leq 0,05$).

В той же час СРБ був вдвічі вищим у гіпокотиллях контрольних проростків ($3,86 \pm 1$; $3,99 \pm 0,54$ і $3,12 \pm 0,34$ мг/г сирої маси, відповідно), ніж в експериментальних ($1,82 \pm 0,4$; $1,38 \pm 0,55$ і $1,76 \pm 0,61$ мг/г сирої маси при обробці розчинами інтерферону 10^4 , 10^3 і 10^2 МО/мл, відповідно) (рис.5.4). Проростання насіння супроводжувалось зниженням вмісту СРБ у проростків гороху (*Pisum sativum* L.) [130], ріпаку [508] і редису (*Raphanus sativus* L.) [508] впродовж їх росту.

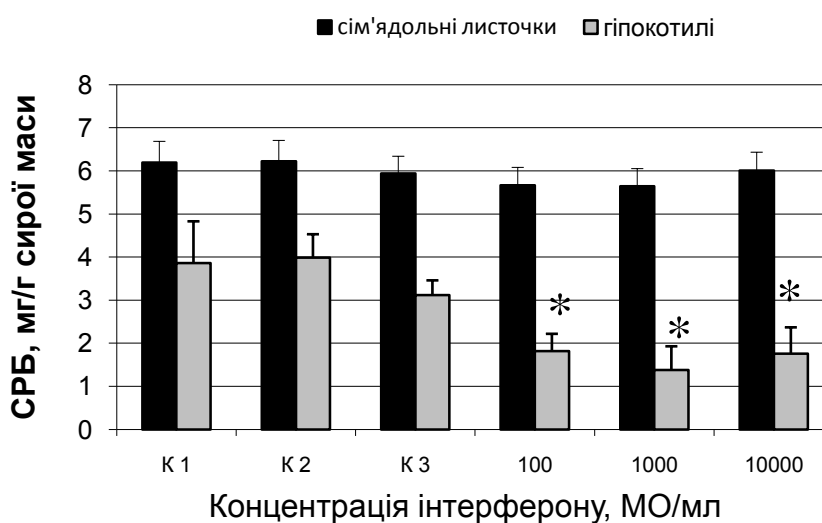


Рис.5.4. Сумарний розчинний білок у сім'ядолях і гіпокотиллях 7-добових проростків ріпаку, отриманих після замочування у розчинах інтерферону людини (ріст в термостаті при 24°C) (позначення відповідають таким на рис.5.3).

Активність СОД була достовірно вищою у гіпокотиллях і сім'ядолях проростків після обробки насіння екзогенним ІНФ у порівнянні з обробкою водою, обробкою ІНФ одночасно з діетилдітіокарбаматом як інгібітором активності СОД, а також обробкою ІНФ, інактивованим кіп'ятінням (рис.5.5). Найвищу активність СОД спостерігали для проростків, отриманих після обробки розчином ІНФ в концентрації 10^3 МО/мл ($24,86 \pm 3,32$ од./мг білка у сім'ядолях і $103,24 \pm 5,75$ од./мг білка у гіпокотиллях). Вона зростала в 2,18 рази у сім'ядолях і 1,47 раз у гіпокотиллях в порівнянні з контролями.

Підвищення активності СОД було також зафіксовано у сприятливих умовах росту для проростків гороху, ріпаку і редису [130, 508]. Залежне від стадії росту підвищення активності СОД було показано для проростків і рослин гороху, що свідчить про те, що продукція супероксид-радикалів зростала [130]. Активність СОД в рослинах підвищується за фізіологічних умов на різних стадіях розвитку, а саме при проростанні насіння [130, 168], цвітінні [181], дозріванні насіння [168, 292]. Ріст активності СОД детектували у пагонах гороху в процесі росту, причому активність СОД була нижчою в надземній частині рослин, ніж у коренях [61] і вищою в молодому листі, ніж у старому [61]. Активність СОД зафіксована найнижчою у листках рослин *Arabidopsis* на стадії розетки. За цвітіння вона підвищувалась на 24,4% [182].

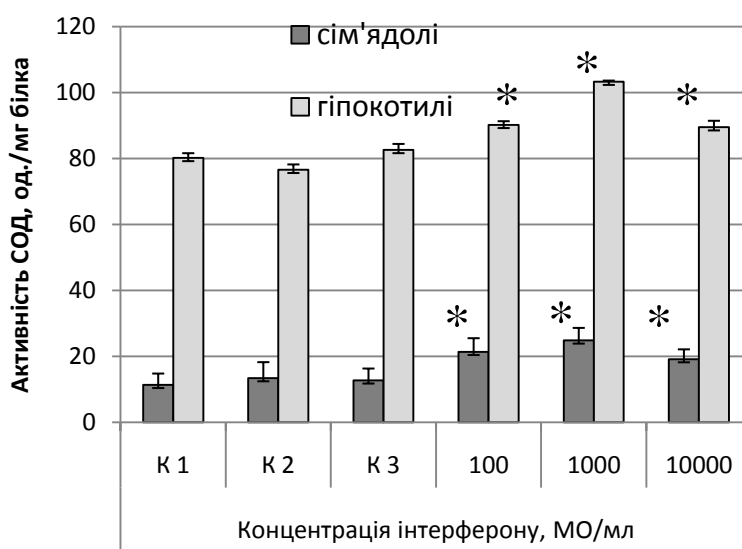


Рис.5.5. Активність СОД у сім'ядолях і гіпокотиллях 7-добових проростків ріпаку, отриманих після замочування у розчинах інтерферону людини (ріст в термостаті при 24°C) (позначення відповідають таким на рис.5.3).

Було продемонстровано, що ріст розтягуванням в проростках пшениці контролювався швидкістю продукування супероксид-радикалів. Він повністю припинявся в умовах інгібування утворення супероксиду

синтетичним антиоксидантом іонолом. За результатами наших експериментів можна припустити, що продукування супероксид-радикалів було більшим в проростках з насіння, обробленого активним інтерфероном в порівнянні з контрольними. Це приводило до прискорення росту розтягненням і супроводжувалось підвищенням активності СОД.

В рослинах і тваринах продукування супероксид-радикалів залежить від активності НАДФН-оксидаз (RВОН, NOX) [66], які індуюються різними стресовими факторами. Це хімічні фактори (важкі метали: свинець, цинк, кадмій; органічні розчинники: етиловий або бутиловий спирти, ендогенно утворювані цитотоксичні молекули: окиснені ліпопротеїни, лізофосфатиділхолін; цитотоксичні речовини з оточуючого середовища: цигарковий дим, дизельні вихлопні гази; перекис водню як форма активного кисню), фізичні фактори (іонізуюче і УФ опромінення; циклічна деформація; (пульсуюче) розтягування; холод, осмотичний тиск), рН: внутріклітинний ацидоз, змінене оточення клітини, зміни в умовах живлення: нестача калію, зміни в рівні кисню (гіпоксія; гіпероксія), фактори запальних процесів (бактеріальний ендотоксин ліпополісахарид, пухлинного некрозу фактор- α ; інтерлейкін-1; інтерферон- γ), метаболіти мембранних ліпідів (простагландіни; тромбоксан A₂; 8-ізопростан; лейкотрієн B₄) у тварин [211]. В рослинах білки RВОН (respiratory burst oxidase homologue) беруть участь у протидії патогенам, часто в поєднанні з реакцією суперчутливості, регулюють сигналінг у відповідь на абіотичні стреси, такі як висока температура, посуха, холод, висока інтенсивність сонячного світла, засоленість і вимокання, а також задіяні в програмах розвитку, а саме у рості розтягуванням корневих волосків і пилкових трубок, дозріванні насіння [422]. Обробка ІНФ індукує активність СОД у тваринних клітинах [244, 341]. Показано, що додавання інтерферону до вірусу не зменшує ураження рослинних тканин [440].

Ми вважаємо, що альфа-2b ІНФ людини може визивати активацію НАДФН-оксидаз у проростках ріпаку, що веде до підвищення продукції супероксида і підвищення у відповідь активності СОД і покращення росту.

Таким чином, обробка насіння ріпаку розчинами рекомбінантного альфа-2b інтерферону людини приводила до збільшення біомаси 7-добових проростків, культивованих *in vitro* (до 2,4 разів). Крім того, виявлено позитивну кореляцію між ростом сирої біомаси і активністю СОД. Ми вважаємо, що підвищена активність СОД, обумовлена обробкою насіння інтерфероном, сприяє накопиченню рослинної біомаси.

Результати опубліковано в [369].

5.2. Вплив обробки пагонів ріпаку розчином інтерферону на ріст в асептичних умовах (сприятливі умови та осмотичний стрес)

Після обробки розчинами інтерферону верхівок пагонів 4-5 тижневих рослин, що розвивались до того на безгормональному агаризованому середовищі MS, їх вирощували в пробірках з 15 мл середовища того ж складу без додавання манітола (контроль) або з 50 мМ манітолом (умови водного дефіциту) (розд.2.7). За 4 тижні оцінювали фізіологічні (сира маса) та біохімічні (вміст СРБ, активність СОД, вміст хлорофілів і каротиноїдів) показники.

Контрольні рослини ріпаку (оброблені водою чи інактивованим кип'ятінням розчином ІНФ (10^3 МО/мл)) формували подібну біомасу ($0,71 \pm 0,04$ і $0,68 \pm 0,03$ г, відповідно) (рис.5.6). В той же час сира маса пагонів, оброблених екзогенним ІНФ, була на 18% вищою за контроль ($0,79 \pm 0,02$ г).

За умов водного дефіциту, індукованого додаванням манітолу в середовище для культивування, зменшення сирої маси на 8-11 % було відмічено для всіх аналізованих груп рослин. Однак сира маса залишалась достовірно меншою у контролях ($0,65 \pm 0,01$ і $0,64 \pm 0,02$ г у варіантах з

обробкою водою або інактивованим кип'ятінням розчином ІНФ, відповідно) в порівнянні з рослинами, обробленими розчином ІНФ ($0,72 \pm 0,02$ г).

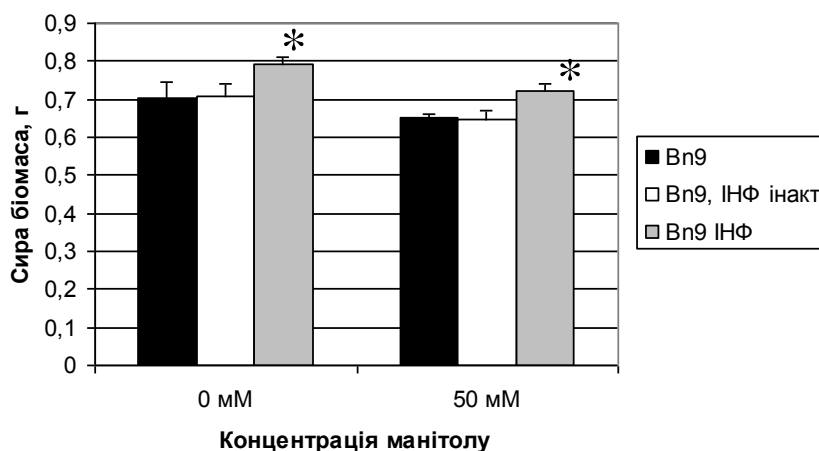


Рис.5.6. Сира маса рослин ріпаку за 4 тижні росту за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу (50 мМ манітолу).

Вплив осмотичного стресу на фізіологічні індекси, включаючи сирину масу рослин, залежить від виду рослин, стадії розвитку, глибини стресу і його тривалості [459, 469, 470]. В наших експериментах обробка пагонів ріпаку екзогенним ІНФ приводила до середнього збільшення сирової біомаси (на 11%) в умовах без стресу і умовах водного дефіциту після чотирьох тижнів росту (рис. 5.6).

Рослини аналізованих груп достовірно не відрізнялись за вмістом СРБ за фізіологічних умов (рис.5.7).

За умов водного дефіциту вміст СРБ достовірно знижувався на 19-20% у контрольних рослинах. Не спостерігалось зниження СРБ у рослин, оброблених ІНФ, у порівнянні з показниками за умов росту без стресу. Таким чином, екзогенний ІНФ попереджав зменшення вмісту СРБ у асептичних рослинах ріпаку за умов осмотичного стресу. Подібне зниження вмісту СРБ було показано для проростків ячменю за посухи [404], а також у двох сортів кунжута (*Sesamum indicum* L.), які різнилися за толерантністю до водного дефіциту [153]. Зменшення СРБ було менш значним у стійкого сорту, він мав більший вміст СРБ за умов достатнього забезпечення вологою.

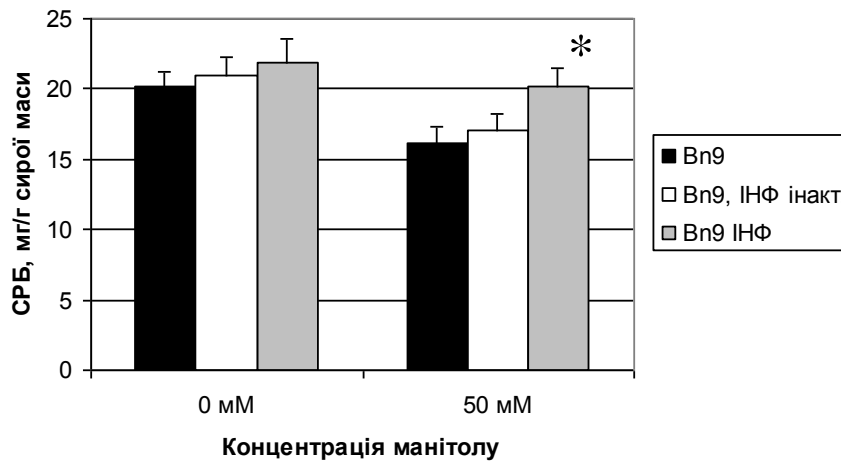


Рис.5.7. Вміст сумарного розчинного білка у листках рослин ріпаку за 4 тижні росту за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу (50мМ манітолу).

Обробка екзогенним ІФ людини приводила до збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу. В оброблених ІФ людини рослинах ріпаку вміст Chl *a*, Chl *b* і каротиноїдів був в 1,53-, 1,24- і 1,15 раз вищий, відповідно, ніж в листках контрольних рослин (рис.5.8) за умов без стресу.

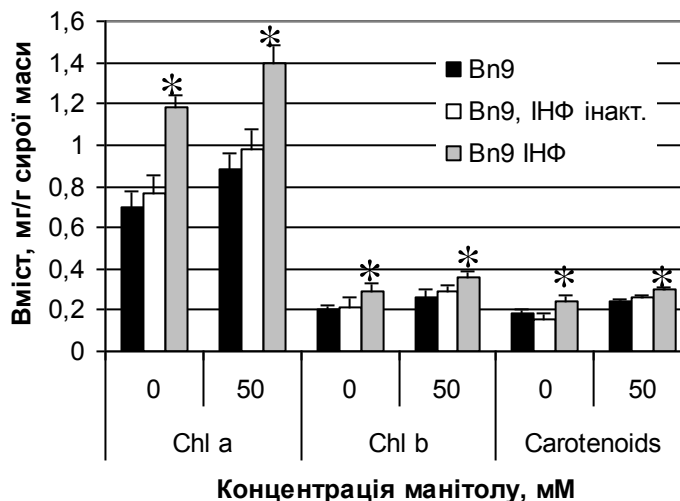


Рис.5.8. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин ріпаку після 4 тижнів росту за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу (50 мМ манітолу).

За умов осмотичного стресу вміст Chl *a*, Chl *b* і каротиноїдів збільшувався у всіх аналізованих рослинах і був вищим у оброблених ІНФ рослинах, ніж у контрольних (рис.5.8).

Зміни у кількості фотосинтетичних пігментів були зафіксовані у рослин ріпаку в наших експериментах за нормальних умов і за умов водного дефіциту. Обробка ІНФ приводила до достовірного збільшення у вмісті хлорофілів і каротиноїдів у порівнянні з контролем в умовах без стресу. Ця закономірність зберігалась і за умов осмотичного стресу. Під час експериментів у кліматичній камері Qaderi et al. [345] також зафіксували збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів у рослин ріпаку за посухи в порівнянні з умовами достатньої вологозабезпеченості. У *Arabidopsis* ці показники залишались практично незмінними у відповідь на посуху у молодих листках, але знижувались на 24% у старих [219]. Nunes et al. [315] зробили припущення, що збільшення вмісту хлорофілів у рослинах *Medicago truncatula* в умовах водного дефіциту може бути компенсаторною відповіддю на пошкодження, що їх зазнає система фотосинтезу. Обробка ІНФ може бути ефективною в покращенні фотосинтезу і за нормальних умов, і в умовах дефіциту вологи завдяки тому, що вона веде до збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів. У рослин арахісу загальна кількість хлорофілів зменшувалась за польових умов водного дефіциту [63], а в повністю сформованих листках томату вона значно збільшувалась за умов посухи і засолення [282].

Активність СОД була нижчою на 13% у листках рослин, оброблених інактивованим ІНФ, ніж у випадку обробки активним ІНФ (рис.5.9) за нормальних умов.

За умов осмотичного стресу ріст активності СОД детектували у всіх групах рослин. Але активність СОД у оброблених активним ІНФ ($40,24 \pm 1,1$ од./мг білка) рослинах залишалась достовірно вищою, ніж в контролях ($33,07 \pm 2,6$ і $32,89 \pm 0,9$ од./мг білка, відповідно).

Рослини за водного дефіциту генерують активній кисень [343]. Ріст активності СОД під час посухи зафіксований у багатьох рослин, в тому числі у ріпаку [52], локриці (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) [323], стійкої до посухи цукрової тростини [382], рису [180], кунжуту [153], люцерни [466].

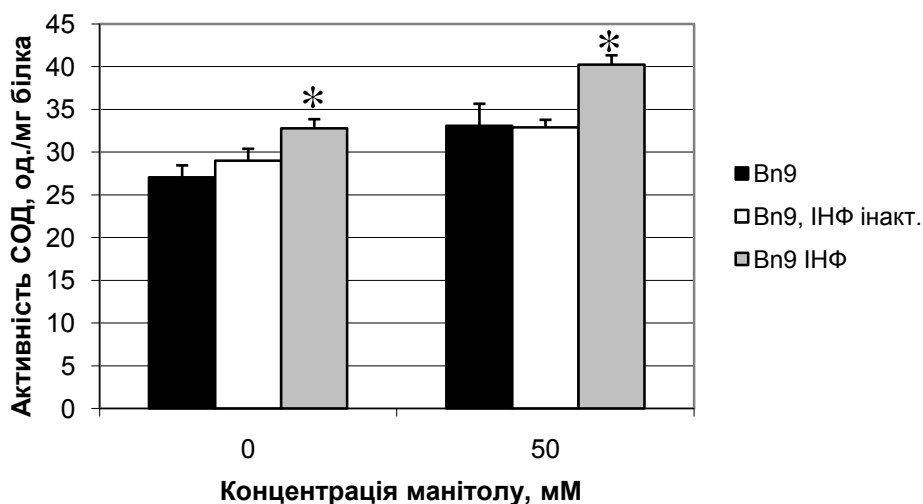


Рис.5.9. Активність СОД у листках рослин ріпаку після 4 тижнів росту за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу (50 мМ манітолу).

Збільшення активності СОД в умовах водного дефіциту, індукованого ПЕГ, у стійкого до холоду *Solanum curtilobum* було вдвічі більшим, ніж у чутливого до холоду *Solanum tuberosum* [289]. При оксидативному стресі, індукованому метилвіолодженем, збільшення активності СОД також було більш вираженим в листках *Solanum curtilobum*.

Загальна активність СОД зростала на третину у молодих листках арабідопсиса після 7 діб відсутності поливу, а в повністю розвинутих листках вона збільшувалась вдвічі [220].

Експресія ізоформ ферментів СОД була завжди вищою у риса сорту, що характеризувався стійкістю до алюмінію і посухи, ніж у рослин сорту, чутливого до цих стресів, як за нормальних умов, так і в умовах осмотичного стресу, індукованому ПЕГ, та при поєднанні осмотичного стресу та підвищеного вмісту алюмінію [325]. Показники активності СОД пропонують

використовувати як непрямий критерій відбору для селекції посухостійкого рослинного матеріалу [52, 247].

Для підтвердження відповідності вибраних критеріїв оцінки адаптивної пластичності рослин ріпаку за нормальних умов і за умов осмотичного стресу були розраховані коефіцієнти лінійної кореляції (коефіцієнти кореляції Пірсона) (табл.5.1).

Оскільки розраховані коефіцієнти за модулем близькі до одиниці і значення є позитивними, можна говорити про сильну позитивну залежність вибраних фізіологічних і біохімічних характеристик за різних умов вирощування рослин. Подібні результати отримано у роботах [88, 129, 394, 490] та ін. Ці параметри (сира біомаса, вміст СРБ і фотосинтетичних пігментів, активність СОД) найчастіше використовують для оцінки нових генотипів рослин.

Таблиця.5.1.

Коефіцієнти лінійної кореляції між фізіологічними і біохімічними параметрами рослин ріпаку за нормальних умов/ за наявності 50 мМ манітолу у середовищі культивування

	Сира біомаса	СРБ	Вміст Chl a	Вміст Chl b	Вміст каротиноїдів
Активність СОД	0,96	1	0,98	0,95	0,92
Активність СОД, стрес	1	0,98	0,98	0,96	0,96

Таким чином, нами показано, що інтерферон альфа-2b людини позитивно впливає на ростові і біохімічні характеристики (сира біомаса, вміст СРБ і фотосинтетичних пігментів) рослин ріпаку, оброблених розчином інтерферону. Ми вважаємо, що особливості проаналізованих рослин залежать

від підвищення продукування в них супероксиду під впливом екзогенного ІНФ, ймовірно, за рахунок активації НАДФН-оксидаз, що, в свою чергу, веде до росту активності СОД.

Результати опубліковано в [381, 407, 408].

РОЗДІЛ 6

ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ В УМОВАХ АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ

6.1. Рослини ріпаку з *lox*-залежною експресією гена *bar* за умов росту на середовищах з додаванням фосфінотрицину

Рослини ріпаку з *lox*-залежною експресією гена *bar* було отримано у попередніх експериментах (розд.3.2) на основі ярого ріпаку сорта Калинівський. За умов теплиці шляхом самозапилення було послідовно отримано насіння до третього покоління (T_3). Лінії Bn5/44/1 і Bn5/44/2 виявились гомозиготними. Тестування проростків на середовищах з РРТ показало розщеплення 3:1 за стійкістю до селективного агента у першому (розд.3.2.3) поколінні, у другому поколінні від самозапилення розщеплення не було. Ці лінії виявились найкращими за стійкістю до обробки гербіцидом BASTA в умовах теплиці.

Для оцінки можливих біохімічних змін у трансгенних рослинах насіння, отримане від регенерантів третього покоління, було пророщене за умов *in vitro*. Рослини зберігали стійкість до фосфінотрицину в поколінні T_3 в асептичних умовах (рис.6.1).

Верхівкові та адвентивні бруньки вирощували на середовищах з додаванням РРТ (10 мг/л) або без нього протягом чотирьох тижнів. Верхівкові пагони контрольних рослин не були здатні до фотосинтезу, жовтіли, не утворювали коренів і гинули під впливом гербіциду. Трансгенні пагони, навпаки, формували корені і нові зелені листки. За відсутності РРТ у середовищі для культивування трансгенні лінії T_3 5/44/1 і T_3 5/44/2 та контрольні рослини не відрізнялись достовірно за накопиченням сирої біомаси ($3,1 \pm 0,7$; $3,4 \pm 0,8$ і $3,6 \pm 0,6$ г, відповідно) (рис. 6.1). Подібні результати було отримано для рослин *N.tabacum* [39, 116], томату (*Lycopersicon esculentum*) і картоплі (*Solanum tuberosum*) [116], що експресували ген *bar*, який було введено за допомогою інших векторів. Накопичення біомаси

достовірно не відрізнялось у трансгенних ліній як при рості на середовищах з додаванням гербіциду ($2,8 \pm 0,5$ г, лінія T₃5/44/1), так і без нього ($3,1 \pm 0,7$ г, лінія T₃5/44/1) (рис.6.2).

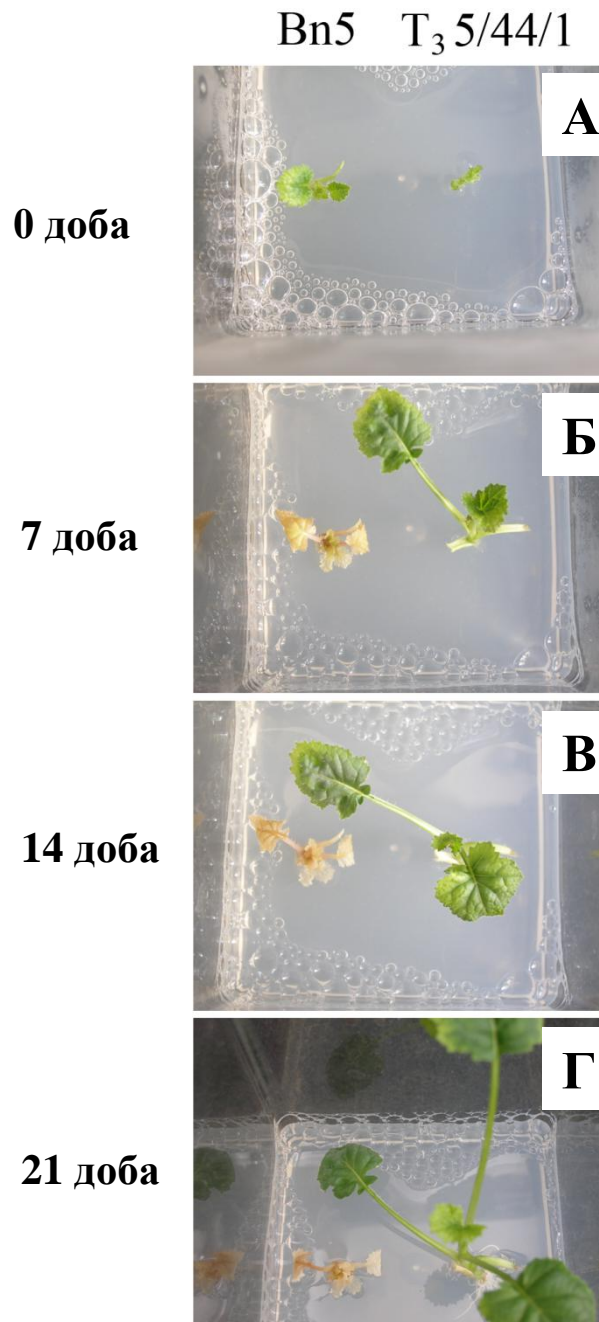


Рис. 6.1. Стійкість до фосфінотрицину трансгенних рослин ріпаку, що експресують ген *nptII* і безпромоторний ген *bar*: А – пагони контрольної (Vn5) і трансгенної (Vn5/44/1) ліній на середовищах з РРТ (10 мг/л) на початку тестування; Б – за тиждень росту; В – за два тижні росту; Г – за три тижні росту.

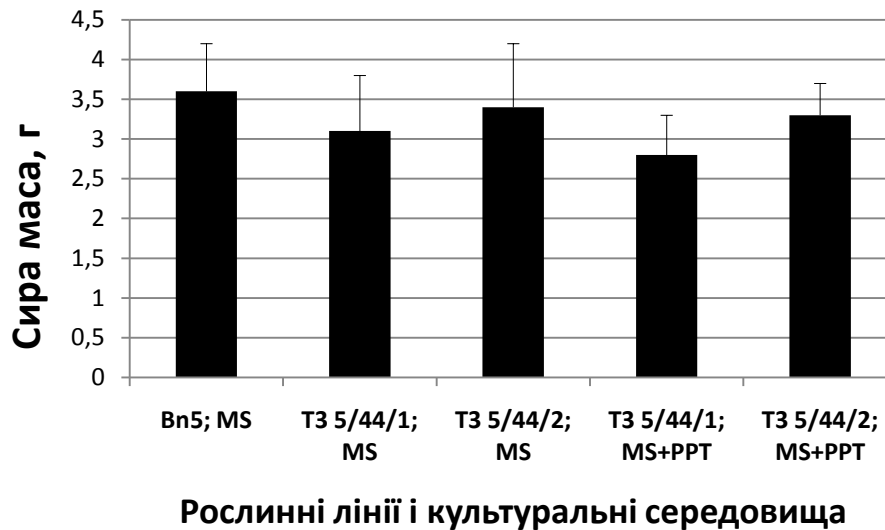


Рис. 6.2. Накопичення сирої біомаси у листках 28-добових рослин ріпаку, що експресують безпромоторний ген *bar*: Bn5 – контрольні нетрансформовані рослини, T₃5/44/1 і T₃5/44/2 – гомозиготні трансгенні лінії третього покоління.

Трансформовані пагони *Lotus corniculatus*, що експресували ген *bar*, також не виявляли достовірних відмінностей за сирою біомасою, коли їх вирощували *in vitro* без обробки гербіцидом BASTA та після такої обробки [387].

Вміст СРБ може слугувати одним із критеріїв оцінки фізіологічного стану рослини як за нормальних умов, так і при дії стресів. Так, показано, що рослини сортів кунжуту (*Sesamum indicum* L.), які відрізнялись за вмістом СРБ за фізіологічних умов, по-різному реагували на посуху [153]. Зниження вмісту СРБ було менш значним у більш стійкого до посухи сорту, який мав підвищений вміст СРБ за нормальних умов. В той же час у листках соняшника (*Helianthus annuus* L.) і томату (*Lycopersicon esculentum*) водний дефіцит спричинював підвищення вмісту СРБ [204, 282].

Листки 28-добових рослин ріпаку використовували для біохімічних аналізів. Вміст сумарного розчинного білка не відрізнявся достовірно у контрольних ($22,3 \pm 1,5$ мг/г сирої маси) і трансгенних рослин ($22,8 \pm 0,9$ і

22,4±1,7 мг/г сирі маси у ліній T₃5/44/1 і T₃5/44/2, відповідно) за нормальних умов росту на середовищі MS (рис. 6.3). Також не було детектовано достовірних відмінностей за вмістом СРБ між трансгенними рослинами, що росли на середовищах з PPT (21,9±0,8 і 22,5 ±0,9 мг/г сирі маси у ліній T₃5/44/1 і T₃5/44/2, відповідно) та без нього (22,8±0,9 і 22,4±1,7 мг/г сирі маси у ліній T₃5/44/1 і T₃5/44/2, відповідно) (рис. 6.3).

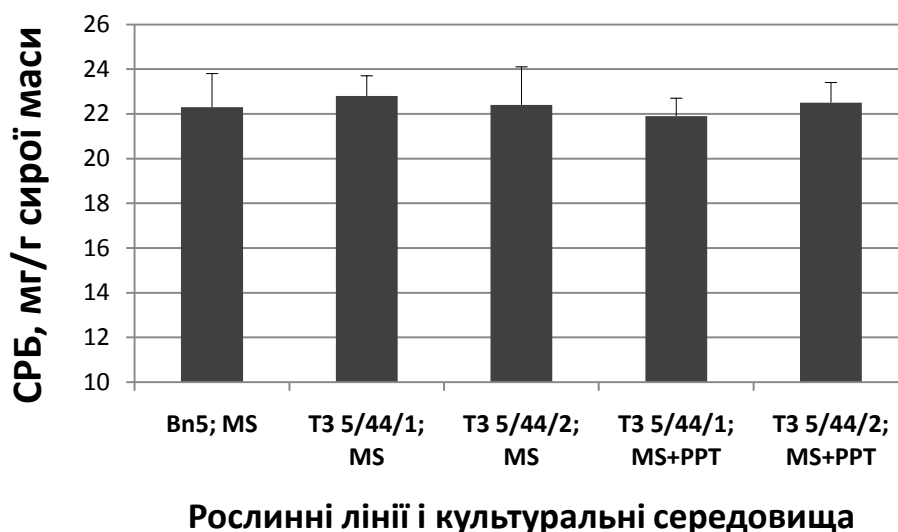


Рис. 6.3. Сумарний розчинний білок у листках 28-добових рослин ріпаку, що експресують безпромоторний ген *bar*: Vn5 – контрольні нетрансформовані рослини, T₃5/44/1 і T₃5/44/2 – гомозиготні трансгенні лінії третього покоління.

В дослідженні, спрямованому на виявлення можливих біохімічних змін у трансгенних рослин рису, які мають стійкість до глюфозінату завдяки експресії гена *bar* (подія LLRICE62) показано, що за низкою складових компонентів зерна, цінних з точки зору харчування, а саме за вмістом білка, вуглеводів, тіаміна, рибофлавіна і ніацина трансгенні рослини не відрізняються від рослин сорту, який був використаний для трансформації [316]. У польових випробуваннях нетрансформовані рослини тричі обприскували гербіцидами за стандартною для рису схемою (пропаніл+бентазол+молінат). Трансгенні рослини рису LLRICE62 вирощували або із застосуванням стандартної методики обробки

гербіцидами, або з використанням глюфозінату, причому в останньому випадку достатньо було двох обробок. Не спостерігали також достовірних відмінностей за амінокислотним складом білків. В той же час вміст заліза, кальцію, пантотенової кислоти та вітаміна Е достовірно підвищувався [316].

Активність СОД не відрізнялась достовірно у листках контрольних ($25,2 \pm 1,5$ од. акт./мг білка) і трансгенних рослин ($24,8 \pm 1,2$ і $26,0 \pm 0,9$ од./мг білка для ліній T₃5/44/1 і T₃5/44/2, відповідно), які культивувались на середовищі MS. Крім цього, відмінностей за цим параметром не було показано у трансгенних рослин, які росли як у присутності, так і за відсутності PPT (рис. 6.4).

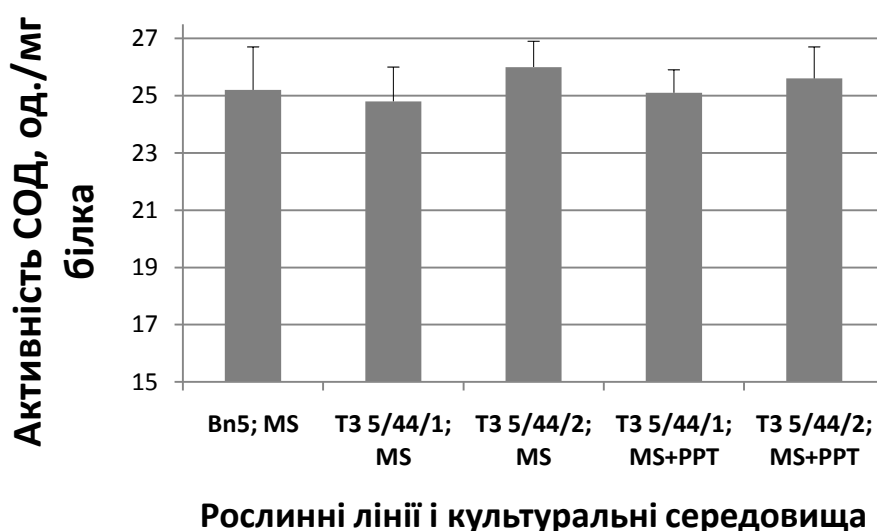


Рис. 6.4. Активність СОД у листках 28-добових рослин ріпаку, що експресують безпромоторний ген *bar*: Bn5 – контрольні нетрансформовані рослини, T₃5/44/1 і T₃5/44/2 – гомозиготні трансгенні лінії третього покоління.

Активність СОД тестували раніше у насінні трансгенних сортів ріпаку, затверджених до промислового вирощування. Виявилось, що для насіння рослин події MS1/RF1 характерне зниження активності СОД на 25%, а насіння події MS8/RF3 не відрізнялось від нетрансформованого за цим параметром [483]. Рослини обох подій мають ген *bar* у своєму ядерному геномі.

Більшість трансгенних рослин характеризуються активністю СОД, подібною до такої у відповідних нетрансформованих рослин за фізіологічних умов вирощування [237]. В деяких випадках вона нижча, як показано для рослин *L.corniculatus* з геном *bar* [387]. Екстремальне підвищення активності СОД приводить до негативних наслідків. Так, первинні трансформанти ріпаку, які експресували ген *SOD* з мітохондрій м'якої пшениці (*Triticum aestivum*) під контролем подвійного 35S промотора і мали підвищену у 5 разів активність СОД, не виживали у наступному поколінні [74].

Аналіз загальної антирадикальної активності проводили у 96-лункових планшетах (рис. 6.5).



Рис. 6.5. Визначення загальної антирадикальної активності листків ріпаку: лунки A1-A6, A7-A12, B1-B6 відповідають екстрактам з листків нетрансформованих рослин сорту Калинівський, що культивувались без PPT; B7-B12, C1-C6, C7-C12 – трансгенним рослинам лінії T₃5/44/1 за тих же умов; D1-D6, D7-D12, E1-E6 – трансгенним рослинам лінії T₃5/44/1, культивованим на середовищі з 10 мг/л PPT; E7-E12, F1-F6, F7-F12 – трансгенним рослинам лінії T₃5/44/2, що культивувались без PPT; G1-G6, G7-G12, H1-H6 – трансгенним рослинам лінії T₃5/44/2, культивованим на середовищі з 10 мг/л PPT; H7-H12 – нетрансформованим рослинам, що культивувались без PPT.

Результати DPPH-аналізу не виявили достовірних відмінностей між контрольними ($12,0 \pm 2,0$ мг/мг сирої маси) і трансгенними рослинами з геном *bar* ($11,0 \pm 2,1$ і $11,5 \pm 1,7$ мг/мг сирої маси у рослин T₃5/44/1 і T₃5/44/2, відповідно), коли вони культивувались на середовищах без додавання PPT (рис. 6.6). Подібно до цього, трансгенні лінії, що росли на середовищах як з PPT, так і без нього, достовірно не відрізнялись між собою за загальною антирадикальною активністю (рис. 6.6).

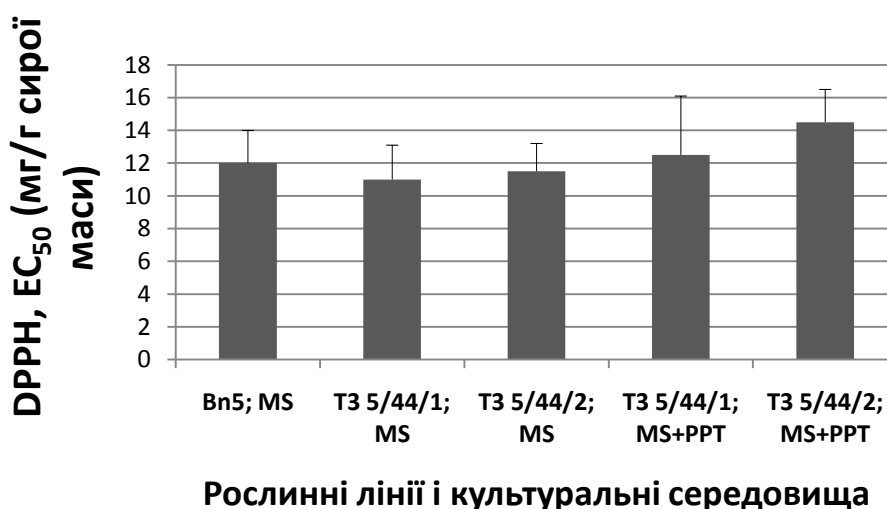


Рис. 6.6. Загальна антирадикальна активність у листках 28-добових рослин ріпаку, що експресують безпромоторний ген *bar*: Bn5 – контрольні нетрансформовані рослини, T₃5/44/1 і T₃5/44/2 – гомозиготні трансгенні лінії третього покоління.

Раніше показано, що загальна антирадикальна активність і активність антиоксидантних ферментів були різними у проростків огірка (*Cucumis sativus* L., сорт. Poinsett 76-S), що мали відмінності за здатністю до утворення первинних корінців [225]. Високотемпературний шок достовірно підвищував антирадикальну активність проти DPPH-радикалу [225].

DPPH-антирадикальна активність у коренях проростків рису (*Oryza sativa* L., сорт M202) після 2-годинної дії високих температур була на 23% вищою, ніж в умовах без стресу [224]. DPPH-антирадикальна активність

зменшувалась на 23 і 27%, відповідно, у контрольних проростках і тих, що піддавались дії високих температур, після 48 год охолодження.

Для екстрактів з насіння сої виявлена позитивна лінійна кореляція між антиоксидантною активністю (виміряною за допомогою DPPH-аналізу) і загальним вмістом фенолів, вмістом танинів і проантоцианідинів [284]. Подібна кореляція була продемонстрована для більшості лікарських рослин [60, 137, 220].

Антиоксидантна активність екстрактів бульб різних сортів картоплі варіювала від 65,2 до 89% інгібування відносно контролю за використання методу окиснення емульсії β -каротин–лінолева кислота [57]. Не виявлено кореляції між антиоксидантною активністю і вмістом фенолів, ймовірно, тому, що головний внесок у антирадикальну активність екстрактів картоплі вносить водорозчинний глікопротеїн пататін. Антиоксидантна активність його розчину (33 мг/мл) дорівнювала 68,1% [57]. Однак у сорту з найвищою антиоксидантною активністю детектували і найвищий вміст фенольних сполук [57]. Показано, крім того, що серед тестованих овочевих культур найбільшою антиоксидантною активністю характеризувалась капуста броколі (95,8%). Морква сорту Danvers 126 мала показник 31,8 %, цибуля сорту Texas Granex – 10,15%, перець – 14,7%. Не спостерігали лінійної кореляції між антиоксидантною активністю і загальним вмістом фенолів, а також між антиоксидантною активністю і вмістом флавоноїдів при вивченні 13 комерційно-цінних сортів представників роду цитрусових, вирощених в Ірані: трьох сортів апельсина (*Citrus sinensis*), трьох сортів мандарина (*C. reticulata*), трьох японських сортів мандарина Сацума (*C. unshiu*), сорту лимона (*C. limon*), сорту грейпфрута (*C. paradisi*) і двох сортів померанцю (*C. aurantium*) [167]. Найвища антиоксидантна активність виявлена у шкірці мандарина сорту Ponkan, найнижча – у м'якоті померанцю. Результати DPPH-аналізу були приблизно вдвічі вищими для шкірці плодів, ніж для їх м'якоті [167].

В наших експериментах *lox*-залежна експресія гена *bar* в рослинах ріпаку не приводила до змін у загальній антирадикальній активності листків у порівнянні з нетрансформованим контролем. Крім того, загальна антирадикальна активність листків трансгенних ліній ріпаку достовірно не відрізнялась у залежності від того, на середовищах з додаванням РРТ або без нього культивувались трансгенні рослини.

Таким чином, трансгенні рослини достовірно не відрізнялись від нетрансформованих за активністю СОД і загальною антирадикальною активністю при рості в умовах без стресу (без гербіциду). Додавання РРТ не змінювало значення параметрів антиоксидантної активності трансгенних рослин у порівнянні з культивуванням без цього гербіциду. Експресія гена *bar* не приводила до змін антиоксидантної активності листків ріпаку відносно контрольних рослин. Відмічено відсутність достовірних змін між трансгенними і нетрансформованими рослинами за накопиченням біомаси і вмістом СРБ при рості на середовищі MS без додавання РРТ. Трансгенні рослини продукували схожу біомасу при культивуванні як на середовищах без гербіциду, так і з додаванням РРТ. Вони характеризувались вмістом СРБ, що достовірно не відрізнявся у рослин, які росли в стресових умовах, порівняно з рослинами, що культивувались без стресу. За досліджуваними параметрами не виявлено неочікуваних біохімічних змін у трансгенних рослинах, які експресують безпромоторний ген *bar*.

6.2. Рослини ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів на основі глюфозінату і гліфосату

6.2.1. Особливості росту на середовищах з додаванням гербіцидів.

Нетрансформовані (сорт Ексголд) і біотехнологічні лінії з трансгенами *epsps* і *bar*, розмножені живцюванням, вирощували на агаризованих середовищах з додаванням гербіцидів або без них. Для біохімічних аналізів брали листки

рослин, які культивувались протягом 28 діб. На рис. 6.7 приведені фото, які ілюструють етапи росту контрольних і трансгенних рослин *in vitro*.

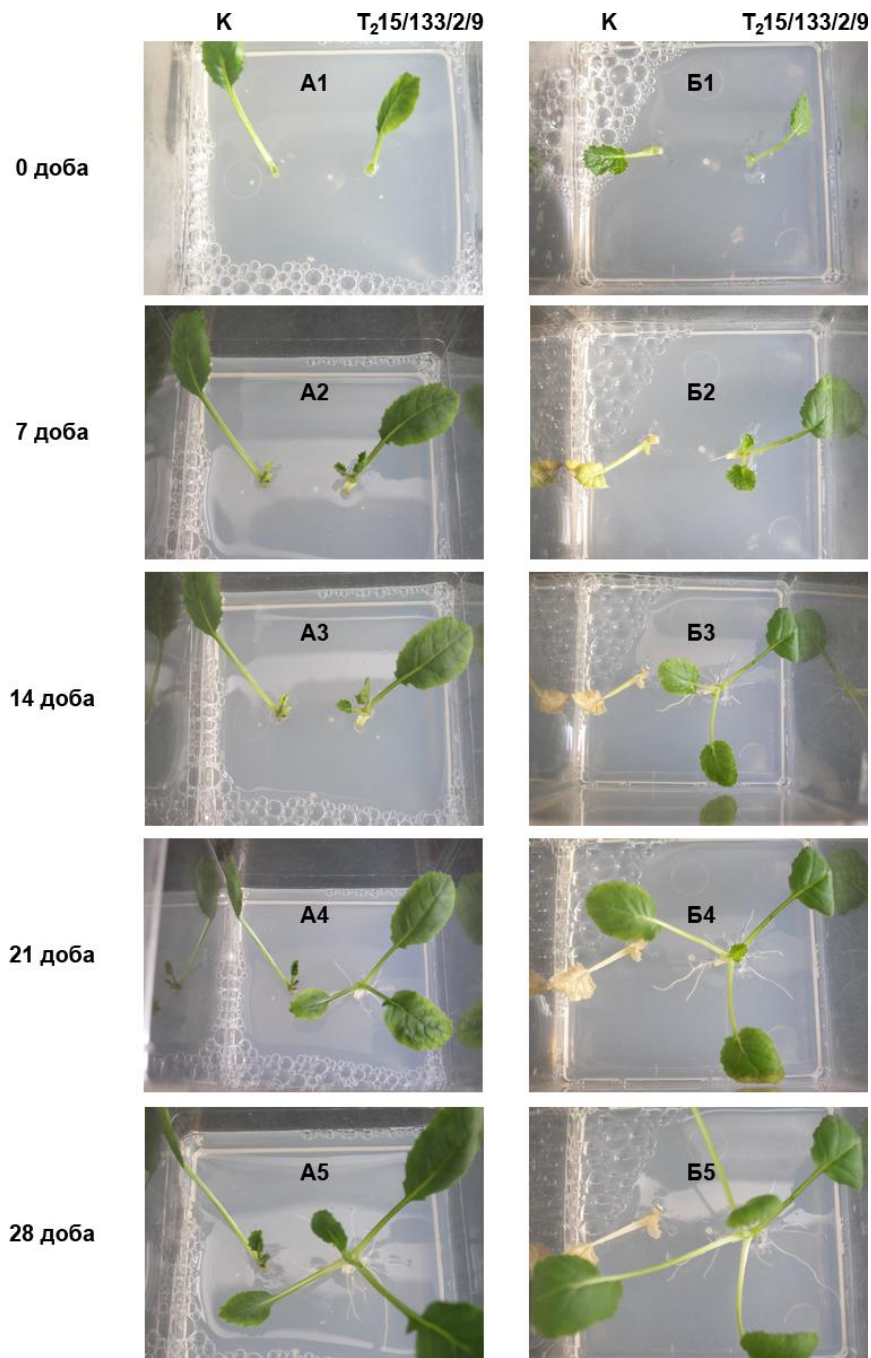


Рис. 6.7. Ріст біотехнологічних рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar* на середовищах з гліфосатом (2 мг/л) і фосфінотрицином (10 мг/л): А1-А5 і Б1-Б5 – доба росту (0 – початок експерименту; 7, 14, 21 і 28 доба); К – контрольна нетрансформована рослина сорту Ексголд; Т_{215/133/2/9} – трансгенна лінія другого покоління.

Показано, що при вирощуванні на середовищах з додаванням фосфометилгліцину (2 мг/л, діюча речовина гербіциду Ураган Форте) контрольні пагони не росли: за чотири тижні адвентивна брунька (рис. 6.7, A1) сформувала лише один листочок діаметром приблизно 2 мм, корені не утворились (рис. 6.7, A5). За тих же умов адвентивна брунька трансгенної лінії другого покоління T₂15/133/2/9 (рис. 6.7, A1) перетворилась у рослину з добре розвинутою кореневою системою, яка мала три сформовані листочки і один, що розвивається (рис. 6.7, A5).

Ріст контрольних і біотехнологічних рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar* на середовищах з додаванням РРТ (10 мг/л) підтвердив стійкість трансгенних рослин до даного гербіциду. Дія РРТ на контрольні рослини виявилась більш жорсткою у порівнянні з дією гліфосату (рис. 6.7). Вже за тиждень вихідна рослина жовтіла і гинула, в той час як на середовищі з гліфосатом сформований попередньо листочок контрольної лінії, що був висаджений разом з адвентивною брунькою, залишався зеленим протягом всіх 28 діб експерименту. Рослина біотехнологічної лінії за чотири тижні росту на середовищі з додаванням РРТ сформувала кореневу систему і п'ять листочків (рис. 6.7, B5).

Визначення вмісту СРБ в екстрактах з листків досліджуваних рослин показало, що достовірні відмінності між вихідними, нетрансформованими рослинами і біотехнологічними лініями різних поколінь трансформантів, що росли за фізіологічних умов (середовище MS), відсутні (табл. 6.1). Лінія другого покоління T₂15/133/2/9 мала подібний вміст СРБ при культивуванні на середовищах без гербіцидів (23,86±1,5 мг/г сирої маси) та з додаванням у селективних концентраціях як РРТ (23,74±1,2 мг/г сирої маси), так і гліфосата (23,96±1,4 мг/г сирої маси).

Визначення загальної антирадикальної активності екстрактів з листків досліджуваних рослин виявило, що достовірні відмінності між нетрансформованими рослинами і біотехнологічними лініями різних поколінь трансформантів відсутні (табл.6.2).

Таблиця 6.1

**Сумарний розчинний білок у листках вирощених на безгормональних
середовищах MS 4-тижневих рослин ріпаку**

Назва лінії	СРБ, мг/г сирової маси		
	Без гербіцидів	+PPT	+Гліфосат
Bn15*	24,15±1,3	н.в.	н.в.
T ₂ 15/133/2/9	23,86±1,5	23,74±1,2	23,96±1,4
T ₁ 15/133/2/9	24,2±0,9	н.в.	н.в.
T ₀ 15/133/2	23,85±1,1	н.в.	н.в.

Примітка: * – сорт Ексголд, контроль; н.в. – не визначали

Таблиця 6.2

**Активність СОД і загальна антирадикальна активність тканин
листіків ріпаку**

Назва лінії	Середовище	DPPH EC ₅₀ , мкл екстракту/лунку	Активність СОД, од./мг білка
Bn15*	MS	11,0±1,9	23,5±1,1
T ₂ 15/133/2/9	MS	10,5±2,4	21,9±1,6
T ₂ 15/133/2/9	MS+ PPT	12,0±2,0	22,4±0,9
T ₂ 15/133/2/9	MS+гліфосат	11,5±1,7	23,4±2,0
T ₁ 15/133/2/9	MS	12,5±3,6	22,8±1,4
T ₀ 15/133/2	MS	15,9±2,7**	23,7±1,8

Примітка: * – сорт Ексголд, контроль; **– відмінності від контролю достовірні при $p < 0,05$.

Винятком були рослини первинних трансформантів (лінія T₀15/133/2), у яких загальна антирадикальна активність була достовірно нижчою на

44,5%. Це можна пояснити дисбалансом антиоксидантного статусу через гемізиготний стан введених генів стійкості до гербіцидів. У наступних поколіннях цей дисбаланс нівелювався, мабуть, за рахунок переходу введених генів у гомологічний стан. Слід зазначити, що вирощування рослин лінії другого покоління T₂15/133/2/9 у стресових умовах, при додаванні до середовищ гербіцидів двох різних груп, не змінювало загальної антирадикальної активності листкових екстрактів. Це говорить про відсутність реакції на стрес у досліджуваних рослин за рахунок експресії відповідних гетерологічних генів.

Активність СОД – показник стабільності окислювально-відновлювальних процесів рослинного організму. Визначення активності СОД екстрактів із листків досліджуваних рослин показало, що вона подібна у вихідних і біотехнологічних рослин різних поколінь (табл.6.2). Показники активності СОД у лінії T₂15/133/2/9, яка росла на середовищі MS без додавання гербіцидів, не відрізнялись від таких при рості на середовищах з фосфінотрицином (10 мг/л) або гліфосатом (2 мг/л).

Насіння біотехнологічних рослин ріпаку, що вирощуються у світі (подія GT73 - стійкість до гліфосату, ген *epsps*, і події MS1/RF1 та MS8/RF3 - стійкість до глюфозінату, ген *bar*) було тестовано на активність антиоксидантних ферментів [483]. Показано зниження активності СОД на 22% у рослин GT73 і на 25% у рослин MS1/RF1. У рослин MS8/RF3 змін активності СОД у насінні у порівнянні з нетрансформованим контролем виявлено не було. Підвищення активності СОД у цих трансгенних рослин зафіксовано не було.

У різних лабораторіях світу отримано значний пул рослин з підвищеною за фізіологічних умов активністю СОД за рахунок експресії генів, які впливають як на активність антиоксидантних ферментів, включаючи СОД, так і на вміст низькомолекулярних антиоксидантів [379, 461, 494]. Переважна більшість трансгенних рослин має подібну до вихідних, нетрансформованих рослин активність СОД.

Спостерігали кореляцію між загальною антирадикальною і СОД активністю. Так, підвищення активності СОД було пропорційне стимуляції антирадикальної активності у проростків бобів (*Vicia faba*) після мікрохвильової обробки насіння [359].

Утворення АФК за фізіологічних умов характерно для метаболізму рослин, тварин і людини. Надмірна кількість цих сполук приводить до оксидативного пошкодження. Показано, що в організмі людини АФК задіяні у патогенезі раку, серцево-судинних захворювань, атеросклерозу, підвищеного кров'яного тиску, діабету, нейро-дегенеративних розладів (захворювання Альцгеймера і Паркінсона), ревматоїдного артриту і старіння [444]. В деяких випадках, наприклад, при гіпертензії та діабеті, підтверджено потенційну корисність рослинних антиоксидантів [56, 162]. Рослини, що здавна використовуються у народній медицині, характеризуються високою антиоксидантною активністю. Показано, що метанольні екстракти деяких рослин, що застосовуються у китайській народній медицині, мають високий рівень DPPH-антирадикальної активності і можуть інгібувати апоптоз, індукований пероксидом водню, у клітинах легеневих фібробластів китайського хом'ячка (V79-4) [251]. Екстракт *Areca catechu* var. *dulcissima*, який характеризувався найвищою антирадикальною активністю, викликав залежне від дози підвищення активності СОД, каталази і глутатіонпероксидази в клітинах V79-4 і таким чином захищав їх від оксидативного пошкодження. Додавання розмарину (*Rosmarinus officinalis*) або розмаринової олії до кормів, які мали в своєму складі кукурудзу та сою, підвищувало якість курячого м'яса. Крім того, показано позитивний вплив такої антиоксидантної домішки на ріст курчат [488]. Останнім часом значна увага приділяється біофортificaції рослин [506], яка полягає у підвищенні вмісту речовин з антиоксидантними властивостями – вітамінів, мінералів і т.п. В той же час продовжуються дослідження щодо того, чи є надмірні кількості АФК первинною причиною або наслідком оксидативних

пошкоджень тканин у рослинах і тваринах, а також чи дійсно рослини є корисним джерелом антиоксидантів для здоров'я людини [137, 227, 444].

Таким чином, у рослин з трансгенами *epsps* і *bar* при культивуванні в асептичних умовах на середовищах з додаванням відповідних гербіцидів не виявлено достовірних відмінностей за вмістом СРБ, активністю СОД і загальною антирадикальною активністю порівняно з ростом на середовищах без гербіцидів. Крім того, показано, що контрольні рослини і трансгенні, що характеризуються стійкістю до фосфінотрицину і гліфосату, мають схожі показники вміста СРБ, загальної антирадикальної активності і активності СОД. Не зафіксовано неочікуваних біохімічних змін у трансгенних рослин ріпаку з гетерологічними генами стійкості до гербіцидів з діючими речовинами гліфосат і глюфозінат.

Результати опубліковано в [32, 377].

6.2.2. Особливості росту в умовах закритого ґрунту. У рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar*, а також у вихідних нетрансформованих рослин визначали біомасу і вміст СРБ під час росту в теплиці (табл.6.3) як показники, що характеризують стан рослин і можуть змінюватись під час стресів, якими є обробки гербіцидами. Біомасу надземної частини і СРБ в листках визначали перед обробкою гербіцидами та за три доби і за тиждень після обробок глюфозінатом і гліфосатом, відповідно.

Показано, що рослини з трансгенами *epsps* і *bar* в поколіннях T₀–T₂ за умов теплиці, без обробок гербіцидами, не відрізняються від вихідних рослин за біомасою і вмістом СРБ (табл. 6.3).

Подібні результати отримано для рослин тютюну (*Nicotiana tabacum*) [116, 414] і картоплі (*Solanum tuberosum*) [116], які експресують тільки ген *bar*, і для рослин амаранту (*Amaranthus palmeri*) з різним рівнем експресії гена *epsps* [454]. Рослини трьох з чотирьох проаналізованих ліній первинних трансформантів були стійкими до дії обох гербіцидів і формували біомасу

надземної частини, подібну до такої, яка була характерна для них без обробки (табл.6.3). Відповідні лінії рослин в поколіннях T₁–T₂, які виявились стійкими до обробок гербіцидами, не реагували на таку обробку як на стрес і зберігали свою здатність формувати біомасу і накопичувати сумарний розчинний білок після обробок гербіцидами на рівні контролю в умовах без обробок (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

**Біомаса і СРБ у листках рослин ріпаку сорту Ексголд і ліній з
трансгенами *epsps* і *bar*, вирощених в теплиці**

Назва лінії	Сира маса, г			СРБ, мг/г сирової маси		
	Без гербіцидів	РРТ	Гліфосат	Без гербіцидів	РРТ	Гліфосат
Vn15 (К)	20,52±1,2	н.в.	н.в.	24,2±1,5	н.в.	н.в.
T ₀ 15/133/2	21,48±1,3	20,49±1,2	19,86±1,4	24,05±1,3	23,96±1,3	23,82±1,4
T ₀ 15/133/3	20,45±1,1	20,56±1,4	н.в.	23,73±1,2	23,46±1,1	н.в.
T ₀ 15/133/4	19,48±1,4	19,49±1,4	19,24±1,4	23,96±1,2	23,87±1,7	23,78±1,1
T ₀ 15/133/5	20,48±1,4	20,34±1,2	20,14±1,2	24,02±1,1	23,78±1,3	23,9±1,4
T ₁ 15/133/2	20,59±1,3	20,46±1,5	20,27±1,5	24,15±1,1	23,64±1,2	23,96±1,4
T ₁ 15/133/4	19,51±1,4	19,44±1,5	19,34±1,3	23,7±1,4	23,76±1,1	23,61±1,1
T ₁ 15/133/5	20,49±1,2	20,24±1,1	19,48±1,4	23,85±1,1	23,7±1,5	23,65±1,4
T ₂ 15/133/2/3	20,51±1,4	20,35±1,5	19,48±1,5	23,83±1,1	23,54±1,2	23,46±1,2
T ₂ 15/133/2/9	20,46±1,2	19,46±1,6	19,24±1,4	23,92±1,2	24,02±1,1	23,88±1,3

Примітка: н.в. – не визначали через загибель рослин

Таким чином, нами виявлено, що трансгенні рослини ріпаку, які експресують гени *bar* та *epsps* одночасно, не відрізняються від нетрансформованих контрольних рослин за загальною біомасою і вмістом СРБ у листках при рості в умовах закритого ґрунту. Рослини ріпаку, що несуть гени стійкості до гербіцидів з діючими речовинами гліфосат і глюфозінат, подібні до рослин, залучених до трансформації, і у них не

спостерігаються непередбачувані біохімічні зміни. Інтеграція генів стійкості до гербіцидів не надає рослинам додаткових переваг за умов стресу (обробка гербіцидами).

Результати опубліковано в [37].

6.3. Рослини ріпаку з геном *desC*

6.3.1. Вивчення толерантності рослин ріпаку з геном *desC* до дії низьких позитивних температур. Розмножені в асептичних умовах контрольні (сорт Обрій) і трансгенні рослини (рис.6.8) використовували для оцінки їх толерантності до дії низьких позитивних температур (+4 °C) (розд. 2.2.3).

Вважали, що введення гена *desC* в ядерний геном ріпаку приведе до збільшення вмісту ненасичених жирних кислот в ліпідах мембран, в першу чергу олеїнової, що підвищить толерантність рослин до холодового стресу, як це показано для тютюну в роботі [321].



Рис.6.8. Розмножені черенкуванням за умов асептичної культури контрольні (нетрансформовані) і трансгенні, що експресують $\Delta 9$ десатуразу ціанобактерії *S.vulcanus*, рослини ріпаку: 1– Bn18, контроль, сорт Обрій; 2 – 18a – первинний трансформант; 3, 4 – трансформанти першого покоління ліній 18a/2 і 18a/6.

Аналізовані трансгенні рослини ріпаку 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25 накопичували в середньому $0,628 \pm 0,09$; $615 \pm 0,04$; $0,627 \pm 0,05$ і $0,596 \pm 0,07$ г сирої біомаси, відповідно, і достовірно не відрізнялись від контрольних ($0,622 \pm 0,07$ г) за цим параметром за температури $+22^\circ\text{C}$ (рис. 6.9).

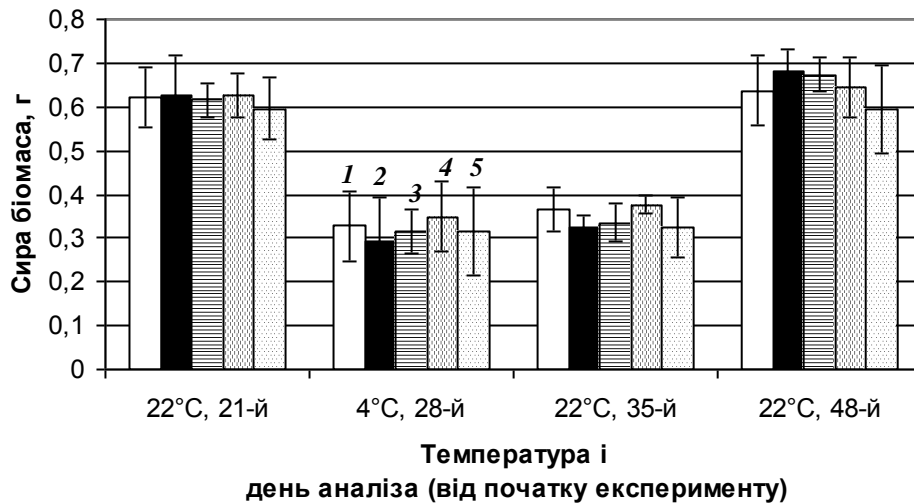


Рис. 6.9. Сира біомаса рослин ріпаку за різних температурних режимів культивування в асептичних умовах: 1 – контроль, нетрансформовані рослини сорта Обрій; 2, 3 – первинні трансформанти ліній 18a і 18b; 4, 5 – трансформанти першого покоління ліній 18a/6 і 18b/25.

Після росту при $+4^\circ\text{C}$ сира біомаса знижувалась майже вдвічі у всіх аналізованих рослин ($0,328 \pm 0,08$ г у контрольних рослин та $0,292 \pm 0,1$; $0,314 \pm 0,05$; $0,348 \pm 0,08$ і $0,315 \pm 0,1$ г у трансгенних ліній 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25, відповідно). За умов повернення до вихідного температурного режиму і трансгенні, і нетрансформовані рослини однаково були здатні до накопичення сирої біомаси. Оцінка цього параметру дозволяє виокремити рослини, толерантні до стресів. Так, рослини ріпаку, що експресували транскрипційний фактор рису *Osmyb4*, формували сирину біомасу, яка на 15% перевищувала таку у контрольних рослин, при зростанні за низьких ($+4^\circ\text{C}$) температур [170].

Рослини солестійкого сорту ріпаку Dunkeld характеризувались більшою сирою і сухою біомасою, а також формували більший врожай, ніж рослини чутливого до засолення сорту Cyclon в умовах різних рівнів засолення ґрунту [346]. Зменшення сирої біомаси у деяких сортів рису відмічено при осмотичному та іонному стресах, індукованих манітолом і NaCl [94]. Рослини різних сортів ріпаку відрізнялись між собою за зменшенням накопичення сирої біомаси, коли їх поливали морською водою [249]. Замочування насіння в розчині хлориду кальцію приводило до збільшення сирої біомаси проростків і нівелювало негативний вплив на ріст рослин поливу морською водою [249]. Зменшення сухої біомаси, яке спричинювало зниження сирої біомаси, починаючи з самого низького рівня осмотичного стресу, відмічено у чотирьох видів рослин пеларгонії: *Pelargonium x domesticum*, *P. graveolens*, *P. x hortorum* і *P. peltatum* [189]. Рослини різних сортів люцерни відрізнялись між собою за накопиченням біомаси як за нормальних умов, так і за умов росту при низьких температурах [463].

За відсутності температурного стресу трансгенні рослини ріпаку, які експресували $\Delta 9$ ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *S. vulcanus*, достовірно не відрізнялись від контрольних ($27,13 \pm 3,3$ мг/г сирої маси) за рівнем СРБ (рис. 6.10). Не спостерігали також відмінностей за цим параметром як в умовах росту за низької позитивної температури ($31,96 \pm 2,24$; $31,33 \pm 5,56$; $28,52 \pm 5,8$ і $28,44 \pm 2,52$ мг/г сирої маси у рослин ліній 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25, відповідно), так і при поверненні рослин у вихідні умови культивування. Вміст СРБ залишався без достовірних змін протягом усього експерименту. Рослини ріпаку, коли їх поливали морською водою, накопичували більше СРБ, ніж контрольні [249]. У ріпаку сортів Dunkeld (солестійкий) і Cyclon (чутливий до засолення) за умов сольового стресу не спостерігалось змін СРБ [346]. Обробка аскорбіновою кислотою листків ріпаку при сольовому стресі приводила до достовірного збільшення вмісту СРБ у листках і коренях [132].

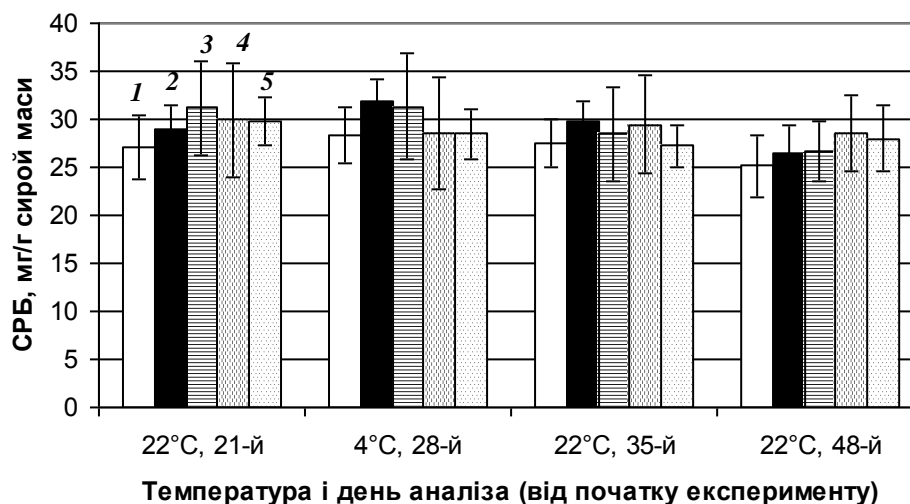


Рис. 6.10. Вміст сумарного розчинного білка у листках рослин ріпаку за різних температурних режимів культивування в асептичних умовах: 1 – контроль, нетрансформовані рослини сорта Обрій; 2, 3 – первинні трансформанти ліній 18a і 18b; 4, 5 – трансформанти першого покоління ліній 18a/6 і 18b/25.

У результаті проведених вимірювань активності СОД виявлено, що трансгенні лінії не мали достовірних відмінностей за цим параметром між собою ($17,48 \pm 0,9$; $18,03 \pm 0,67$; $18,15 \pm 1,2$ та $16,98 \pm 0,45$ од./мг білка у ліній 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25, відповідно) та порівняно з контрольними рослинами ($18,23 \pm 0,81$ од./мг білка) при 22°C (рис. 6.11).

Після зниження температури до $+4^\circ\text{C}$ активність СОД підвищувалась як у контрольних ($55,28 \pm 9,7$ од./мг білка), так і у трансгенних рослин ($63,18 \pm 10,7$; $55,03 \pm 2,29$; $67,19 \pm 8,79$ і $51,99 \pm 9,68$ од./мг білка у ліній 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25, відповідно). Однак не спостерігали достовірних відмінностей за активністю СОД між нетрансформованими рослинами і рослинами ріпаку з трансгеном *desC* в умовах низькотемпературного стресу. За тиждень після повернення до росту при $+22^\circ\text{C}$ активність СОД зменшувалась на 37-48%, ще за тиждень – майже до початкового рівня як у трансгенних ($14,65 \pm 1,3$; $16,42 \pm 0,45$; $16,32 \pm 2,74$ і $15,27 \pm 0,2$ од./мг білка у ліній 18a, 18b, 18a/6 і 18b/25, відповідно), так і у контрольних ($16,35 \pm 0,78$ од./мг білка) рослин.

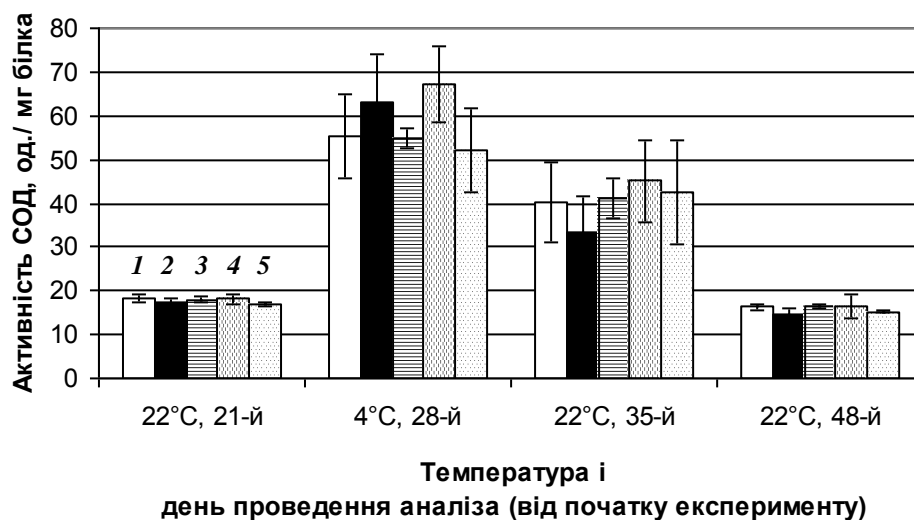


Рис. 6.11. Активність СОД у листках рослин ріпаку за різних температурних режимів культивування в асептичних умовах: 1 – контроль, нетрансформовані рослини сорта Обрій; 2, 3 – первинні трансформанти ліній 18a і 18b; 4, 5 – трансформанти першого покоління ліній 18a/6 і 18b/25.

При вивченні холодостійкості у різних сортів люцерни була виявлена кореляція між активністю антиоксидантних ферментів і толерантністю до холоду [466]. У рослин сорту Xinmu No. 1 спостерігали підвищену активність СОД за умов стресу в порівнянні з рослинами сорту Northstar. Останні виявились менш холодостійкими на стадії проростків.

Раніше було встановлено, що ген десатурази ціанобактерії інтегровано до ядерного геному ріпаку, і він функціонує (розд. 3.4) [28], що приводило до збільшення вмісту ненасичених жирних кислот [26]. Однак виявилось, що цього збільшення, яке відбувається головним чином за рахунок пальмітліноленової кислоти (C16:3, до 33 %), недостатньо для підвищення толерантності ріпаку до знижених температур. Можливо, робота даного фермента в ендоплазматичному ретикулюмі неефективна. Утворення першого подвійного зв'язку у насичених жирних кислотах відбувається, головним чином, у хлоропластах. Для більш суттєвого впливу додаткового гена $\Delta 9$ десатурази на жирнокислотний склад ліпідів мембран, мабуть,

необхідне спрямування кінцевого продукту у хлоропласти, що можна здійснити шляхом введення послідовності відповідного сигнального пептида до Т-ДНК вектора. Однак має місце повідомлення щодо рослин тютюну, які стабільно експресували трансген *desC* із *S.vulcanus* після агробактеріальної трансформації і характеризувались підвищенням толерантності до холоду [321], хоча не було заявлено про наявність хлоропластного спрямування чужорідного білка. Ймовірно, зміни у складі жирних кислот цих рослин більш суттєві для них як рослин теплолюбних. Для ріпаку, можливо, вони повинні бути більш радикальними.

Таким чином, рослини з цільовим геном *desC* із *S.vulcanus*, в ядерний геном яких було інтегровано ще гени *bar*, *epsps*, *nptII* і *licBM3*, за культивування *in vitro* не проявляли достовірних відмінностей від контрольних рослин за такими показниками як накопичення біомаси, вміст сумарного розчинного білка і активність СОД. Експресія гена *desC* не підвищувала холодостійкості трансгенних рослин ріпаку.

Результати опубліковано в [31, 409].

6.3.2. Особливості рослин з геном *desC* за умов високотемпературного тесту. Високотемпературний стрес визначається як підйом температури до критичного рівня за період часу, достатній для настання незворотного пошкодження росту і розвитку рослин [459]. Висока температура листків уповільнює ріст і зменшує врожай.

Як показано раніше, існує позитивна кореляція між результатами тесту на толерантність до дії високих температур у лабораторних умовах і здатністю до росту у польових умовах на різних стадіях розвитку за підвищених температур [184].

У попередній главі (пункт 6.3.1) показано відсутність впливу експресії гена *desC* на холодостійкість рослин ріпаку. Можливо, експресія цього гена змінює реакцію рослин на дію підвищених температур.

Вивчення відповіді біотехнологічних рослин ріпаку на високотемпературний стрес проводили за умов кліматичної камери. Рослини висаджували у ґрунт (горщечки) і адаптували в умовах теплиці, потім у кліматичній камері вони росли протягом двох тижнів, після чого вивчали реакцію на тепловий шок (розд.2.3).

Для трансгенних рослин зафіксовано достовірно на 6% вищий відносний вміст води у листках ($93,68 \pm 0,82\%$ і $94,39 \pm 1,3\%$ у ліній 18b і 18b/25, відповідно) у порівнянні з нетрансформованими ($91,04 \pm 0,45\%$) (рис. 6.12). Підйом температури приводив до зменшення відносного вмісту води у всіх тестованих рослин на 8%-12%. Рослини трансгенної лінії 18b/25 зберігали відносний вміст води у листках вищим ($87,91 \pm 0,43\%$), ніж у контрольних рослин ($84,0 \pm 1,97\%$) під час високотемпературного стресу. Лінія 18b достовірно не відрізнялась за цим показником від нетрансформованих рослин ($81,42 \pm 0,93\%$).

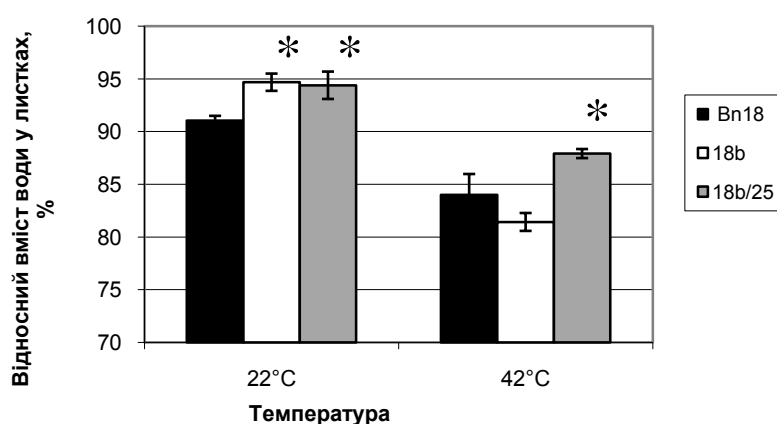


Рис. 6.12. Відносний вміст води у листках ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

За вмістом сумарного розчинного білка трансгенні рослини були подібні контрольним в умовах без стресу (рис.6.13).

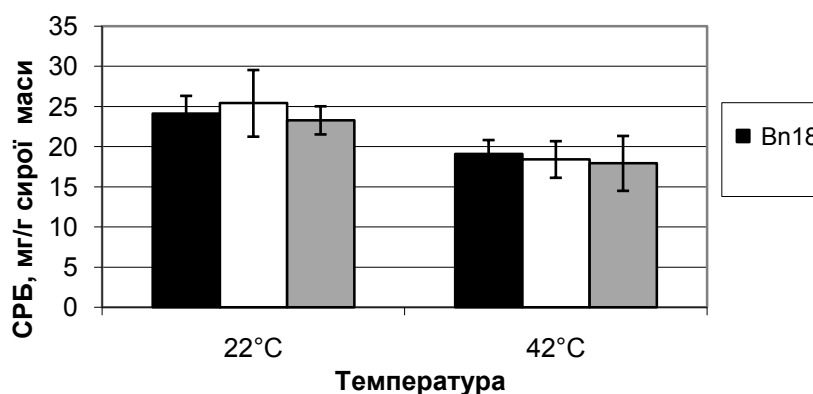


Рис. 6.13. Сумарний розчинний білок в екстрактах з листків ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Після підйому температури до 42°C не спостерігали достовірних відмінностей між рослинами з трансгеном *desC* і контрольними рослинами за цим параметром.

Вивчення вмісту фотосинтетичних пігментів (хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів) не виявило достовірних відмінностей між трансгенними і нетрансформованими рослинами ріпаку за нормальних умов у кліматичній камері (рис.6.14). Ситуація зберіглась і за умов температурного шоку, за виключенням достовірного підвищення вмісту хлорофіла *b* у трансгенних рослинах лінії первинних трансформантів 18b.

Вміст хлорофілів був достовірно вищим у рослин арабідопсиса, які експресували ген міо-інозітолмонофосфатази (*CaIMP*), що кодує літіум-чутливу фосфатазу нуту (*Cicer arietinum*) з широкою субстрат-специфічністю, порівняно з рослинами дикого типу і трансгенними рослинами, які експресували лише селективний ген *hpt* (ген гігроміцинфосфотрансферази) [388]. Ці рослини виявляли себе більш толерантними до дії високої температури (37°C протягом двох діб), ніж контрольні.

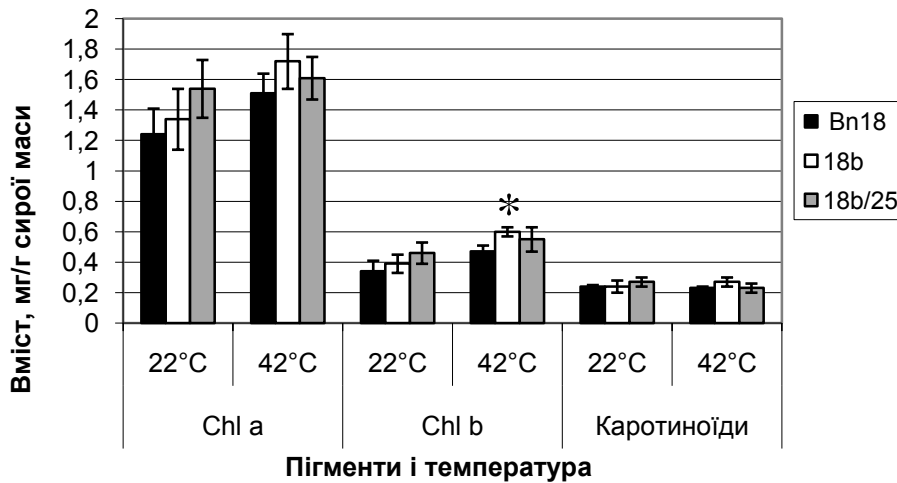


Рис. 6.14. Вміст фотосинтетичних пігментів в екстрактах із листків ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацилліпідну десатуразу *S.vulcanus*; Chl *a* і Chl *b* – хлорофіли *a* і *b*.

За температури 22°C співвідношення Chl *a*/Chl *b* було подібним у контролі (3,51) (рис.6.15) і трансгенних рослинах (3,48 і 3,44 для рослин ліній 18b і 18b/25, відповідно). Висока температура сприяла зниженню цього показника для всіх рослин до рівня 2,91-3,48.

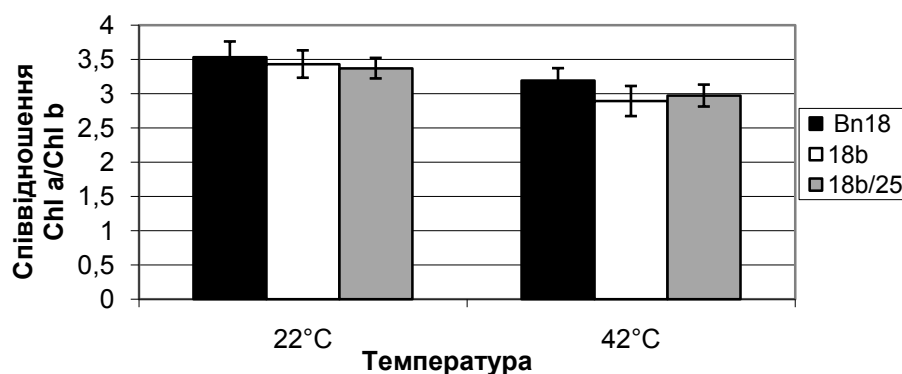


Рис. 6.15. Співвідношення хлорофілів в екстрактах із листків ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацилліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Не спостерігали відмінностей між трансгенними і контрольними рослинами за активністю СОД при температурі 22°C (рис.6.16). Підйом температури до 42°C спричинював зниження активності СОД у листках як нетрансформованих, так і трансгенних рослин.

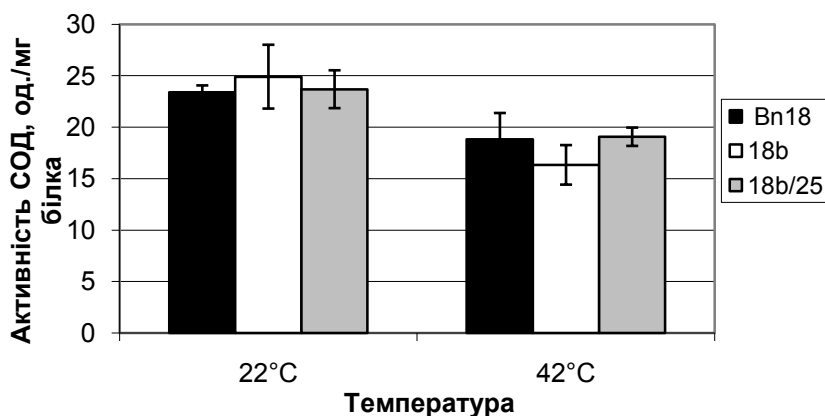


Рис. 6.16. Активність СОД у листках ріпаку з геном *desC* і контролі за умов високотемпературного стресу: Bn18 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують Δ⁹-ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Якісний склад жирних кислот у листках аналізованих біотехнологічних ліній не відрізнявся від такого у контрольних рослин (рис.6.17). У листках ріпаку детектували ліноленову (18:3), пальмітинову (16:0), лінолеву (18:2) і пальмітліноленову (16:3) кислоти.

Вміст ліноленової кислоти був схожим у листках контрольних (60,15±0,52 М%) і *desC* рослин (60,32±1,52 і 60,49±0,44 М% у ліній 18b і 18b/25, відповідно) за нормальної температури (рис. 6.17). Він достовірно зменшувався у стресових умовах у рослинах обох груп на 7%. Не спостерігали достовірної різниці у вмісті ліноленової кислоти у листках трансгенних (56,12±0,58 і 56,92±0,89 М% у рослин ліній 18b і 18b/25, відповідно) і нетрансформованих рослин (56,45±1,34 М%). Вміст ліноленової кислоти є найбільшим серед жирних кислот листків ріпаку. За умов високотемпературного стресу не спостерігали відмінностей між

контрольними і трансформованими рослинами ріпаку за вмістом основної жирної кислоти ліпідів листків.

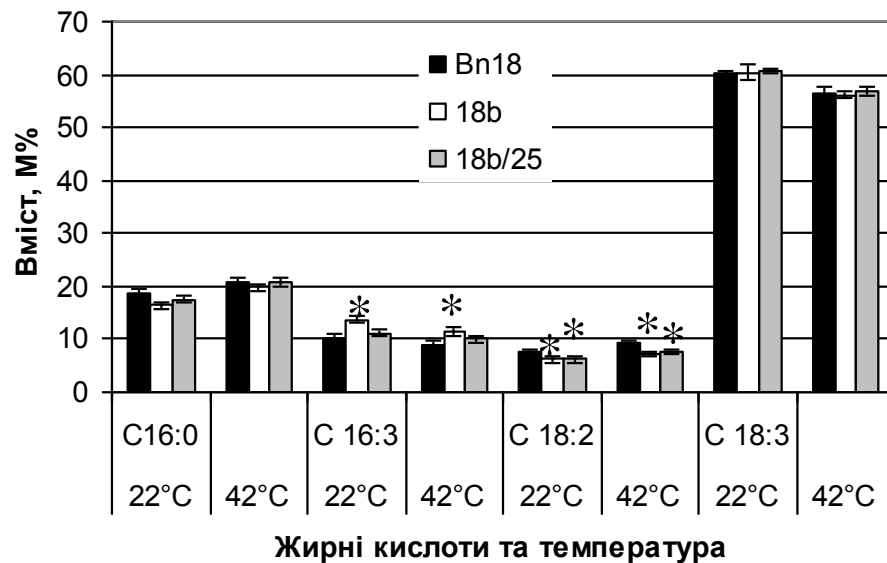


Рис. 6.17. Жирнокислотний склад ліпідів в рослинах ріпаку з геном *desC* до (температура 22°C) і після (температура 42°C) теплового шоку: Bn18 – контрольні, нетрансформовані рослини сорту Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують Δ 9-ацилліпідну десатуразу *S.vulcanus*. Похибка представлена як репрезентативне значення \pm стандартне відхилення і зірочка * показує достовірні відмінності між експериментальним значенням у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

Не було достовірних відмінностей між вихідними (18,52 \pm 0,99 М%) і трансгенними (16,52 \pm 0,64 і 17, 59 \pm 0,66 М% у рослин ліній 18b і 18b/25, відповідно) рослинами за вмістом пальмітинової кислоти за сприятливої температури (рис. 6.17). За підвищеної температури вміст C16:0 кислоти збільшувався як у контрольних, так і у біотехнологічних рослинах ріпаку з геном *desC* на 18-21%.

У первинних трансформантах лінії 18b вміст пальмітліноленої кислоти був вищим, ніж в контролі за температури 22°C (на 36 %) і 42°C (на 26 %). Не було достовірних відмінностей між вмістом цієї кислоти у листках нетрансформованих рослин (10,07 \pm 0,52 і 9,12 \pm 0,65 М%) і рослинами

першого покоління лінії 18b/25 ($11,4\pm 0,48$ і $10,01\pm 0,94$ М %) за обох температурних режимів (рис. 6.17).

Вміст лінолевої кислоти був вищим у нетрансформованих рослин ріпаку сорта Обрій за нормальної температури ($7,75\pm 0,92$ М%) і в умовах теплового шоку ($9,29\pm 0,87$ М%), ніж у біотехнологічних рослин з геном *desC* (рис. 6.17). Він залишався незмінним за температури 42°C у трансгенних *desC* рослин ($7,08\pm 0,65$ і $6,72\pm 0,58$ М %, відповідно) і зростав у контрольних на 20%.

Загальна кількість жирних кислот у листках рослин ріпаку з геном *desC* не відрізнялась від контрольних (рис. 6.18) при обох тестованих температурних режимах за виключенням збільшення на 15% у лінії 18b/25 за умов стресу.

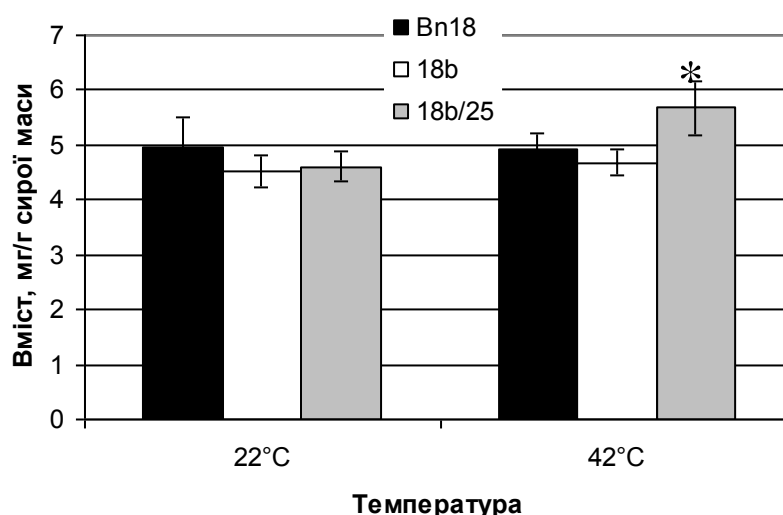


Рис. 6.18. Загальна кількість жирних кислот у листках рослин ріпаку з геном *desC* і контролі до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Індекс ненасиченості був схожим у листках контрольних і трансгенних рослин за нормальної температури (рис. 6.19), тільки у лінії 18b спостерігали підвищення на 0,04 %. Індекс ненасиченості знижувався як у рослин

контрольного сорту Обрій, так і у трансгенних рослин ріпаку, які експресували *DesC*, при тепловому шоці на 0,05% (рис. 6.19).

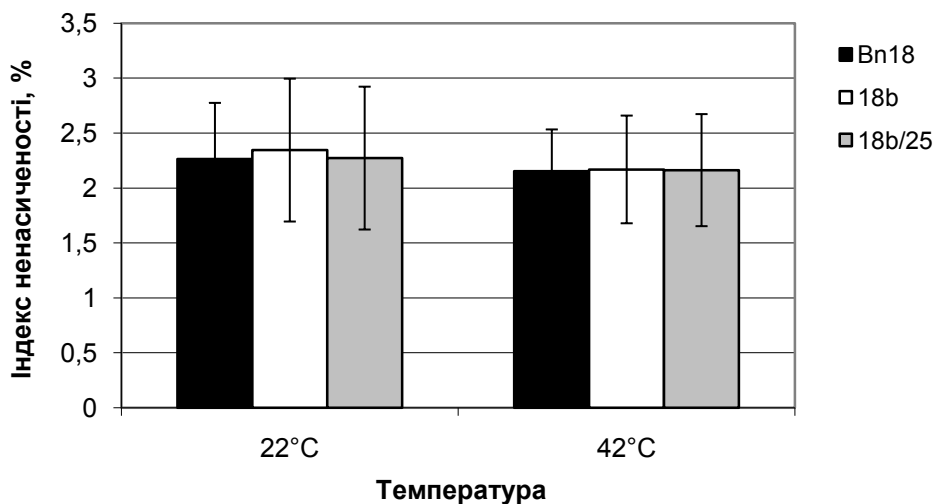


Рис. 6.19. Індекс ненасиченості мембранних ліпідів у листках рослин ріпаку з геном *desC* і контролі до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують Δ 9-ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Відомо, що рослини пустель характеризуються зменшеним рівнем ненасиченості ліпідів листків за високих температур [330]. У наших експериментах індекс ненасиченості був підвищеним у первинного трансформанта у порівнянні з контрольною лінією та трансгенними рослинами першого покоління за нормальних умов, а під дією високої температури відмінностей не показано. Таким чином, експресія гена *desC* не приводила до зменшення рівня ненасиченості мембранних ліпідів рослин ріпаку за умов високотемпературного стресу.

Контрольні рослини ріпаку і рослини з трансгеном *desC* демонстрували схожі зміни у кількості насичених (16:0) і триєнових (16:3 і 18:3) жирних кислот, загальному вмісті жирних кислот та індексі ненасиченості під час високотемпературного стресу.

Таким чином, гетерологічна експресія гена *desC* бактеріального походження у рослинах ріпаку за умов високотемпературного стресу не впливала на такі показники як відносний вміст води у листках, вміст фотосинтетичних пігментів і співвідношення хлорофілів, вміст СРБ, активність СОД, якісний і кількісний склад жирних кислот у листках та індекс ненасиченості мембранних ліпідів. Вона не надає переваг рослинам ріпаку за умов підвищених температур, але і не приводить до погіршення відповіді трансгенних рослин на високотемпературний шок.

Результати опубліковано в [372].

6.3.3. Рослини з геном *desC* за умов осмотичного стресу. Вивчення толерантності до осмотичного стресу проводили, вирощуючи верхівкові бруньки рослин ріпаку з трансгеном *desC* протягом двох тижнів у термальній кімнаті в пробірках Sigma з 5 мл рідкого безгормонального середовища MS, в яке перед автоклавуванням додавали відповідну кількість манітолу (100 мМ, 200 мМ, 500 мМ) для індукції осмотичного стресу (розд.2.2.2).

Виявлено достовірне зниження накопичення біомаси за умов осмотичного стресу (500 мМ манітолу) і у контрольних, і у трансгенних рослин (рис.6.20). Тенденція до зменшення біомаси у рослин ріпаку спостерігалась і за нижчих концентрацій манітолу, але достовірних відмінностей не спостерігали. Подібні результати отримано у наших експериментах щодо нетрансформованих рослин ріпаку сорту Марія (пункт 6.5.2). Однак для контрольних рослин сорту Магнат спостерігали достовірне зниження накопичення біомаси уже при концентрації манітолу, яка дорівнювала 50 мМ (розд.6.4). Це говорить про різну чутливість сортів ріпаку до осмотичного стресу, який виникає, наприклад, за умов посухи.

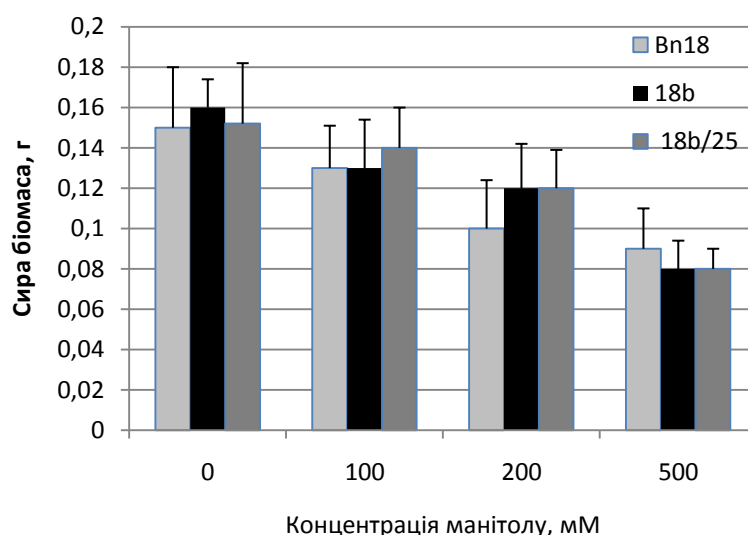


Рис. 6.20. Сира біомаса рослин ріпаку з геном *desC* і контрольних за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

На всіх тестованих рівнях осмотичного стресу не виявлено відмінностей за накопиченням сирої біомаси між трансгенними рослинами ріпаку, які експресують десатуразу С ($\Delta 9$) бактеріального походження, і нетрансформованим контролем.

У рослин пшениці з трансгеном *mtlD*, що кодує манітол-1-фосфатдегідрогеназу з *E.coli*, і трансгеном *bar* спостерігали зменшення біомаси в умовах осмотичного стресу, коли їх не поливали протягом 30 діб, на 40%, тоді як у рослин лише з трансгеном *bar* – на 70% [51]. Калюсні лінії пшениці з трансгенами *mtlD* і *bar* в умовах осмотичного стресу, індукваному додаванням ПЕГ (-1.0 МПа), накопичували біомасу, яка не відрізнялась від такої в умовах без стресу. В той же час у калюсних ліній з трансгеном *bar* накопичення біомаси зменшувалось на 40%. Кращу адаптацію до умов осмотичного стресу забезпечує рослинним лініям і рослинам експресія гетерологічного гена *mtlD*. Експресія гена *bar* не надає рослинам додаткових переваг за умов осмотичного стресу [51].

Вміст СРБ залишався стабільним у листках трансгенних і нетрансформованих рослин протягом росту на середовищах з різним осмотичним тиском (рис.6.21).

За умов без стресу різниці між контрольними і рослинами з трансгеном *desC* за вмістом СРБ не зафіксовано.

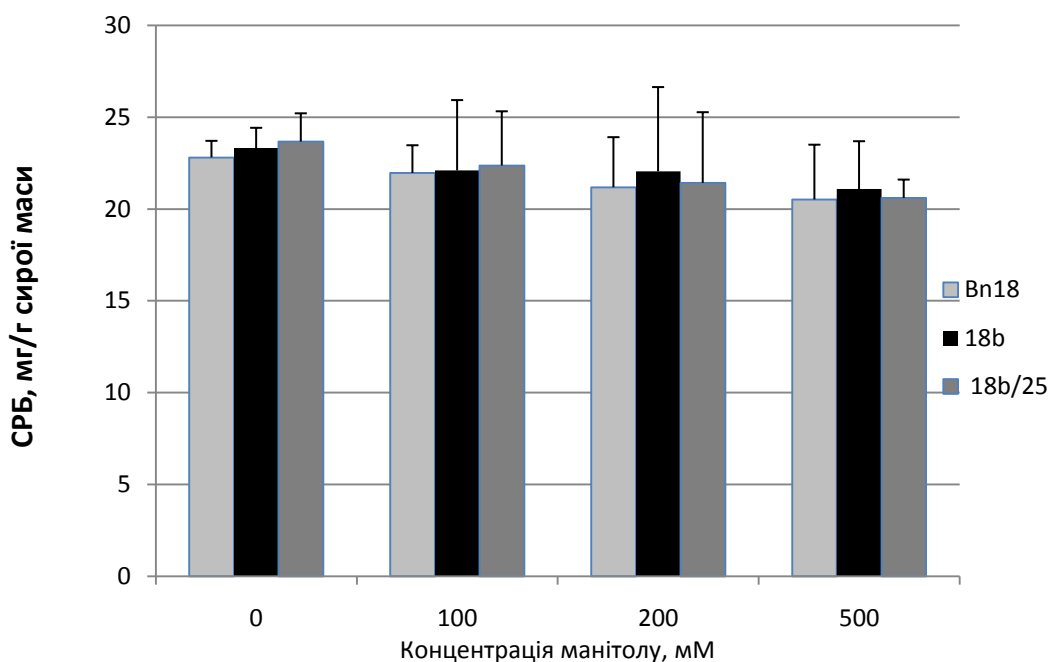


Рис. 6.21. СРБ у листках рослин ріпаку з геном *desC* і контрольних за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T₀ і T₁ покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

Активність СОД була подібна у контрольних і трансгенних рослин за умов без стресу (рис.6.22). Вона зростала до 40% у всіх рослин на середовищах із 100 мМ манітолом і залишалась без достовірних змін на середовищах із 200 мМ манітолом. Умови гіперосмотичного стресу (500 мМ манітолу) приводили до падіння активності СОД як у контрольних, так і у трансгенних рослин. Вона ставала до 50% нижчою, ніж була в умовах без стресу на початку експерименту.

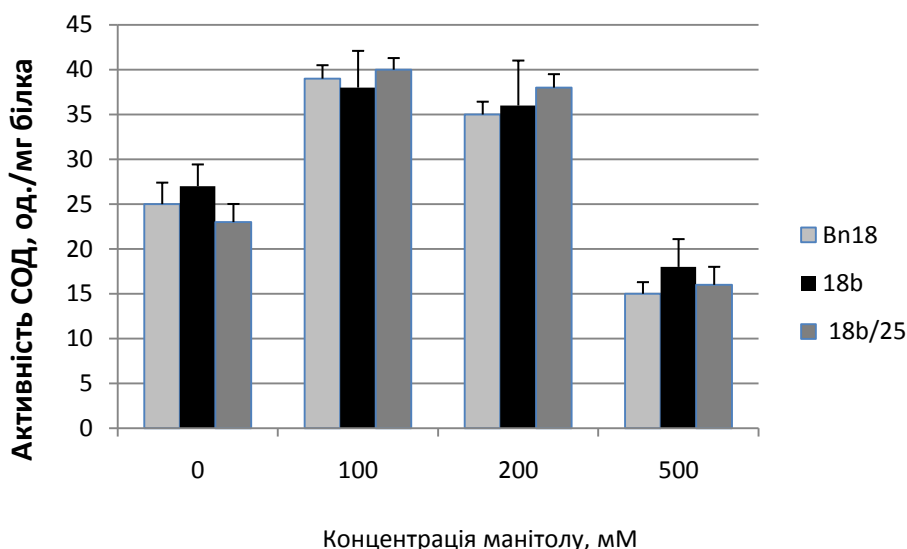


Рис. 6.22. Активність СОД у листках рослин ріпаку з геном *desC* і контролі за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом: Bn18 – нетрансформований контроль, сорт Обрій; 18b і 18b/25 – трансгенні рослини (T_0 і T_1 покоління, відповідно), які експресують $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу *S.vulcanus*.

В рослинах картоплі сорту Superior, які експресували у хлоропластах під контролем *SWPA2* промотору трансген *codA* з *Arthrobacter globiformis*, що кодує холіноксидазу, задіяну у синтезі гліцинбетаїну, спостерігали підвищену стійкість до водного дефіциту, індукованого ПЕГ, в порівнянні з нетрансформованими рослинами того ж сорту. Через дві доби стресу активність СОД в трансгенних рослинах була вища, ніж в контрольних, на 55%, через 3 доби – на 99%, через 1 добу після відновлення поливу – на 44% [98].

Експресія гена *OjERF* (фактор відповіді на етилен) із *Ophiorogon japonicus* під контролем 35S промотору ВМЦК в рослинах тютюну приводила до покращення росту в умовах відсутності поливу при рості в кліматичній камері. Динаміка змін активності СОД в залежності від тривалості стресу була такою: через 5 діб стресу активність СОД була вищою у трансгенних рослин порівняно з нетрансформованими на 63%, через 10 діб – на 70%, через 15 діб – на 50% і за 20 діб – на 360% [255].

Таким чином, рослини ріпаку з трансгеном *desC*, які крім цього гена мають і експресують ще гени *bar*, *nptII* і *licBM3*, не відрізнялись від нетрансформованих за накопиченням біомаси, вмістом СРБ і активністю СОД за умов осмотичного стресу. Введення цих гетерологічних генів бактеріального походження додатково не змінювало адаптивної пластичності рослин ріпаку, крім забезпечення стійкості до гербіцидів на основі РРТ.

Результати опубліковано в [40, 41, 371].

6.4. Рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини за умов осмотичного стресу

Для отриманих нами рослин ріпаку з геном альфа-2b інтерферону людини показано інтерференоподібну активність і збільшення активності СОД у порівнянні з нетрансформованими рослинами (розд.3.4 і розд.4) [373, 379]. У рослинах збільшена активність СОД часто пов'язана з підвищеною толерантністю до стресів різного походження, що дає змогу стійким сортам і рослинам, надекспресуючим *SOD*, продукувати більшу біомасу в порівнянні з чутливими сортами і нетрансформованими рослинами [184]. Ми також спостерігали збільшення біомаси проростків ріпаку, які розвивались без світла після намочування насіння в розчинах альфа-2b ІНФ людини (гл. 5.1) [369]. Сира маса проростків збільшувалась до 2,4 разів за рахунок сирої маси гіпокотилів. Фіксували збільшення СОД активності на 47%. Ми вважаємо, що підвищення активності СОД у тканинах зародка завдяки обробці насіння ріпаку розчинами ІНФ сприяло покращенню росту рослин. Метою даного дослідження було перевірити припущення, що рослини ріпаку з трансгеном *HuInf- α 2b* перевищують контрольні за фізіологічними показниками за нормальних умов і за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом, при вирощуванні *in vitro*. Для цього вивчали такі параметри як сира біомаса, вміст СРБ, вміст фотосинтетичних пігментів і активність СОД у трансгенних

рослин, які мали найвищі показники антивірусної активності екстрактів листків (розд. 3.5.2).

Сиру біомасу рослин ріпаку визначали за чотири тижні росту на агаризованих середовищах MS з додаванням манітолу (50 мМ) чи без нього. Сира маса трансгенних (Bn9/125/20 і Bn9/125/10) ліній була вищою за контроль (нетрансформовані рослини) на 18 і 20%, відповідно (рис.6.23).

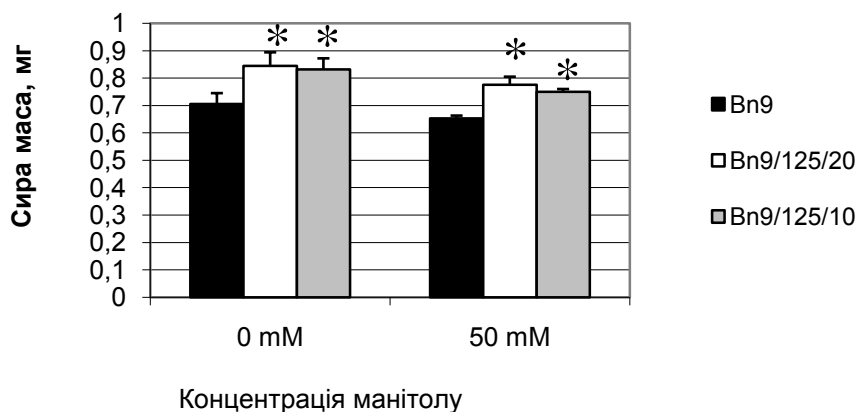


Рис.6.23. Сира біомаса рослин ріпаку за фізіологічних умов і за умов осмотичного стресу (50 мМ манітолу): Bn9 – нетрансформовані рослини, сорт Магнат, Bn9/125/20 і Bn9/125/10 – трансгенні лінії з геном інтерферона альфа 2b людини. *Похибка* представлена як репрезентативне значення \pm стандартне відхилення і *зірочка* * показує достовірні відмінності між експериментальним значенням у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

За умов водного дефіциту, індукованого манітолом, зменшення сирої маси на 8-11% було відмічено для всіх тестованих груп рослин. Однак сира маса залишалась достовірно меншою в контролі у порівнянні з трансгенними рослинами.

Вплив водного дефіциту на фізіологічні індекси, включаючи сирю масу рослин, залежить від виду рослин, стадії розвитку, глибини стресу і його тривалості [215, 459]. У наших експериментах введення гена *HuInf- α 2b* в рослини ріпаку позитивно впливало на здатність до накопичення ними сирої

маси за умов стресу і без нього. Лінії Vn9/125/10 і Vn9/125/20 продукували більшу біомасу, ніж нетрансформовані рослини.

Численні роботи демонструють схожі результати стосовно традиційних і трансгенних сільськогосподарських культур за умов нестачі вологи. Трансгенний ріпак, який надекспресував MnSOD3.1 пшениці, продукував більш життєздатні проростки і за нормальних умов, і за умов посухи у лабораторії і в полі, ніж нетрансформовані рослини [184]. Експресія гена *IPT* (*ізонентенілтрансферази*) під контролем промотора SARK, що індукується дозріванням і стресом, не давала розвиватися провокованому стресом старінню і таким чином підвищувала толерантність до посухи у арахіса і в лабораторних, і в польових умовах [349]. Трансгенні рослини арахісу формували достовірно вищий урожай у порівнянні з нетрансформованими рослинами у польових умовах помірного водного дефіциту (50 і 29 г на рослину, відповідно), у той час як за нормального поливу не було достовірної різниці за врожайністю між трансгенними і вихідними рослинами (42 і 40 г на рослину, відповідно). Лінії м'якої пшениці з трансгеном *BetaA*, що кодує холіндегідрогеназу з *Escherichia coli*, менше потерпали від посухи, маючи більш довгі і товщі корені в порівнянні з нетрансформованими рослинами завдяки накопиченню гліцинбетаїну [192].

Рослини трьох аналізованих груп не відрізнялись за вмістом СРБ за фізіологічних умов ($20,13 \pm 1,1$; $20,0 \pm 1,2$ і $21,21 \pm 1,26$ мг/г сирої маси у контрольних і трансгенних рослин ліній Vn9/125/10 та Vn9/125/20, відповідно) (рис.6.24).

За умов осмотичного стресу вміст СРБ достовірно знижувався на 19% у нетрансформованих рослинах. Не спостерігалось зниження СРБ у трансгенних рослинах у порівнянні з ростом без стресу. Таким чином, трансгенний ІНФ попереджав зменшення вмісту СРБ в асептичних рослинах ріпаку за умов нестачі вологи.

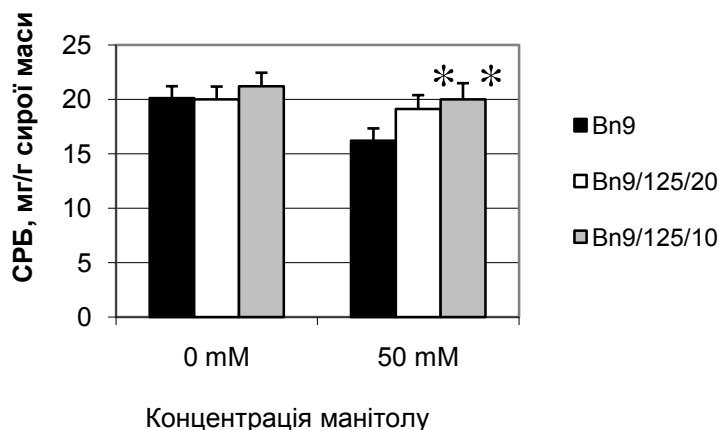


Рис.6.24. Вміст сумарного розчинного білка в екстрактах з листків рослин ріпаку за фізіологічних умов і за умов осмотичного стресу (50 мМ манітолу): Bn9 – нетрансформовані рослини, сорт Магнат, Bn9/125/20 і Bn9/125/10 – трансгенні лінії з геном інтерферона альфа-2b людини.

Рослини з трансгеном *HuInf- α 2b* характеризувались збільшеним вмістом фотосинтетичних пігментів за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу (рис.6.25).

За умов осмотичного стресу вміст Chl *a*, Chl *b* і каротиноїдів збільшувався для всіх аналізованих рослин і був вищим у трансгенних рослинах, ніж у контрольних. В умовах водного дефіциту вміст Chl *a*, Chl *b* і каротиноїдів був на 83, 77, 54% нижчим у рослин дикого типу, ніж у трансгенних. За умов стресу вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин лінії Bn9/125/20 був схожим на такий у рослин, оброблених розчином відповідного інтерферону (рис. 6.25 і 5.8).

Зміни у кількості фотосинтетичних пігментів були знайдені у рослин ріпаку в наших експериментах за нормальних умов і за умов осмотичного стресу. Обробка екзогенним інтерфероном приводила до достовірного збільшення у вмісті хлорофілів і каротиноїдів у порівнянні з контролем в умовах без стресу. Ця закономірність зберігалась і за умов осмотичного стресу (розд.5.2). У трансгенних *HuInf- α 2b* рослинах ріпаку спостерігаються

зміни за вмістом фотосинтетичних пігментів, подібні до змін, які показані у ріпаку після обробки пагонів екзогенним ІНФ.

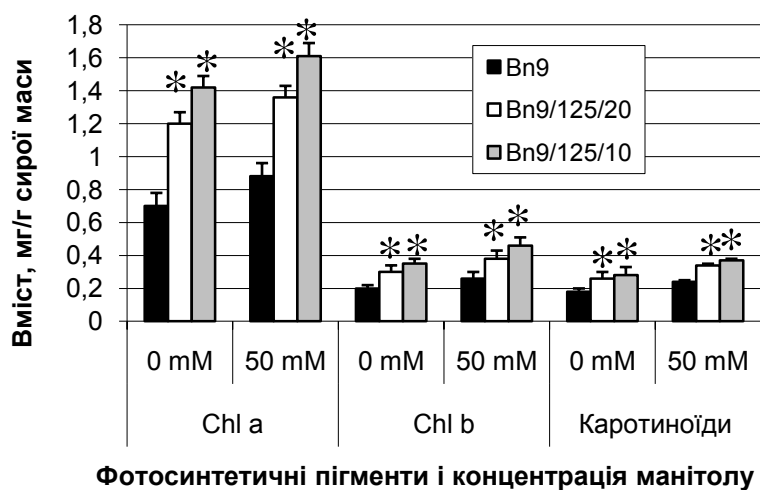


Рис.6.25. Вміст фотосинтетичних пігментів в екстрактах з листків рослин ріпаку за фізіологічних умов і за умов осмотичного стресу (50 мМ манітолу): Bn9 – нетрансформовані рослини, сорт Магнат, Bn9/125/20 і Bn9/125/10 – трансгенні лінії з геном інтерферону альфа-2b людини, Chl a і Chl b – хлорофіли a і b.

Підвищення вмісту хлорофілів спостерігали у трансгенних рослин арабідопсиса з експресією гена міо-інозітолмонофосфатази (*CaIMP*), що кодує літійум-чутливу фосфатазу нуту (*Cicer arietinum*) порівняно з рослинами дикого типу і трансгенними рослинами, які експресували лише селективний ген *hpt* (гігроміцинфосфотрансфераза), що надає рослинам стійкості до гігроміцина, в умовах осмотичного стресу (-0.5MPa), індукованого ПЕГ [388]. Подібну різницю у вмісті хлорофілів спостерігали у цих рослин і за нормальних умов росту. Рослини *Medicago truncatula*, що надекспресували власну тірозил-ДНК фосфодіестеразу-2, характеризувались підвищенням загального вмісту хлорофілів за фізіологічних умов і при осмотичному стресі на 16-21% і 35-42%, відповідно [105]. В той же час не спостерігали достовірної різниці у кількості хлорофілів у рослинах арабідопсиса,

надекспресуючих ген *GST* (*ThGSTZ1*), що кодує глутатіонтрансферазу із солестійкої рослини *Tamarix hispida*, і нетрансформованих рослинах до стресу. Однак трансгенні рослини мали достовірно вищий вміст хлорофілів, ніж вихідні рослини, за умов посухи і засолення [485].

Активність СОД була вищою в рослинах ріпаку з геном *HuInf-α2b* (Bn9/125/20 і Bn9/125/10) на 16 і 33%, відповідно, у порівнянні з контрольними в умовах без стресу (рис.6.26). За умов водного дефіциту збільшення активності СОД детектували у всіх групах рослин. Але СОД активність у трансгенних ($38,56 \pm 1,1$ од./мг білка у лінії Bn9/125/20 і $44,02 \pm 1,7$ од./мг білка у лінії Bn9/125/10) рослинах залишалась достовірно вищою, ніж в контролі ($33,07 \pm 2,6$ од./мг білка).

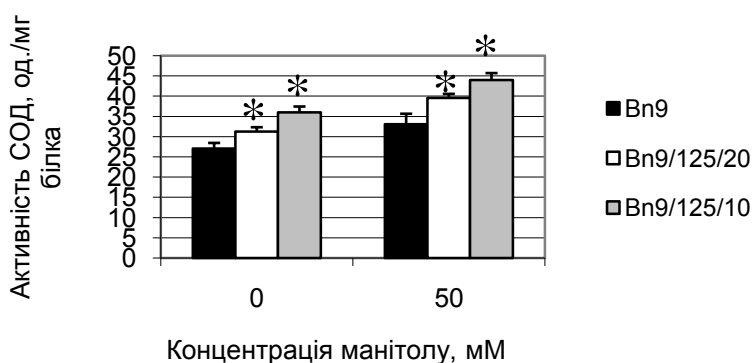


Рис.6.26. Активність СОД в екстрактах з листків рослин ріпаку за фізіологічних умов і за умов осмотичного стресу (50 мМ манітолу): Bn9 – нетрансформовані рослини, сорт Магнат, Bn9/125/20 і Bn9/125/10 – трансгенні лінії з геном інтерферону альфа-2b людини.

За осмотичного стресу рослини генерують активний кисень [343]. Ми розділяємо думку про те, що підтримання достатнього пулу антиоксидантних ферментів може бути механізмом для швидкої протидії росту осмотичного дисбалансу, який спостерігається за умов посухи і засолення.

Індукція збільшення активності СОД завдяки надекспресії генів *SOD* різного походження, так само як генів їх регуляції зазвичай веде до підвищення толерантності до водного дефіциту у контрольованих умовах лабораторії і в полі (розд.1.4). Ми показали збільшення активності СОД і у рослинах після обробки екзогенним ІНФ людини (розд.5.2), і у рослинах з геном *Huinf-α2b* за нормальних умов (розд.4) у порівнянні з контрольними. За умов осмотичного стресу, індукованого манітолом, збільшення активності СОД спостерігали у всіх групах рослин, однак у контрольних воно було менш вираженим. Схожими були зміни щодо активності СОД у трансформованих рослин ріпаку, що експресували *MnSOD* пшениці під контролем 35S промотору, у порівнянні з нетрансформованими [184]. В умовах без стресу активність СОД була до 41,8 % вищою у трансгенних рослин; у польових умовах за нестачі вологи деякі трансгенні лінії проростали раніше, ніж контрольні. Активність СОД зростала майже в 1,5 рази у рослинах арабідопсиса з геном глутатіон трансферази *GSTZ1* з солестійкого *Tamarix hispida* у порівнянні з нетрансформованими рослинами після шести діб стресу, спричиненого манітолом [485]. Автори вважають, що саме зростання здатності до протидії активним формам кисню за рахунок підвищення активності антиоксидантних ферментів (включаючи СОД) приводило до збільшення толерантності до осмотичного стресу [485]. Рослини *Medicago truncatula*, які надекспресували власну тірозил-ДНК фосфодіестеразу 2, були здатні продукувати на 10 % більше біомаси за нормальних умов і на 30 % більше – за умов осмотичного стресу у порівнянні з нетрансформованими. Крім того, вони характеризувались меншою кількістю пошкоджень ДНК і підвищеною регуляцією антиоксидантних ферментів (і СОД в тому числі) в умовах стресу [105]. Активність СОД зростала за посухи на 62 % у нетрансформованих рослин рису, але тільки на 13–31% у трансгенних рослин зі зниженою експресією гена *OsSAMDC* (S-аденозилметіонін декарбоксилаза) [96]. Це корелювало зі зменшенням висоти рослин, яке було відчутніше у трансгенних рослин. Посуха викликала

зниження активності пластидних Cu/ZnSOD-ферментів і збільшення активності пластидних FeSOD у трансгенних тополь (*Populus tremula* x *P. alba*, INRA 717-1B4), що експресували ген *GS1a* (цитозольна глутамінсинтаза сосни), у порівнянні з нетрансформованими рослинами [304]. Експресія гена *ZAT12*, що кодує C₂H₂ транскрипційний фактор з гірчиці *Brassica carinata*, приводила у рослинах томату до підвищення на 69% активності СОД за нормальних умов і дозволяла їм краще, ніж нетрансформованим, переносити умови посухи у теплиці [356]. У рослинах арабідопсиса, що експресували ген *TsRfBP* (рибофлавін-зв'язуючий протеїн), отриманий з черепахи *Trionyx sinensis japonicus* [126], збільшення біомаси завдяки підвищенню ефективності фотосинтезу за умов достатнього зволоження супроводжувалось підвищеною на 10% активністю СОД в листках. Збільшення активності СОД детектували у трансгенних тополь (*P. davidiana* x *P. bolleana*) з MnSOD із *Tamarix androssowii*, за фізіологічних умов (до 1,3 раз) і при засоленні (NaCl) (до 1,7 раз) у порівнянні з нетрансформованими [472]. Підвищення активності СОД в умовах без стресу на 22-27% зафіксували у рослинах тютюну з трансгеном *SgNCED1*, 9-цис-епоксікароtenoїддіоксигеназа (NCED) з *Stylosanthes guianensis* – ключовий фермент біосинтезу абсцизової кислоти у рослинах [501]. Це супроводжувалось зменшенням провідності продохів, інтенсивності транспірації, проникності мембран і приводило до покращення росту в умовах стресів, викликаних манітолом і засоленням. Експресія оксалатоксидази пшениці (*OxO*) у рослинах тютюну підвищувала активність антиоксидантних ферментів, включаючи СОД, за нормальних умов і в умовах стресів, індукованих метилвіолодженням (паракватом) і підвищеною інтенсивністю світла [461].

Ми вважаємо, що особливості проаналізованих трансгенних рослин ріпаку, які експресують ген *HuInf-α2b*, залежать від підвищення продукування в них супероксиду під впливом трансгенного інтерферону, що, в свою чергу, веде до росту активності СОД.

Ріст активності СОД спостерігали для проростків ріпаку після обробки насіння розчинами альфа-2b ІНФ людини за умов без стресу [369]. Також підвищення активності СОД за нормальних умов показано у трансгенних *HuInfa-2b* рослинах цикорію [245]. Зараз ми продемонстрували підвищення активності СОД і покращення ростових і біохімічних характеристик (сиря біомаса, вміст СРБ і фотосинтетичних пігментів) у рослин ріпаку, що мають трансген *HuInfa-2b*, які росли *in vitro* за нормальних і стресових (осмотичний стрес, зумовлений манітолом) умов.

Таким чином, показано позитивний вплив трансгенного ІНФ альфа-2b людини на ріст рослин ріпаку в умовах осмотичного стресу. Дві тестовані трансгенні лінії з найвищою інтерференоподібною активністю екстрактів тканин листка (розд.3.4) характеризувались здатністю до формування на 18-20% більшої біомаси за нормальних умов і в умовах осмотичного стресу у порівнянні з нетрансформованими; не відрізнялись від контрольних за рівнем СРБ в умовах без стресу і не знижували, як контрольні, накопичення СРБ в умовах осмотичного стресу; трансгенні рослини мали більший вміст фотосинтетичних пігментів і характеризувались підвищеною активністю фермента антиоксидантного захисту – СОД. Експресія гена ІНФ людини підвищує толерантність трансгенних рослин до осмотичного стресу та їх адаптивну пластичність.

Результати опубліковано в [407, 408].

6.5. Особливості рослин ріпаку з геном *sup11A1*

6.5.1. Проростання насіння за знижених і підвищених температур.

В якості аналізованого матеріалу було задіяне насіння другого покоління (T₂) чотирьох гомозиготних трансгенних ліній ріпаку, отримане в результаті самозапилення первинних трансформантів в умовах теплиці (розд.3.6).

Досліджували проростання за температур $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $+26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Протягом чотирьох діб оцінювали такі параметри, як схожість, маса проростків, довжина гіпокотилів і коренів, кількість сумарного розчинного білку, активність СОД. Для пророщування 50 насінин кожної лінії розкладали в чашці Петрі на зволоженому (5 мл дистильованої води) фільтрувальному папері і ставили в термостат. Проводили три незалежних експерименти.

Проростання насіння за температури $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ було уповільнено як у контрольній, так і у експериментальних ліній. За перші три доби проходило його набухання, на четверту добу спостерігали прокльовування, з'являлись корінці (~ у 60 % насінин) і поодинокі проростки.

У трансформованих рослин ріпаку, які експресували мітохондріальну MnСОД пшениці (Mn SOD3.1), спостерігали проростання і відмінності проростання між контрольною і трансгенними лініями при $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ [184]. Лінія 14-1, у якої активність СОД на 20% перевищувала активність контрольної лінії, проростала на 30% ефективніше. Схожість насіння лінії подвійних гаплотипів DH-12075, яку було взято для трансформації в цих експериментах [184], на третю добу при $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ сягала 60 %.

Схожість насіння вихідного для наших дослідів з трансформації ріпаку сорта Марія на четверту добу при $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ дорівнювала 1 %. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що різна здатність до проростання трансгенних ліній з активними гетерологічними генами *MnSOD3.1* і *cup11A1* визначається особливостями взятого для трансформації вихідного матеріалу.

Оптимальна температура для проростання ярого ріпаку дорівнює $14\text{--}17\text{ }^{\circ}\text{C}$. За температури $+26\text{ }^{\circ}\text{C}$ вже на першу добу спостерігали 100 % прокльовування насіння в усіх аналізованих лініях (рис. 6.27).

Маса проростків збільшувалась на четверту добу до десяти разів у порівнянні із масою насіння (рис. 6.28). Вже на другу добу пророщування виявлено відмінності у накопиченні біомаси проростками контрольної і трансгенних ліній (рис. 6.28, 6.29).

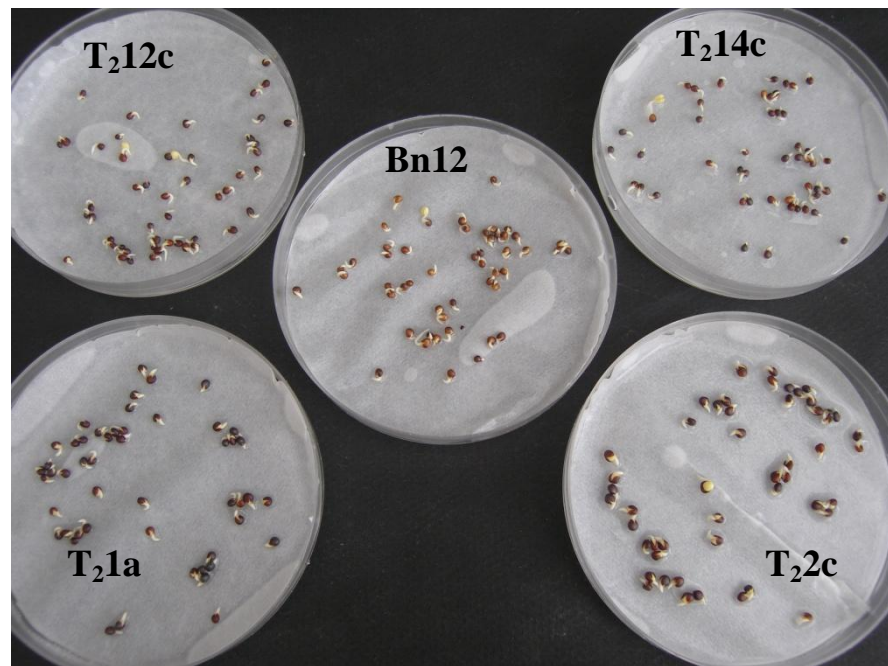


Рис. 6.27. Прокльовування насіння ріпаку на першу добу проростання за температури $+26^{\circ}\text{C}$: Bn12 - вихідний сорт Марія; трансгенні лінії T₂12c, T₂14c, T₂1a і T₂2c.

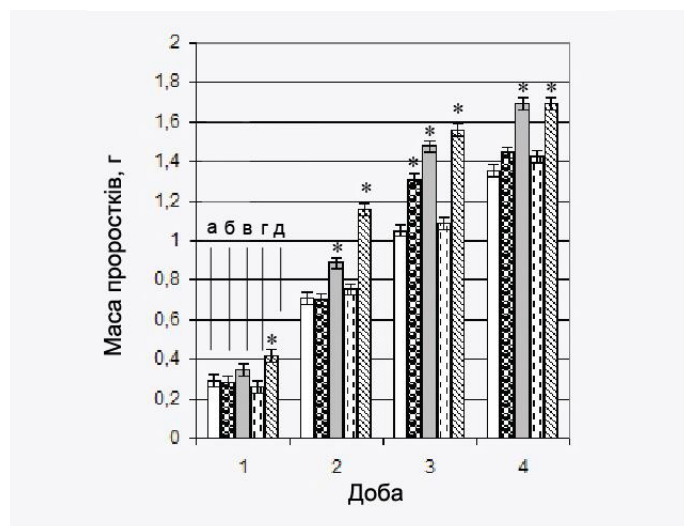


Рис. 6.28. Динаміка змін маси контрольних і трансгенних проростків: а – Bn12(к), контроль; б, в, г, д – біотехнологічні лінії T₂12c, T₂1a, T₂14c, T₂2c. * – відмінності достовірні за $p < 0,05$.

Проростки ліній T₂14c і T₂12c розвивались однаково з контрольними. Перевищення маси проростків ліній T₂1a і T₂2c над контрольними

дорівнювало на другу добу 25% (T₂1a) і 63% (T₂2c), на третю – 48% для обох ліній. На четверту добу пророщування темпи росту даних трансгенних ліній уповільнились, але маса проростків залишалась вище контрольних в 1,25 разів. Таким чином, за підвищеної (+26°C) температури спостерігали відмінності у накопиченні біомаси як між проростками контрольної і трансгенних, так і між проростками трансформованих ліній.

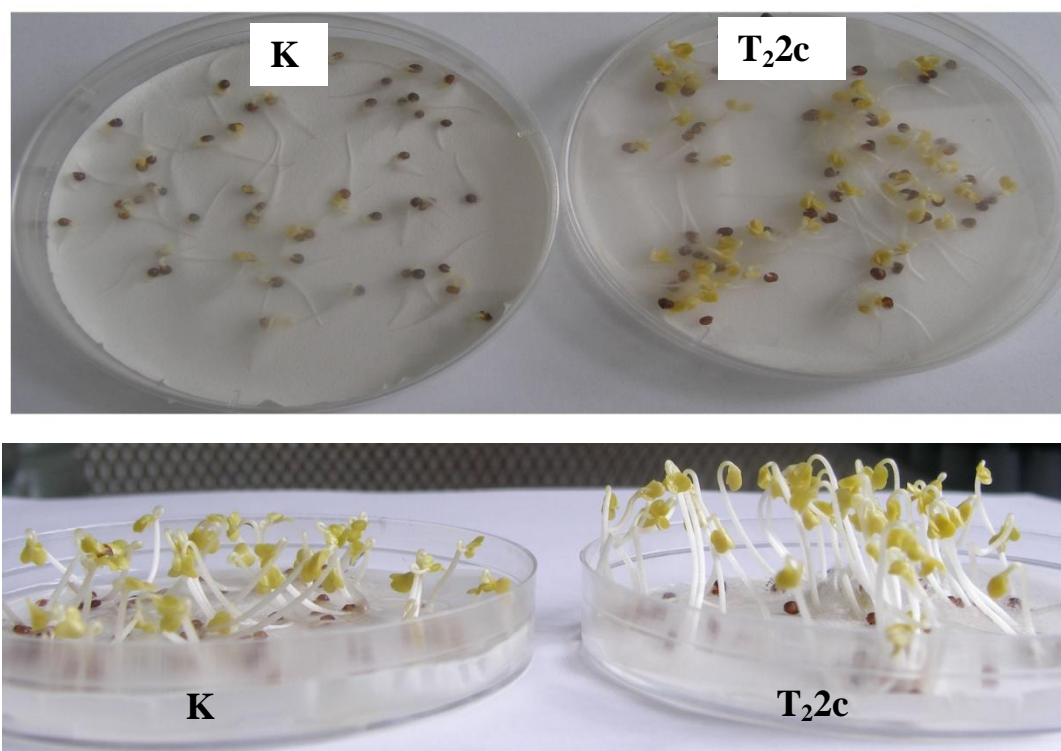


Рис. 6.29. Проростання насіння контрольної (К) і трансгенної лінії T₂2c за температури 26°C: А – друга доба, Б – четверта доба.

Цікаво відмітити, що збільшене накопичення біомаси характерно і для трансгенних рослин ріпаку, які експресували Mn SOD3.1 [184], і для трансгенних рослин конюшини з введеним геном Mn супероксиддисмутази, кінцевий продукт якого накопичувався або в мітохондріях, або в хлоропластах завдяки особливостям векторних конструкцій [298], і для трансформантів тютюну [39] і картоплі [19] з геном *sup11A1* цитохрома P450_{SCC}. Підвищену суху біомасу порівняно з контролем мали рослини

кукурудзи, які надекспресували власний ген *ZAR1*, ортолог гена *ARGOS1* арабідопсиса (*Auxin Regulated Gene involved in Organ Size*) [178].

Аналіз довжини коренів проростків показав, що на першу добу після початку пророщування відмінностей не спостерігалось (рис. 6.30). На другу добу довжина коренів контрольних рослин і лінії T₂12с дорівнювала 20±2 мм, у лінії T₂2с і T₂1а корені були довшими у порівнянні із контрольними у 1,5 і 1,75 рази, відповідно. Тенденція формування більш довгих коренів у трансгенних проростків у порівнянні з контрольними зберігалась до кінця експерименту. На четверту добу довжина коренів у проростків трьох біотехнологічних ліній (T₂14с, T₂12с і T₂1а) була вищою, ніж у контрольних проростків, на 25%. У лінії T₂2с перевищування сягало 50%. Збільшення довжини коренів свідчить про кращу пристосованість проростків трансформованих ліній до умов підвищених температур.

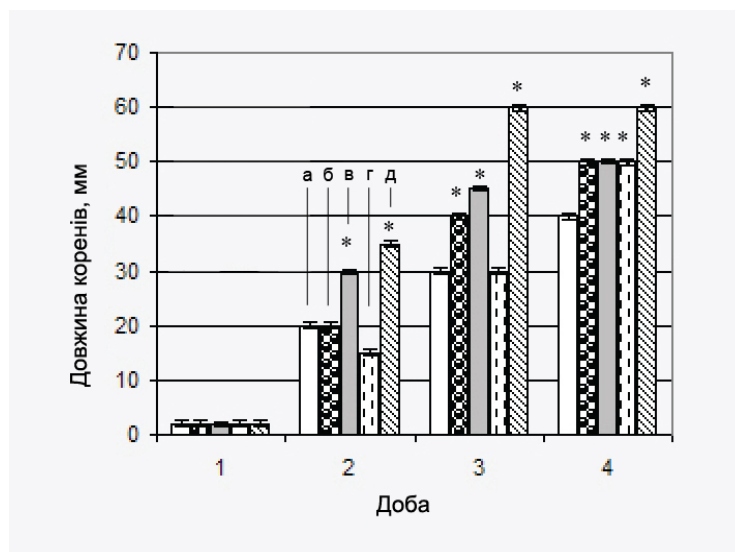


Рис. 6.30. Динаміка змін довжини коренів контрольних і трансгенних проростків: а – Vn12(к), контроль; б, в, г, д – біотехнологічні лінії T₂12с, T₂1а, T₂14с, T₂2с. * – відмінності достовірні за $p < 0,05$.

Трансгенні проростки формували гіпокотили, які були в 1,7 – 2,7 разів довші, ніж контрольні (рис.6.31). У 4-добових проростків як біотехнологічних, так і контрольної лінії темпи росту гіпокотилів уповільнювались. Однак гіпокотилі у трансгенних ліній були на 25%–85%

довшими, ніж у проростків контрольної лінії. Максимальним збільшенням довжини гіпокотилів на четверту добу пророщування характеризувалась лінія T₂2с.

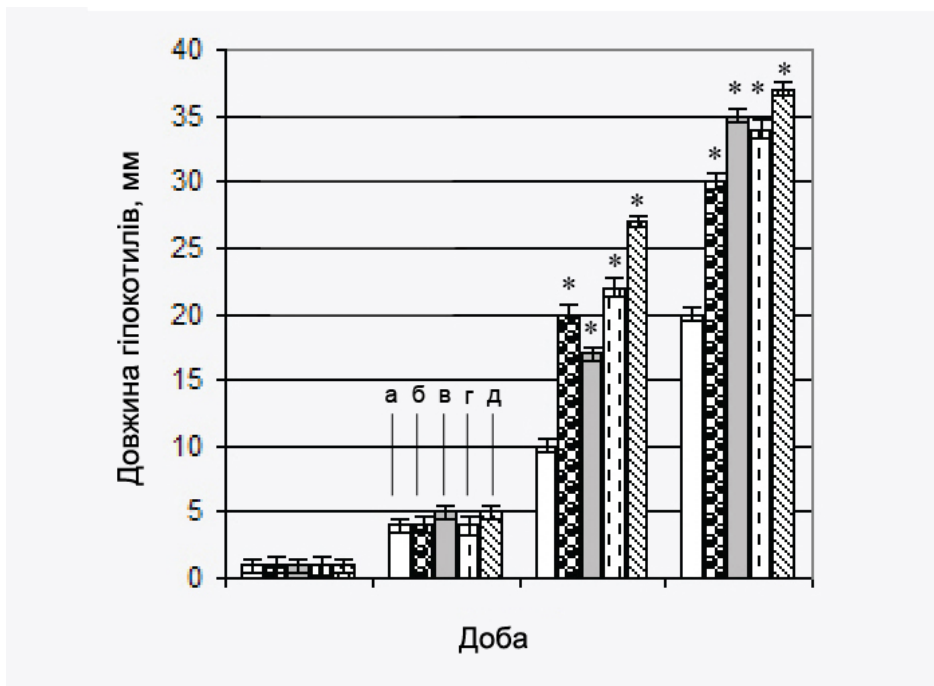


Рис. 6.31. Динаміка змін довжини гіпокотилів контрольних і трансгенних проростків: а – Вп12(к), контроль; б, в, г, д – біотехнологічні лінії T₂12с, T₂1а, T₂14с, T₂2с. * – відмінності достовірні за p<0,05

Таким чином, за фізіологічними характеристиками лінії T₂12с і T₂14с були близькі до вихідного сорту, а T₂1а і T₂2с значно перевищували контрольні за масою проростків, довжиною коренів і гіпокотилів.

Вміст СРБ у проростках при проростанні зменшувався (рис.6.32). Аналогічні результати отримані при аналізі проростання насіння двох різновидів редиса і ріпаку [508], а також гороху [130]. До кінця експерименту вміст СРБ у проростках контрольної лінії був наполовину меншим, ніж у проростках лінії T₂2с.

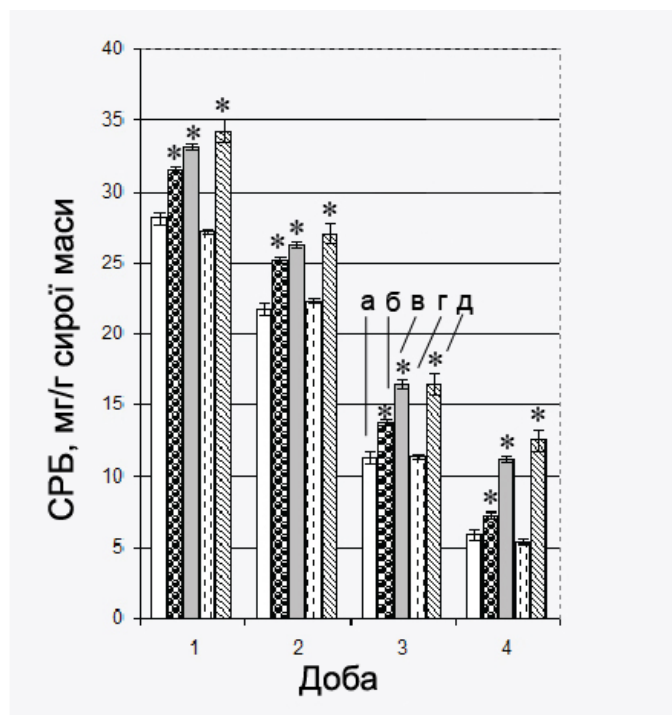


Рис. 6.32. Динаміка змін сумарного розчинного білка у контрольних і трансгенних проростків: а – Vn12(к), контроль; б, в, г, д – біотехнологічні лінії T₂12с, T₂1а, T₂14с, T₂2с. * – відмінності достовірні за $p < 0,05$.

Активність СОД визначали за методом фотоокиснення нітроблакитного тетразолію (розд. 2.15) (рис. 6.33). Активність СОД збільшувалась во всіх зразках при проростанні насіння при +26°C (рис. 6.3.1.8); при +8 °C вона не аналізувалась через практичну відсутність проростання за даної температури.

Збільшення активності СОД показано при проростанні насіння гороху [130] та його дозріванні [292]. Активність СОД в проростках ліній T₂1а і T₂2с у порівнянні з контрольними була вищою на 30% протягом усього експерименту. Ці лінії характеризувались і найбільшим приростом біомаси, довжиною коренів і гіпокотилів за підвищеної (+26 °C) температури. Тому їх можна вважати перспективними для подальшого вивчення як ліній, які можуть проявляти підвищену толерантність до пошкоджуючої дії високих температур не тільки на рівні проростків, але і на рівні цілої рослини.

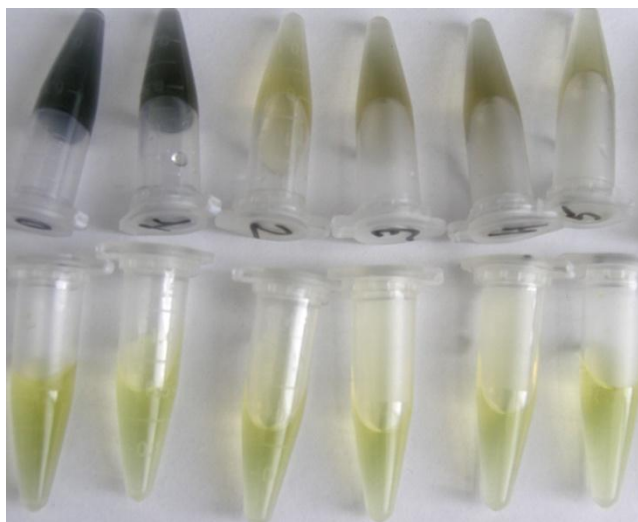


Рис. 6.33. Проби для визначення активності СОД: А – після реакції за дії світла, Б – до освітлення (0 – нульова проба, без рослинного екстракту, 1 – контроль, 2-добові проростки сорту Марія, 2 – 5 – 2-добові проростки трансгенних ліній T₂1a, T₂12с, T₂14с, T₂2с, відповідно).

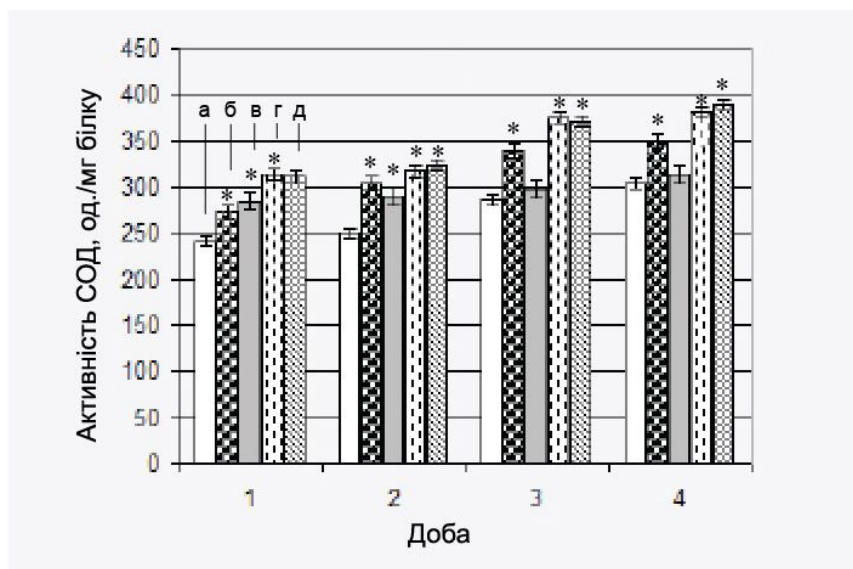


Рис. 6.34. Динаміка активності СОД у контрольних і трансгенних проростків: а – Vn12(к), контроль; б, в, г, д – біотехнологічні лінії T₂12с, T₂1a, T₂14с, T₂2с. * – відмінності достовірні за $p < 0,05$.

Рослини ріпаку, які експресували Mn SOD3.1 пшениці [184], демонстрували також стійкість до підвищених температур. Це підтверджено за допомогою визначення виходу електролітів і відносного виживання на

стадіях 3-4 та 5-6 листків. Вони характеризувались зменшеним вегетативним періодом – половина з них утворювала квітки на 7–14 діб раніше вихідної лінії. Подібні фізіологічні зміни зафіксовано і у роботі [39] з отримання трансгенних рослин тютюну з геном *cup11A1* цитохрома P450_{SCC} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, і в наших експериментах [27].

Цей факт разом з підвищеною активністю СОД у двох групах біотехнологічних рослин ріпаку та подібною відповіддю на вплив підвищеної температури дозволяє зробити висновок, що в наших експериментах введення гена *cup11A1* цитохрома P450_{SCC} має наслідки по впливу на активність СОД, які можна порівняти із введенням гетерологічного гена *MnSOD*.

Таким чином, показано, що за умов підвищеної температури насіння другого покоління двох з чотирьох аналізованих трансгенних рослин з геном *cup11A1* проростало краще, ніж насіння нетрансформованих рослин. Це підтверджено результатами вимірювання сирової біомаси, довжини коренів і гіпокотилів, вмістом СРБ у проростках і активністю СОД. На четверту добу пророщування в термостаті без світла проростки ліній T₂1a і T₂2c накопичували біомасу, яка була на 25% більшою порівняно з такою у контрольних проростків. Накопичення більшої біомаси супроводжувалось достовірно вищим зростанням активності СОД у цих проростків за умов стресу. Проростки ліній T₂ 12c і T₂14c не відрізнялись достовірно від нетрансформованих проростків сорту Марія за параметрами, що тестувались.

Результати опубліковано в [23, 24].

6.5.2. Підвищена стійкість до осмотичного стресу *in vitro*.

Матеріалом, що аналізували, слугували рослини ярого ріпаку сорту Марія (тип “00”, стійкість до посухи 8,8 бала за 10 бальною шкалою) селекції Національного аграрного університету УААН (контроль) і трансформанти другого покоління з геном *cup11A1* – рослини ліній T₂1a і T₂2c. Рослини

вирощували в умовах термальної кімнати (16 год (світло)/8 год (темрява) фотоперіод, температура +23°C) протягом двох тижнів у пробірках Sigma 25×150 мм (Sigmaxware™) з 5мл рідкого поживного середовища MS, в яке перед автоклавуванням додавали відповідну кількість манітолу (100 мМ, 200 мМ, 500 мМ) для моделювання осмотичного стресу (рис. 6.35).

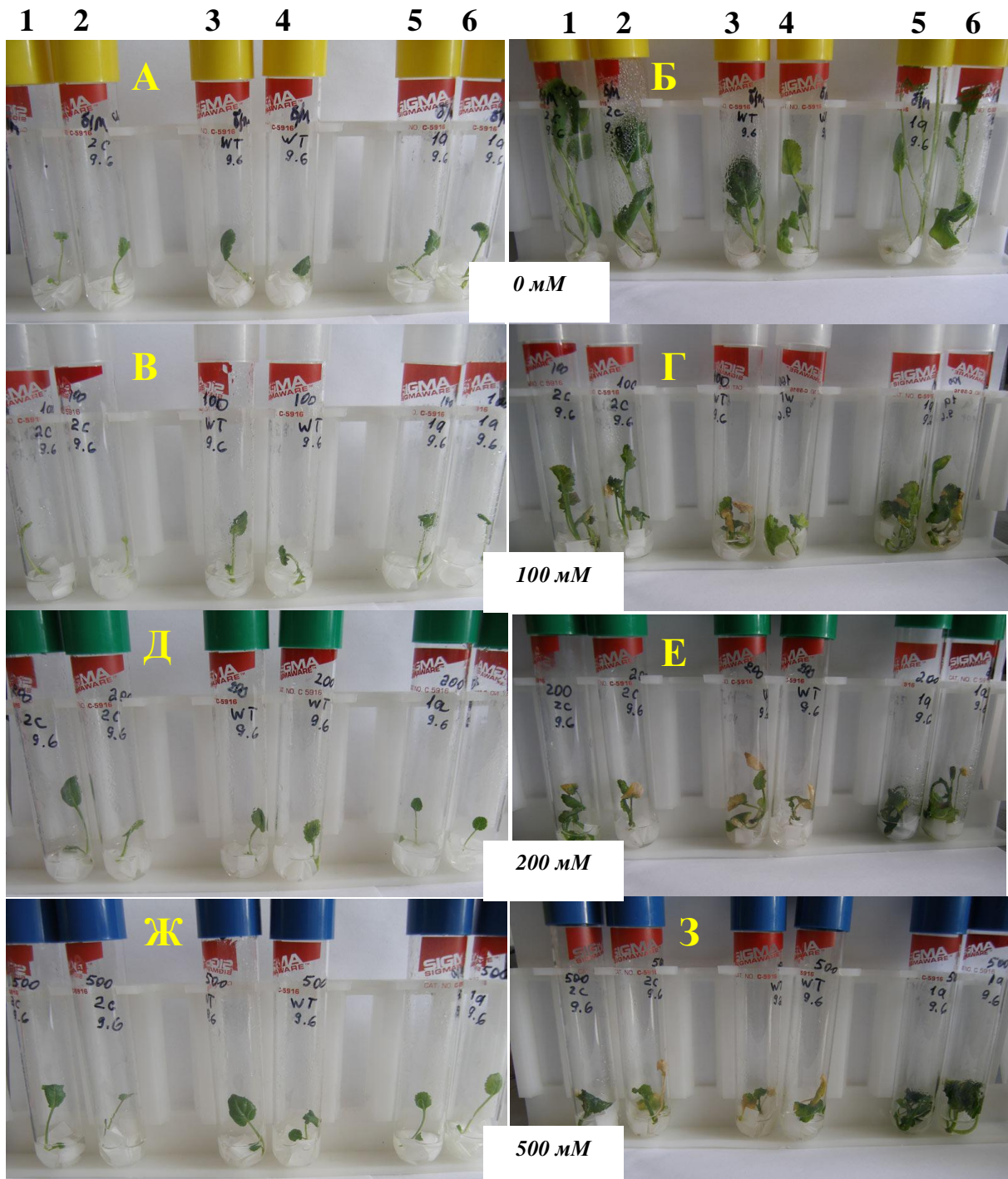


Рис. 6.35. Рослини ріпаку контрольної (3-4) і біотехнологічних (T_2c (1-2) і T_2a (5-6) ліній на початку (А, В, Д, Ж) і за два тижні (Б, Г, Е, З) росту на середовищах з манітолом у концентрації 0; 100 мМ; 200 мМ; 500 мМ).

Показано, що у варіанті без манітолу трансгенні лінії з геном *sur11A1* достовірно не відрізнялись між собою за біомасою. Однак вони перевищували контрольну за параметром, що аналізувався, на 30% (рис. 6.36).

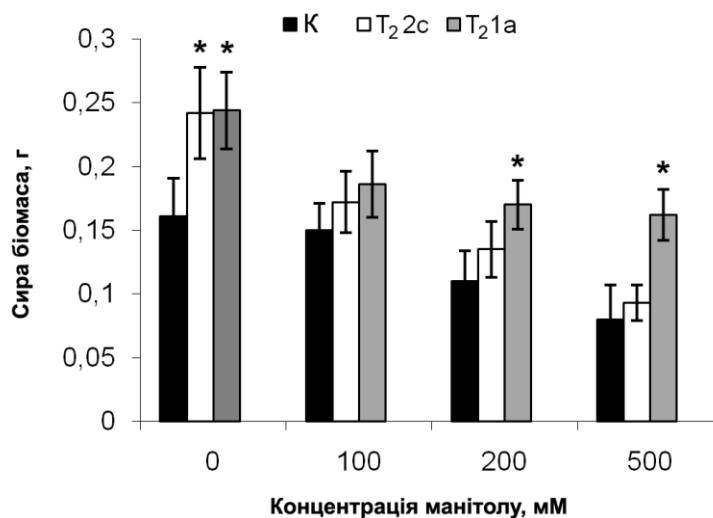


Рис. 6.36. Біомаса рослин ріпаку з геном *sur11A1* і контрольних рослинах в умовах осмотичного стресу, обумовленого манітолом: Вп12 – контрольна лінія, T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sur11A1*. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Введення манітолу у поживне середовище пригнічуюче діяло як на контрольні, так і на трансформовані рослини. За концентрації манітолу 100мМ значно (на третину) знижувалась продуктивність трансгенних ліній. Рослини з трансгеном *sur11A1* накопичували біомасу за цих умов, що дорівнювала біомасі контрольних рослин в умовах без стресу. Різниця між накопиченням біомаси протягом росту на середовищах із 100 мМ і 200 мМ манітолу була недостовірною. Збільшення вмісту манітолу до 500 мМ у середовищі культивування достовірно знижувало приріст біомаси у контрольної лінії у порівнянні з приростом біомаси на середовищах без манітолу. Трансгенні лінії також уповільнювали свій ріст за умов осмотичного стресу. Однак виділялась лінія T₂1a, у якої, хоча і знижувалась сира маса в порівнянні з такою на середовищі без манітолу на 33%, однак

приріст біомаси в умовах 500 мМ манітола в середовищі культивування ($0,162 \pm 0,02$ г) був схожим на приріст біомаси у контрольної лінії в умовах без стресу ($0,161 \pm 0,03$ г). Контрольна лінія знижувала сиру біомасу вдвічі в аналізованих умовах порівняно зростом в нормальних умовах.

Таким чином, рослини ріпаку лінії T₂1a з геном *sup11A1* зберігали здатність до накопичення біомаси за умов осмотичного стресу (500 мМ манітолу), яку можна порівняти з такою для контрольної лінії за умов без осмотичного стресу.

Здатність до накопичення більшої вегетативної біомаси за умов водного дефіциту може забезпечувати формування більшого врожаю насіння ріпаку за цих умов.

Трансгенний ріпак, що експресував вакуолярний Na⁺/H⁺ антипорт арабідопсиса *Arabidopsis thaliana*, формував меншу біомасу, ніж контрольні рослини, за умов низького засолення (10 мМ NaCl). За підвищеного рівня засолення (200 мМ NaCl) рослини продукували сиру масу та кількість насіння, подібну до таких у рослин вихідної лінії за умов низького засолення [494]. Рослини ріпаку, що їх поливали морською водою, зменшували накопичення сирової маси [249]. Також відмічали зменшення сирової маси рослин різних сортів рису *Oryza sativa* L. в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом [94]. Ріст (довжина і кількість листків) і відносний вміст води у листках шафрана (*Crocus sativus* L.) знижувався зі зменшенням доступної вологи [282]. Рослини чини посівної (*Lathyrus sativus* L.) менше потерпали від водного дефіциту, індукованого 20% ПЕГ 6000, ніж рослини чини запашної (*Lathyrus odoratus* L.). Вони накопичували більшу біомасу, акумулювали більше проліну і розчинних цукрів [212].

В експериментах [91] контрольні та селектовані стійкі до сульфату натрію калусні культури ріпаку сорту Westar вирощували на середовищах із манітолом, NaCl або Na₂SO₄. Показано, що для всіх варіантів експерименту ріст стійкого калусу, який оцінювали за сирою чи сухою масою, був кращим,

ніж ріст контрольного калюсу, хоча стійкий калюс також некротизувався за умов високого засолення.

Сира і суха маса трьох груп рослин рису, які експресували глютамінсинтазу, достовірно не відрізнялись від контрольних рослин за нормальних умов вирощування [86]. За обробки NaCl спостерігали достовірне зменшення висоти і сирої маси рослин з трансгенами *GSI;2* і *glnA* у порівнянні з контрольними рослинами дикого типу. У той же час не показано відмінностей між контролем і рослинами з трансгеном *GSI;1*. Схожі результати було отримано з трансформованими рослинами конюшини [322] і кукурудзи [288] з трансгеном *GSI* під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти, а також з рослинами рису, що експресували *GSI;1* під власним промотором [424], які не мали відмінностей за фенотипом при вирощуванні в умовах осмотичного стресу.

Лінії пшениці, які мали трансген *betA*, що кодує холіндегідрогеназу з *Escherichia coli*, менш потерпали від посухи, формуючи більшу біомасу за рахунок утворення коренів більшої довжини у порівнянні з нетрансформованими рослинами [192].

Рослини ріпаку з трансгеном *sup11A1*, тестовані у наших експериментах, демонстрували підвищене формування біомаси (до 30%) за відсутності осмотичного стресу *in vitro* та зменшували сиру масу в умовах стресу. Однак вони були здатні накопичувати біомасу, характерну для контрольної лінії, починаючи з нижчих концентрацій манітолу. Одна з аналізованих трансгенних ліній (T_21a) демонструвала здатність до продукування збільшеної сирої маси за умов підвищеного вмісту манітола в середовищі культивування (200 мМ і 500 мМ) у порівнянні з контролем. Наші дані свідчать про те, що експресія трансгена *sup11A1* тваринного походження впливає на здатність до накопичення біомаси рослинами ріпаку в умовах осмотичного стресу *in vitro*.

Визначення сумарного розчинного білка у листі ріпаку виконували за методом Бредфорда [83]. СРБ у рослинах ріпаку з геном *sup11A1* у

контрольному варіанті досліда був достовірно вищим, ніж у вихідної лінії. На середовищах з манітолом СРБ трансгенних ліній знижувався до рівня контрольних рослин. Подальше підвищення осмотичного тиску, спричинене манітолом (200 мМ і 500 мМ), не приводило до змін у кількості білка у контрольної і трансгенних ліній (рис. 6.37).

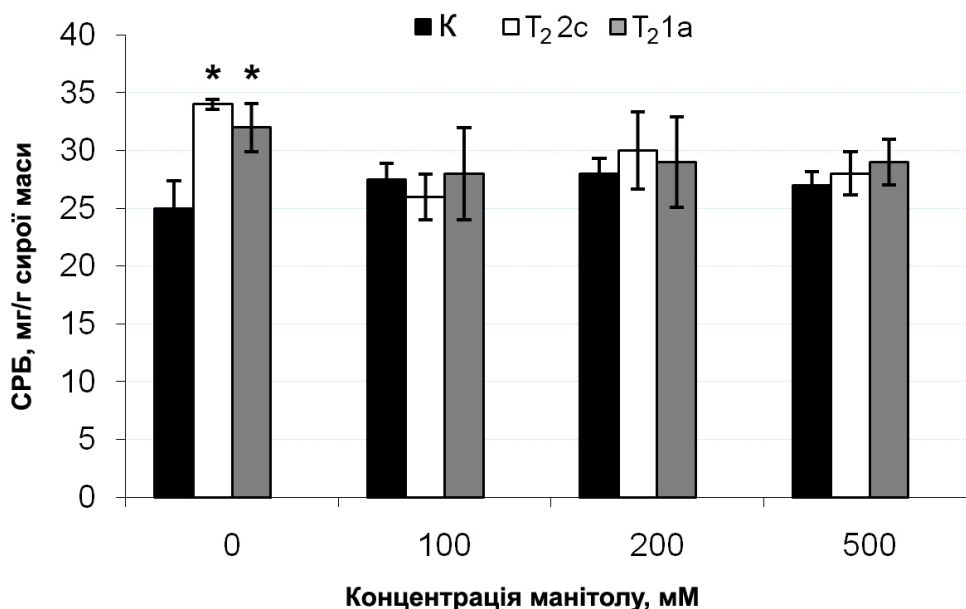


Рис. 6.37. Сумарний розчинний білок у листках рослин ріпак з геном *суп11А1* і контрольних рослинах в умовах осмотичного стресу, обумовленого манітолом: Vn12 – контрольна лінія, T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *суп11А1*. *- відмінності достовірні в порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Подібні спостереження були зафіксовані у дослідженнях впливу сольового стресу на вміст СРБ у листі ріпаку і було показано, що для двох сортів – солестійкого (Dunkeld) і солечутливого (Cyclon) – не спостерігалось змін у накопиченні СРБ, але для сорта Окарі відмічено зниження вмісту білка як у листі, так і у коренях за високого засолення [346]. Обробка листя рослин аскорбіновою кислотою за сольового стресу достовірно підвищувала вміст білка в листках і коренях [132].

Аналізовані нами рослини ріпаку з трансгеном *sup11A1* демонструють стабільне, на рівні контрольних рослин, накопичення білка в тканинах листків протягом росту в умовах осмотичного стресу *in vitro*.

Вочевидь, спрямованість змін або стабільність вмісту сумарного розчинного білка в умовах осмотичного стресу має залежність від виду і генотипу.

В експериментах з шафраном вміст білка підвищувався у цибулинах, листі і коренях за умов посухи. Передобробка абсцизовою кислотою зменшувала швидкість висихання протокормів і підвищувала стійкість до висушування [283]. СРБ знижувався з підвищенням засолення у листі *Bruguiera parviflora* [326], соняшника [350] і проростків ячменю [404]. Подібне спостерігали за умов водного дефіциту, індукованого поліетиленгліколем, у листі і коренях кукурудзи [303], а також у рослин гіссопа (*Vasopa monnieri* L.) під час осмотичного стресу, індукованого манітолом [121].

Визначення активності СОД проводили з використанням методу фотохімічного окиснення нітроблакитного тетразолія (розд.2.15).

Активність СОД у тканинах листа рослин ріпаку з геном *sup11A1* у варіанті досліду без осмотичного стресу була вище (до ~ 58 %), ніж у рослин контрольної лінії. За підвищення осмотичного тиску (до 100 мМ манітолу) вона суттєво збільшувалась у трансгенних ліній, особливо стрімко у лінії T₂2с (рис.6.38). При збільшенні вмісту манітолу у середовищі до 200 мМ активність СОД у трансгенних лініях дорівнювала активності у контрольних рослинах. При цьому вона починала помітно підвищуватися у лінії T₂1а.

Ця ж лінія виділялась і за підвищенням активності СОД за концентрації манітолу в середовищі, яка дорівнювала 500 мМ, хоча у інших ліній за цих умов активність СОД падала (рис. 6.38).

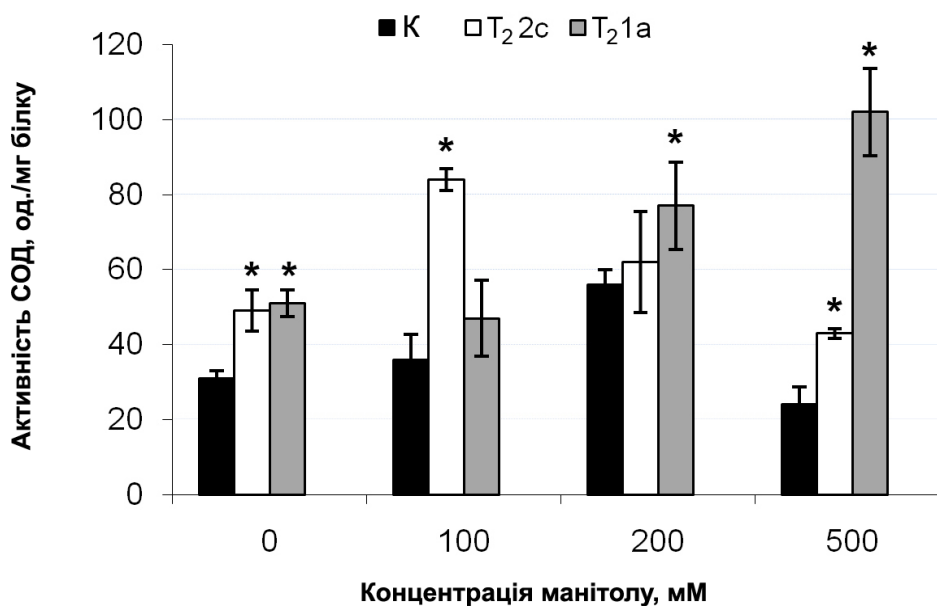


Рис. 6.38. Активність СОД у листі рослин ріпаку з геном *sup11A1* і контрольних рослинах в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом: Вn12 – контрольна лінія, T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sup11A1*. *- відмінності достовірні в порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Слід зазначити, що активність СОД у тканинах листа лінії ріпаку T₂1a за високого осмотичного тиску середовища (500 мМ манітолу) продовжувала рости, в той час як у інших вона падала після підвищення концентрації манітолу до 200 мМ. Рослини цієї лінії накопичували найбільшу біомасу за умов найбільш високого осмотичного тиску, що його застосовували в даних експериментах (рис.6.36). Схожу картину спостерігали і для проростків трансгенного арабідопсиса, що експресували цитозольну Cu/ZnСОД перстача (*Potentilla atrosanguinea*) [169] в умовах сольового (NaCl) стресу. Трансгенні рослини демонстрували підвищену стійкість до цього стресу протягом проростання, росту і розвитку проростків, утворюючи більш довгі корені, більшу площу розетки і більшу кількість листків, що супроводжувалось високими рівнями активності СОД.

Активність СОД підвищувалась або залишалась без змін на початку посухи, а потім знижувалась з посиленням водного дефіциту у проростках

пшениці (*Triticum*). В експерименті було задіяно дев'ять генотипів з трьома рівнями плоідності: гекса-, тетра- і диплоїди. Виявлено, що під час посухи активність СОД була схожою серед трьох тестованих груп рослин [499]. Показано, що пластиди коренів рослин культурного томату (*Lycopersicon esculentum*) відрізнялись від пластид дикого, стійкого до засолення, томату (*L.pennellii*) за умов сольового стресу зниженою активністю СОД, аскорбатпероксидази і гваяколпероксидази [302].

Активність СОД у цибулинах, листках і коренях шафрану достовірно підвищувалась за умов посухи і обробки абсцизовою кислотою, починаючи з 7-го по 46-й день експериментів [283]. Аналіз ферментативної активності показав, що загальна активність СОД підвищувалась до 41,8 % у трансгенних рослин ріпаку, що експресували 35S:SOD3.1 пшениці, у порівнянні з контрольною групою рослин. У польових умовах протягом періоду посухи деякі трансформовані лінії проростали швидше вихідних рослин [184].

Активність СОД зменшувалась у відповідь на водний дефіцит у мутантних і вихідних рослинах дикого типу пальчатника (*Cynodon dactylon* L. Pers. var. *dactylon*). Вміст неферментативних антиоксидантів у цих рослин підвищувався. Мутантні лінії характеризувались меншою висотою, вкороченими міжвузлями, коротшим листям у порівнянні з вихідними рослинами за умов достатнього водного забезпечення. За водного дефіциту всі три карликові мутантні лінії зберігали підвищений відносний вміст води, накопичували менше малонового діальдегіда і демонстрували менший вихід електролітів, ніж рослини дикого типу [273].

Активність СОД була найнижчою у проростків *Pterocarya stenoptera*, отриманих з насіння рослин, які вирости в провінції Китаю Hefeng, в порівнянні з активністю СОД у проростків з чотирьох інших провінцій [482]. Проростки з провінції Hefeng виявились найменш стійкими до посухи і заболочення.

Здатність до накопичення більшої біомаси протягом 5-добового водного дефіциту, індукованого 20% ПЕГ 6000, у рослин чини посівної

порівняно з рослинами чини запашної супроводжувалась достовірно вищою активністю СОД, каталази, аскорбат- і гваяколпероксидази [212].

Властива рослинам, у тому числі трансгенним або мутантним, підвищена активність СОД часто корелює з толерантністю до стресів різного походження. Рослини китайської капусти (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* сорт Tropical Pride), які експресували Cu/ZnСОД кукурудзи у хлоропластах, були більш стійкі до дії SO₂ і NaCl, ніж вихідні рослини. Фотосинтетична активність цих трансгенних рослин, в яких були активні одночасно два гетерологічних гена (супероксиддисмутаза Cu/ZnSOD і каталаза CAT), зменшувалась лише на 6% за умов високого засолення (200 mM NaCl) протягом 4 тижнів. У контрольних рослин вона зменшувалась на 72% за тих же умов [441]. Трансгенні рослини конюшини, які характеризувались зміненими рівнями активності СОД, демонстрували підвищену толерантність до низьких температур і посухи, накопичували більшу біомасу у польових умовах [298, 299, 384].

Рослини ріпаку з трансгеном *суп11А1*, тестовані у наших експериментах, характеризувались підвищеною активністю СОД (до 58 %) за відсутності осмотичного стресу *in vitro*. За умов стресу активність СОД зростала у більш чутливої до стресу лінії T₂2с при рості на середовищах з підвищеним осмотичним тиском (100 mM і 200 mM манітолу) та падала при більш високому осмотичному тиску (500 mM манітолу). У трансгенної лінії T₂1а спостерігали ріст активності СОД за умов найвищого осмотичного тиску, який застосовували в наших експериментах. Це поєднувалось зі здатністю формувати більшу біомасу за цих умов у порівнянні з контролем. Наші дані свідчать, що експресія трансгена *суп11А1* тваринного походження впливає на активність СОД у листі рослин ріпаку в умовах осмотичного стресу *in vitro*.

Результати опубліковано в [41, 42, 371, 381].

6.5.3. Ріпак з геном *sup11A1* за умов високотемпературного стресу.

Високотемпературний стрес визначається як підйом температури до критичного рівня за період часу, достатній для настання незворотного пошкодження росту і розвитку рослин [459]. Висока температура листків уповільнює ріст і зменшує врожай.

Вивчення відповіді біотехнологічних рослин ріпаку з гетерологічним цитохромом P450_{SCC} на високотемпературний стрес проводили за умов кліматичної камери. Рослини висаджували у ґрунт (горщечки) і адаптували в умовах теплиці, перед тепловим шоком їх переносили до кліматичної камери (розд.2.3).

Раніше ми показали, що активність СОД у трансгенних рослинах ріпаку була вищою, ніж у контрольних за оптимальних умов асептичної культури (розд. 4) [379, 380].

В умовах кліматичної камери вона була в 1,76 раз вищою у трансгенних рослин у порівнянні з контролем за температури 22°C (рис. 6.39). Активність СОД достовірно не змінювалась під час високотемпературного стресу у листках цих рослин (рис. 6.39).

Активність СОД зростала у контрольних рослинах на 18%, однак все ж залишалась нижчою, ніж у трансгенних рослинах. У наших експериментах з вивчення росту рослин ріпаку з трансгеном *sup11A1* в умовах осмотичного стресу *in vitro* було продемонстровано, що активність СОД лінії T₂1a була вищою контрольної за відсутності стресу і не змінювалась, коли середовище містило 100 мМ манітолу [371]. Після підвищення осмотичного тиску (додавання до середовища 200мМ манітолу) активність СОД у цієї лінії починала стрімко рости, у контролі вона теж зростала і ставала максимальною.

Активність СОД продовжувала підвищуватися у рослин лінії T₂1a, що вирощувались на середовищах з 500 мМ манітолу, у той час як активність СОД падала у контролі. Активність СОД, підвищена за нормальних умов у рослинах ріпаку *sup11A1*, дозволяла рослинам не сприймати пошкодуючі

умови як стрес і підтримувати якийсь час незмінними фізіологічні і біохімічні характеристики.

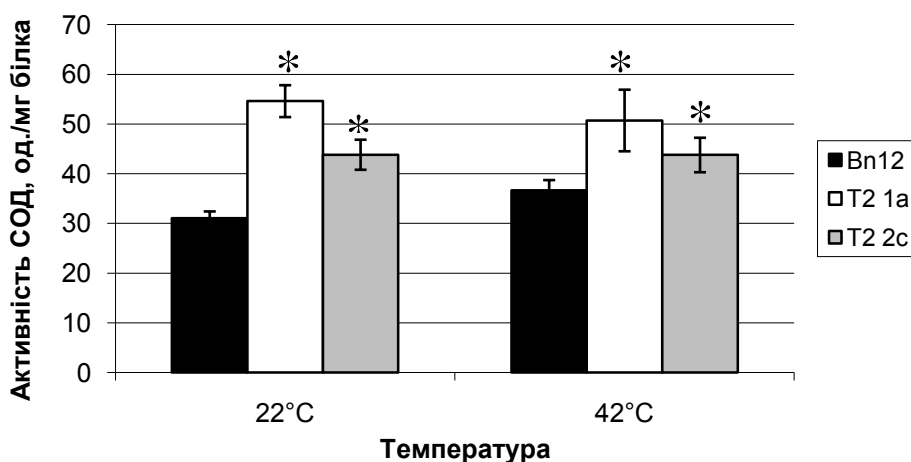


Рис.6.39. Активність СОД у листках ріпаку з трансгеном *sup11A1* і контрольних рослинах за умов високотемпературного стресу: Bn12 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Марія; T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sup11A1*. * - відмінності достовірні у порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Раніше на прикладі рослин бавовника (*Gossypium hirsutum*) показано, що притаманна кожному виду порогова пошкоджуюча температура залежить від СОД і глутатіонредуктазної активностей у рослинах [411]. За однакових умов росту термотолерантні рослини цієї культури мали достовірно вищу оптимальну і порогову пошкоджуючу температуру для квантового вихода фотосистеми II, а також вищу активність глутатіонредуктази, ніж термочутливі рослини. Автори зробили висновок, що підтримання достатнього пула антиоксидантних ферментів до високотемпературного стресу – це механізм швидкого подолання підвищення температури листків, що часто відбувається у польових умовах.

Високотемпературний стрес приводив до підвищення активності СОД як у нетрансформованих рослинах тютюну, так і у трансгенних рослинах з експресією бетаінальдегіддегідрогенази, але в останніх це підвищення було

більш значним [487]. Підвищена термотолерантність, індукована акумуляцією гліцин-бетаїна, пов'язана з підвищеною здатністю до відновлення фотосистеми II від фотоінгібування, яке спричинюється зростанням температури. Підвищена термотолерантність може бути зумовлена меншим накопиченням активних форм кисню у трансгенних рослинах.

Рослини арабідопсису з трансгеном *ThGSTZ1* (глутатіонредуктаза з *Tamarix hispida*) мали активність СОД на 42% вищу за умов сольового стресу (100 мМ NaCl) і на 51% – за умов дефіциту вологи, індукованого манітолом [485]. В рослинах томату сорту Moneymaker, які були трансформовані геном бетаїнальдегіддегідрогенази (*BADH*) з шпинату (*Spinacia oleracea* L.) під контролем промотору 35S промотору ВМЦК, активність СОД зростала на 14% під час теплового стресу (4 год при 42°C у кліматичній камері) в порівнянні з рослинами дикого типу. Це забезпечувало трансгенним рослинам більшу витривалість під впливом стресу і захист від оксидативного стресу [256].

Ми спостерігали, що підйом температури приводив до зменшення відносного вмісту води во всіх тестованих рослинах на 10-13% (рис. 6.40). Все ж трансгенні рослини мали достовірно вищий відносний вміст води під час високотемпературного стресу. Відносний вміст води також зменшувався за умов довготривалих (30 діб) посухи, високотемпературного стресу і поєднання двох типів стресу у рослин костриці лучної (*Festuca pratensis* Huds.) і тонконога лучного (*Poa pratensis* L.), і величина зменшення залежала від типу стресу та його тривалості [215]. Обидва види трав краще переносили високу температуру, ніж відсутність поливу та поєднання двох типів стресу.

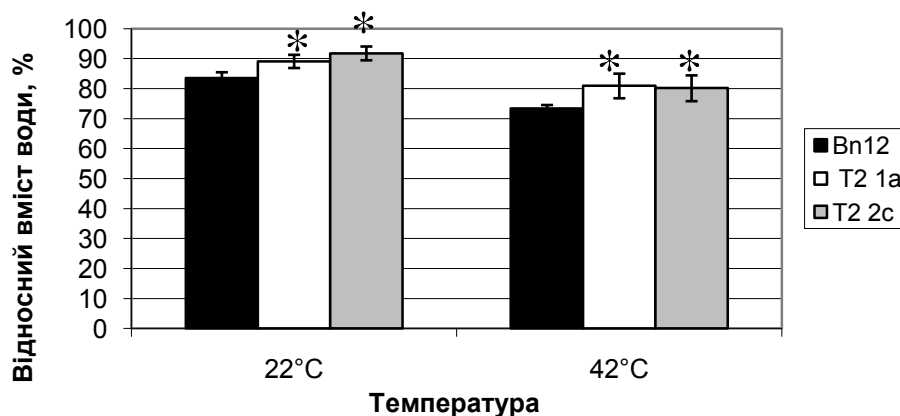


Рис. 6.40. Відносний вміст води у листках ріпаку з геном *sup11A1* і контрольних рослинах за умов високотемпературного стресу: Bn12 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Марія; T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sup11A1*. *- відмінності достовірні у порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Вміст хлорофіла *a* (Chl *a*) не відрізнявся достовірно у контрольних (1,05±0,12 мг/г сирої маси) і трансгенних (0,99±1,31 і 0,86±1,32 мг/г сирої маси у ліній T₂1a і T₂2c, відповідно) рослин за нормальних умов (рис.6.41). Він зростав під час високотемпературного стресу і у контрольних (1,53±0,08 мг/г сирої маси), і у трансгенних (1,31±0,13 і 1,32±0,1 мг/г сирої маси у ліній T₂1a і T₂2c, відповідно) рослин, але підвищення було більш значним у контрольних рослин. Вміст хлорофіла *b* (Chl *b*) був достовірно нижчим у рослин лінії T₂1a у порівнянні з контрольними і рослинами лінії T₂2c при вирощуванні за температури 22°C (0,26±0,01, 0,4±0,06 і 0,31±0,05 мг/г сирої маси, відповідно). За високої температури (42°C) не спостерігалось відмінностей між контрольною лінією і рослинами T₂2c, але відмічено зростання вмісту Chl *b* у лінії T₂1a (0,37±0,05 мг/г сирої маси) до рівня контролю (0,45±0,04 мг/г сирої маси).

Дослідження взаємозв'язку між вмістом хлорофілів і температурою та/або високою щільністю потоку фотонів виявило, що дуже низький вміст хлорофілів у сирійському ячмені знижує поглинаючу здатність листків, що, в

свою чергу, зменшує можливий пошкоджуючий вплив високої температури і високої інсоляції на зневоднені рослини [190].

Вміст хлорофілів підвищувався на 50% у рослин костриці лучної на шосту добу високотемпературного стресу (35°C вдень/30°C вночі в умовах кліматичної камери). До 18-ої доби відбувалось його зниження до рівня рослин, які культивувались за умов без стресу. На 24 добу стресу спостерігали зниження вмісту хлорофілів на 30%, ще шість діб стресу не впливали на вміст хлорофілів у цього виду трав [215]. Підвищення вмісту хлорофілів спостерігали за цих же умов і у рослин тонконога лучного. Воно було максимальним на шосту добу стресу, на 12-ту добу вміст хлорофілів дорівнював такому у рослин за відсутності стресу і починалось зниження вмісту цих пігментів, яке продовжувалось протягом наступних 16 діб експерименту [215].

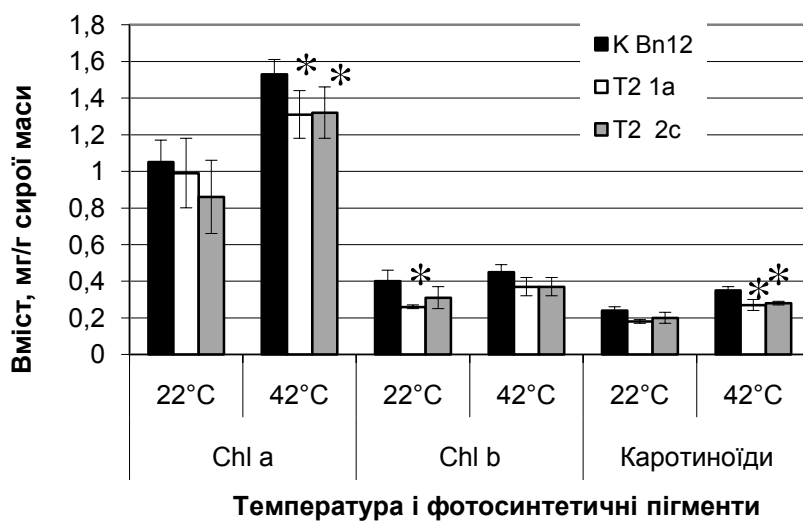


Рис. 6.41. Вміст хлорофілів і каротиноїдів у листках ріпаку з геном *sup11A1* і контрольних рослинах за умов високотемпературного стресу: Bn12 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Марія; T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sup11A1*. *- відмінності достовірні у порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Вміст каротиноїдів був вищим у контрольних листках ($0,24 \pm 0,02$ мг/г сирі маси) у порівнянні з трансгенними до стресу ($0,18 \pm 0,01$ мг/г сирі маси)

і $0,2 \pm 0,03$ мг/г сирої маси для T₂1a і T₂2c рослин, відповідно) (рис.6.41). Після підвищення температури він зростав достовірно во всіх тестованих рослинах, але більш відчутно це було у контрольних рослинах.

Співвідношення Chl *a*/Chl *b* було нижчим у контролі (2,63) за температури 22 °С (рис.6.42) у порівнянні з трансгенними (3,36 і 3,14 для T₂1a і T₂2c рослин, відповідно). Висока температура сприяла підвищенню цього показника для всіх рослин до рівня 3,45-3,57. Співвідношення каротиноїди/Chl (*a*+*b*) не змінювалось при змінах температур і не відрізнялось у контрольних і трансгенних рослин ріпаку (рис.6.42).

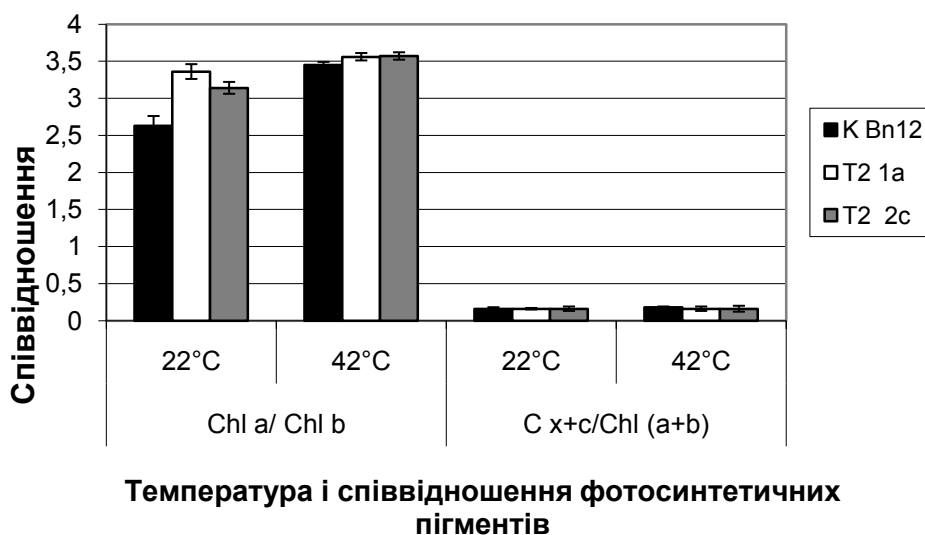


Рис. 6.42. Співвідношення між фотосинтетичними пігментами у листках ріпаку з геном *sup11A1* і контрольних рослинах за умов високотемпературного стресу: Bn12 – контроль, нетрансформовані рослини сорту Марія; T₂1a і T₂2c – лінії з трансгеном *sup11A1*; C_{x+c} – вміст каротиноїдів.*- відмінності достовірні у порівнянні з контролем за $p \leq 0,05$.

Підвищення вмісту хлорофілів і каротиноїдів протягом акліматизації до високої температури (39°C) спостерігали у рослинах ячменю сорта Plaisant [190], що приводило до того, що співвідношення каротиноїди/хлорофіл практично не змінювалось.

Високотемпературний стрес впродовж вегетативного росту приводить до багатьох фізіологічних і метаболічних змін, включаючи зміни в гормональному балансі і у активності антиоксидантних ферментів, модифікації у функціях мембран, в першу чергу, за рахунок змін у їх текучості [269]. Висока температура листків впливає на уповільнення росту рослин і зменшує врожай.

Якісний склад жирних кислот із листків аналізованих біотехнологічних рослин не відрізнявся від контролю (рис.6.43). У порядку зменшення кількості це ліноленова (18:3), пальмітинова (16:0), пальмітолеїнова (16:3), лінолева (18:2) і пальмітолеїнова (16:1) кислоти. Контрольні і біотехнологічні *sup11A1* рослини мали відмінності у кількісному складі жирних кислот в листках при вирощуванні за фізіологічної і високої температури.

Вміст ліноленової кислоти в листках рослин лінії T₂1a був незначно, але достовірно нижчим (56,28±1,47 М%), ніж в контролі (59,07±1,04 М%) при температурі 22°C (рис. 6.43). Він був схожим у нетрансформованих рослин і лінії T₂2c (58,48±1,61 М%). Вплив високої температури виявлявся у зменшенні вмісту ліноленової кислоти у контрольних рослинах на 2,43 М %, а у трансгенних рослин змін не зафіксовано.

Вміст С16:3 кислоти був схожим (~13 М %) у нетрансформованих і трансгенних рослинах за вихідної температури. Під впливом високої температури він не змінювався в контролі і зменшувався у біотехнологічних рослин на 31-33 М% (рис. 6.43). Зменшення вмісту триєнових кислот є передумовою для подолання пошкоджуючого впливу високих температур [201]. У результаті вивчення 13 різних потрійних *fad3-2 fad7-2 fad8* мутантів *Arabidopsis thaliana* було показано, що підвищена термотолерантність сильніше корелює з кількістю у листі 16:3 кислоти, ніж вмістом 18:3 кислоти, або із сумою 16:3 + 18:3; числом подвійних зв'язків у молекулі гліцероліпіда, або іншими показниками ненасиченості мембран [365].

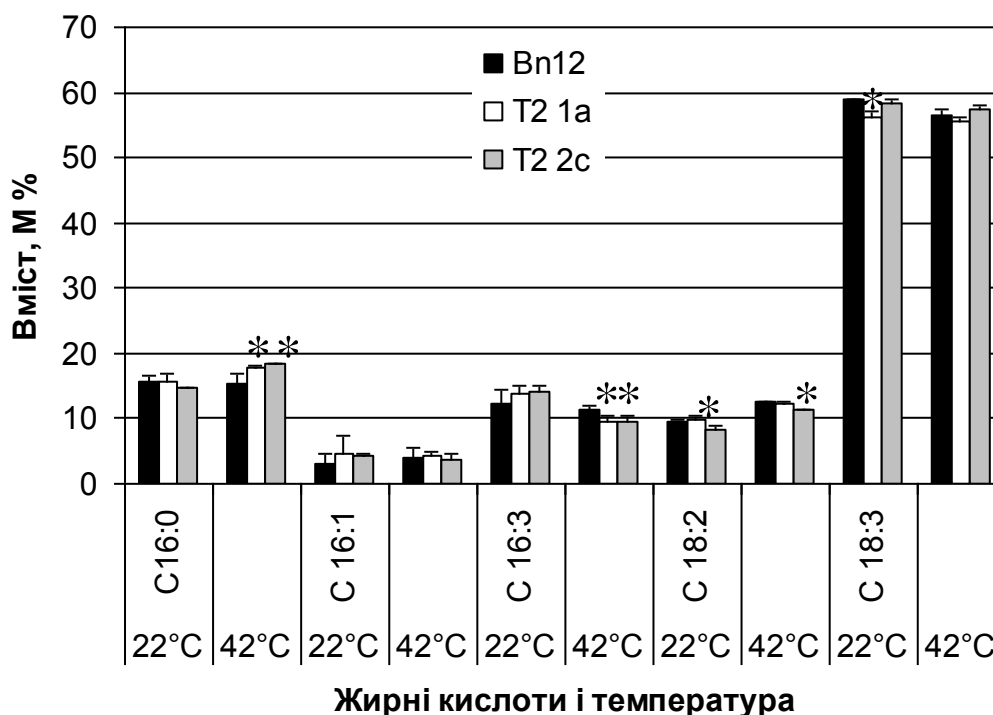


Рис. 6.43. Склад жирних кислот у ліпідах листків ріпаку до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: T₂1a і T₂2c – гомозиготні лінії *sup11A1* другого покоління, Bn12 – нетрансформований контроль, сорт Марія. Жирні кислоти – пальмітинова (C16:0), пальмітолеїнова (C16:1), пальмінліноленова (C16:3), лінолева (C18:2), ліноленова (C18:3). Похибка представлена як репрезентативне значення ± стандартне відхилення і зірочка * показує достовірні відмінності між експериментальним значенням в порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$).

Найбільш стійкі мутанти мали в своєму складі менш, ніж 2 % 16:3 у порівнянні з 12 % у рослин арабідопсиса дикого типу. Навпаки, вміст 18:3 кислоти серед цих ліній варіював між 0 і 54 %. Найбільш термочутливі лінії характеризувались вмістом 12–13% 16:3 і 37–48% 18:3 в складі їх ліпідів. Ступінь лінійної кореляції (r^2) між інактивацією фотосистеми II і вмістом 16:3 дорівнював 0,88, в той час як r^2 для вмісту 18:3 – тільки 0,37. Крім того, три мутанти арабідопсиса, дефектні за 16:3, мали підвищену термотолерантність у порівнянні з вихідними рослинами при 29°C [149].

За нормальної температури вміст пальмітинової кислоти не відрізнявся між контрольними і трансгенними рослинами (рис. 6.43). Під час стресу він не змінювався у контрольних рослинах сорту Марія і підвищувався на 12–19% у трансгенних рослинах, що свідчить за підвищену термотолерантність останніх [201, 269]. В потрійних мутантах *A.thaliana* (*fad3-2 fad7-2 fad8*), які не синтезували триєнові жирні кислоти, також показано підвищення вмісту пальмітинової кислоти під час високотемпературного стресу [365].

Вміст лінолевої кислоти за температури 22°C не відрізнявся в двох групах рослин, і під час росту в умовах високотемпературного стресу він зростав на ~24 % і в листках контрольного сорту Марія, і в листках трансгенних *sup11A1* рослин ріпаку (рис. 6.43).

Вміст пальмітолеїнової кислоти був на 31% нижчим у контролі у порівнянні з *sup11A1* рослинами при 22°C. Під час стресу він підвищувався у контролі до рівня трансгенних рослин. Вміст пальмітолеїнової кислоти залишався незмінним у рослинах ліній T₂1a і T₂2c за високої температури (приблизно 4M %).

Загальна кількість жирних кислот була достовірно нижчою на ~ 27 % у трансгенних листках, ніж у контролі за нормальної температури у кліматичній камері (рис. 6.44).

У результаті підвищення температури вона зменшувалась у контролі на 33%, в той же час не змінювалась у трансформованих *sup11A1* рослинах. За температури 42 °C загальна кількість жирних кислот у трансгенних рослинах на 20–25% перевищувала показник контролю.

Індекс ненасиченості був схожим у двох групах тестованих рослин за температури 22°C (рис. 6.45). Він залишався незмінним у контролі, але достовірно знижувався (на 0,05%) з 2,39±0,02 до 2,27±0,03 у біотехнологічних рослинах за високої температури.

У наших експериментах індекс ненасиченості був схожим у контрольних і трансгенних рослин за нормальних умов, в той час як під дією високої температури він достовірно знижувався у біотехнологічних рослин,

залишаючись незмінним у контрольних. Зниження індексу ненасиченості – одна з характерних особливостей термотолерантних рослин [201].

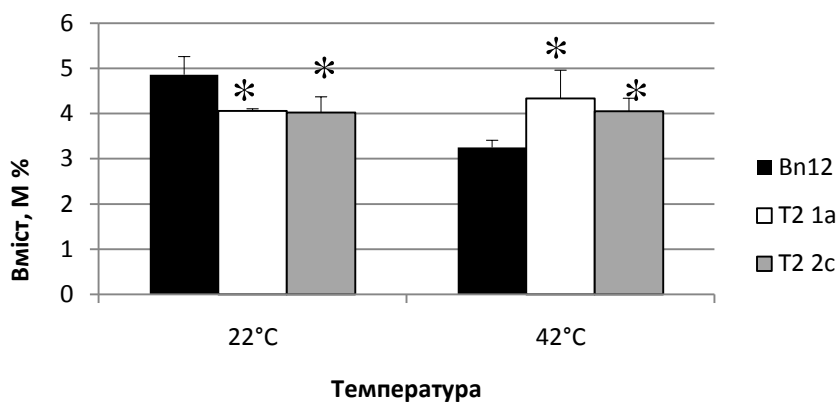


Рис. 6.44. Загальна кількість жирних кислот у листках рослин ріпаку до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: T₂1a і T₂2c – гомозиготні лінії *sup11A1* другого покоління, Bn12 – нетрансформований контроль, сорт Марія. Похибка представлена як репрезентативне значення ± стандартне відхилення і зірочка * показує достовірні відмінності між експериментальним значенням в порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

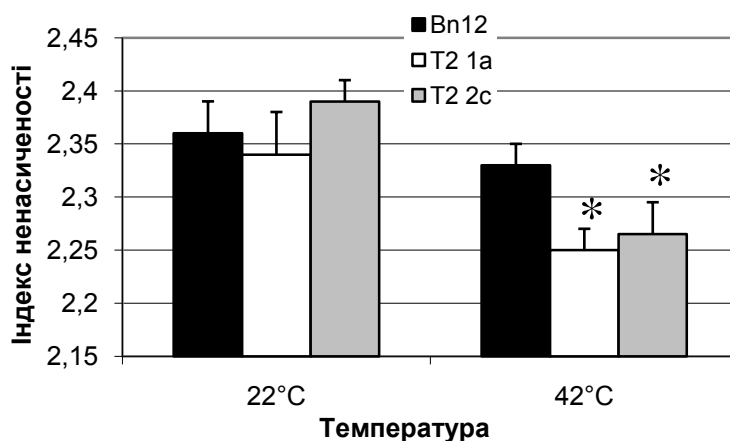


Рис. 6.45. Індекс ненасиченості мембранних ліпідів у рослинах ріпаку до (температура 22°C) і після (температура 42°C) високотемпературного стресу: T₂1a і T₂2c – гомозиготні лінії *sup11A1* другого покоління, Bn12 – нетрансформований контроль, сорт Марія.

Таким чином, конститутивна експресія трансгена *sup11A1* забезпечувала більш високий відносний вміст води у листі порівняно з контрольними рослинами під час високотемпературного стресу в кліматичній камері. Зниження вмісту пальмітолеїнової кислоти у листках і індекса ненасиченості разом зі збільшенням вмісту пальмітинової кислоти характерно для біотехнологічних рослин з трансгеном *sup11A1* у порівнянні з контролем. Активність СОД у трансгенних листках була на 76% вищою, ніж у нетрансформованих рослин, за температури 22 °С і не змінювалась за високої температури. Вміст Chl *a* і каротиноїдів збільшувався протягом стресу, причому підвищення було більш вагомим у контролі. Вміст Chl *b* залишався без змін за виключенням підвищення у трансгенної лінії T₂1a до рівня контролю.

Рослини *sup11A1* виявляють себе більш витривалими за умов високотемпературного стресу в кліматичній камері. Оскільки раніше показана кореляція між результатами високотемпературного теста [184], який ми провели, і толерантністю рослин до підвищених температур у польових умовах, можна сподіватись на підвищену толерантність рослин ріпаку з трансгеном *sup11A1* у порівнянні з нетрансформованими рослинами до дії високих температур при вирощуванні у полі. Ми вважаємо, що підвищена активність СОД, виявлена у наших трансгенних рослин, відіграє визначальну роль у біохімічних змінах рослинного метаболізму, які дозволяють їм набувати більшої стійкості, зокрема, до дії підвищених температур.

Результати опубліковано в [22, 370, 371, 372, 374, 375, 378].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Експерименти, результати яких представлені у даній роботі, були спрямовані на розробку протоколу генетичної трансформації однієї з важливих олійних культур в Україні і світі – ріпаку (*Brassica napus* L.); отримання низки трансгенних рослин з гетерологічними генами різного походження (бактеріальними – *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC*, *licBM3* і генами ссавців – *sup11A1* великої рогатої худоби і *HuInf- α 2b* людини) і аналізу змін фізіологічних і біохімічних параметрів створених рослин у порівнянні з контрольними для виявлення їх можливих переваг або недоліків за культивування як у сприятливих, так і стресових (осмотичний стрес, підвищена та знижена температури вирощування) в умовах. Тестування отриманих рослин проводили як в умовах *in vitro*, так і в умовах закритого ґрунту (кліматична камера, теплиця).

Нами запропоновано ефективну методику генетичної трансформації ріпаку, яка запатентована в Україні [16]. Відмінність її від загальноприйнятих [4; 17; 67; 112; 113; 158; 198, 305, 331, 335, 344] полягає у використанні в якості експлантів для трансформації листових дисків рослин, які введені у культуру *in vitro* з насіння і асептично вирощуються шляхом мікророзмноження з використанням верхівкових або адвентивних бруньок. Це забезпечує підтримку генетично стабільного вихідного матеріалу для генетичних маніпуляцій у контрольованих стерильних умовах необмежений період часу. Вихідний матеріал для трансформації походить від однієї відібраної рослини, не проходить стадії калусоутворення і не характеризується за рахунок цього соматичною мінливістю. Крім того, такий підхід дає можливість отримувати необхідну кількість фізіологічно однорідного матеріалу перед кожним експериментом з трансформації. Використання асептичного матеріалу полегшує роботу, тому що випадає один з етапів підготовки – стерилізація насіння перед проведенням кожного експерименту. Це заощаджує кошти, реактиви і час, а також усуває

залежність від проблеми забезпеченості значною кількістю фертильного насіння, що часто виникає під час роботи з ріпаком.

Ефективність генетичної трансформації, якої можна досягти з використанням запропонованої нами методики, подібна до методики із використання як експлантів або гіпокотилів проростків [4, 17], або сім'ядольних листочків [113, 198, 305]. Перевагою нашого протоколу є відносно короткий період часу, необхідний для регенерації трансгенних рослин – 2,5–3 місяці, особливо за використання векторних конструкцій з геном *bar* в якості селективного. Використання фосфінотрицина як селективного агента, стійкість до якого забезпечує ген *bar*, дозволяє скоротити процес відбору трансгенних регенерантів на селективних середовищах за рахунок однозначності селекції і відсутності негативного впливу на процес регенерації, що характерно для методик з використанням селекції на канаміцині (стійкість забезпечується геном *nptII*). Процес отримання регенерантів ріпаку в останньому випадку може тривати 6-9 місяців.

Підтвердженням ефективності запропонованої нами методики є отримання за даним протоколом низки рослин ріпаку, які описані у даній роботі. Це рослини з трансгенами *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC*, *licBM3*, *cyp11A1* і *HuInf- α 2b*, а також рослини, які отримані пізніше і вивчення яких триває – з трансгеном *desC* зі спрямуванням гетерологічного білка у хлоропласти за рахунок наявності сигнального пептида; з трансгенами *esxA* (білок ESAT6), *fbpB* (білок Ag85), а також синтетичним геном *esxA:fbpB*, що забезпечують накопичення білків імунної відповіді до *Mycobacterium tuberculosis*; з насіння-специфічною експресією гена *HuInf- α 2b* для накопичення цільового білка у насінні, що може мати переваги для підвищення його стабільності через уникнення деградації під час зберігання.

В результаті експериментів наразі отримано і охарактеризовано п'ять груп рослин ріпаку на основі промислових сортів, районованих в Україні, які мають стійкість до гербіцидів фосфінотрицинового ряду (діюча речовина

глюкофозінат натрію – хімічно синтезований фосфінотрицин або біалафос – природний антибіотик, який являє собою фосфінотрицин з двома залишками L-аланіна, що продукується бактеріями *Streptomyces hygrosopicus* і *S.viridochromogenes*) за рахунок гетерологічної експресії гена *bar* із бактерії *S.hygrosopicus*. Стійкість до гербіциду BASTA підтверджена *in vitro* (проростання насіння і культивування рослин на середовищах з додаванням PPT) та *in vivo* (теплиця, обприскування розчином BASTA) (розд.3).

Групи отриманих нами трансгенних рослин ріпаку відрізняються між собою наявністю інших гетерологічних генів та мають особливості, пов'язані з експресією трансгенів і обумовлені специфічністю векторних конструкцій.

Трансгенні рослини ріпаку, які були трансформовані з використанням вектора, в якому ген *bar* знаходився без промотору, виявились здатні рости на середовищах з фосфінотрицином. Як було з'ясовано пізніше, експресія гена залежала від локалізації його конститутивної частини по відношенню до *lox*-сайту, елементу системи Cre/*lox*-рекомбінації фага P1, задіяному в генетичній конструкції. Трансгенні рослини ріпаку з *lox*-залежною експресією гена *bar* мають стійкість до фосфінотрицину на рівні рослин, які експресують ген *bar* у звичайному вигляді. Отримані нами рослини мають в своєму геномі та експресують ще і ген *nptII* [29]. Вони характеризуються стійкістю до фосфінотрицину і канаміцину, яка зберігається у рослин першого – третього покоління, отриманих в результаті самозапилення первинних трансформантів в умовах теплиці. Але вони не відрізняються від нетрансформованих рослин сорту Калинівський, на основі якого відбулась трансформація, за біохімічними характеристиками (вміст сумарного розчинного білка, активність СОД, антирадикальна активність) і фенотипом (тривалість вегетативного періоду, накопичення біомаси, особливості цвітіння, проростання насіння) (розд.3.2). Інтеграція генів стійкості до гербіциду і антибіотику в геном ріпаку не приводить до неочікуваних біохімічних змін у трансгенних рослинах.

Трансгенні рослини ріпаку з одночасною експресією бактеріальних генів *bar* і *epsps* (останній з агробактерії (*Agrobacterium* sp.) штама CP4) після трансформації з використанням одного вектора, що несе обидва гени, були схожі на нетрансформовані рослини сортів Титан, Ексголд і Обрій за своїми ростовими (накопичення біомаси) і біохімічними (СРБ, активність СОД, загальна антирадикальна активність) характеристиками [32, 34, 36, 37]. Стійкість до гербіцидів BASTA і Roundup підтверджена в умовах *in vitro* (проростання насіння і культивування рослин на середовищах з додаванням PPT і гліфосату) та *in vivo* (теплиця, обприскування розчинами BASTA і Roundup) (розд.3.3). Стійкість до обох гербіцидів продемонстрована у первинних трансформантів, а також у рослин першого – другого покоління, отриманих в результаті самозапилення первинних трансформантів в умовах теплиці. Інтеграція генів стійкості до гербіцидів двох різних груп в геном ріпаку не приводить до неочікуваних біохімічних змін у трансгенних рослинах. Отримання власних біотехнологічних рослин на основі перспективних сортів вітчизняної селекції зі стійкістю до найбільш поширених гербіцидів – гліфосату та глюфозінату – є вигідним, бо може зробити вирощування ріпаку більш рентабельним, екологічно чистим за рахунок зменшення необхідних обробок посівів гербіцидами і незалежним від імпорту посівного матеріалу. Врахування нових тенденцій у створенні гербіцид-стійких трансгенних рослин, а саме отримання рослин, які поєднують стійкість до декількох гербіцидів одночасно, дає змогу зменшити ризик виникнення спонтанно стійких бур'янів за рахунок чергування обробок гербіцидами з різними діючими агентами.

Трансгенні рослини ріпаку з одночасною експресією чотирьох генів (*bar*, *nptII*, *epsps*, *desC::licBM3*), введених до ядерного геному ріпаку за допомогою двох векторів, були стійкими до обробки гербіцидами двох груп (глюфозинат і гліфосат) і мали активними бактеріальні гени ліхенази *licBM3* із *Clostridium termocellum* та $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази *desC* із *Synecococcus vulcanus* [26, 28]. Гени ліхенази і десатурази були інтегровані у

вигляді злитого гена, і ген ліхенази використовувався як репортерний для якісної і кількісної оцінки експресії гена десатурази (розд.3). Аналіз біохімічних і фізіологічних параметрів трансгенних рослин цієї групи не виявив відмінностей у порівнянні з контрольними рослинами сорту Обрій за накопиченням сирої біомаси, вмістом СРБ, вмістом хлорофілів і каротиноїдів, якісним складом жирних кислот у ліпідах мембран листків та активністю СОД як за умов росту без стресу, так і під дією низьких позитивних температур (+4°C), впливу високої температури (+42°C протягом 16 годин) і осмотичного стресу, індукованого манітолом (розд.6.3) [31, 370, 371]. Спостерігали відмінності від контролю у деяких ліній первинних трансформантів (18b) і рослин першого покоління (18b/25) за вмістом ліпідів, кількісним складом жирних кислот у ліпідах мембран листків, загальним вмістом жирних кислот та індексом ненасиченості ліпідів мембран листків. Але ці зміни не приводили до покращення росту рослин як за нормальних умов росту, так і за дії абіотичних стресів [31, 370, 371]. Оскільки утворення подвійного зв'язку в молекулі насиченої жирної кислоти завдяки експресії десатурази DesC відбувається, головним чином, в хлоропластах, доцільно спрямувати кінцевий продукт трансформації до відповідного компартмента клітини. Цього можна досягти за рахунок введення до векторної конструкції сиквенса транзитного пептида, функцією якого буде доставка гетерологічного білка в хлоропласти. Хоча у отриманих трансгенних рослин ріпаку, які експресують одночасно чотири гетерологічні гени, не показано підвищення толерантності до холоду, у них не виявлено і змін, які б погіршували їх фізіологічні та біохімічні параметри. Їх можна використовувати як рослинний матеріал, стійкий до двох гербіцидів різних груп одночасно. Оскільки ці рослини створено на основі трьох районованих в Україні сортів, це дає можливість вибору найкращого вихідного матеріалу для подальшої селекції ріпаку на продуктивність.

Трансгенні рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини відрізнялись від нетрансформованих рослин сорту Магнат наявністю

інтерфероноподібної активності екстрактів листків, достовірно вищими біомасою і вмістом хлорофілів і каротиноїдів, підвищеною активністю СОД і антиоксидантною активністю за нормальних умов вирощування [165, 166, 373]. Показники інтерфероноподібної активності варіювали у різних трансгенних ліній від повної відсутності до 4500 МО/г сирової маси. Спостерігали відмінності між контрольними і біотехнологічними рослинами не тільки за сприятливих умов росту, але і за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом *in vitro*, за сировою біомасою, вмістом СРБ і фотосинтетичних пігментів та активністю СОД [373, 378, 379, 380, 407, 408]. Тестовані трансгенні лінії виявили себе більш стійкими до осмотичного стресу, ніж нетрансформовані рослини. Вони накопичували більшу біомасу порівняно з нетрансформованими рослинами; не знижували вміст сумарного розчинного білка за умов стресу, як контрольні; характеризувались підвищеним вмістом хлорофілів і каротиноїдів під дією дефіциту вологи. Оскільки зелена маса ріпаку може використовуватись на корм худобі, додавання до нього домішок з трансгенних рослин, що накопичують інтерферон, може мати профілактичний ефект для запобігання інфекційним хворобам.

Для того, щоб зрозуміти природу біохімічних змін, які відбуваються в рослинах, що експресують трансген *HuInf- α 2b*, вивчено вплив екзогенного інтерферону альфа-2b людини на проростання насіння ріпаку і ріст пагонів під дією осмотичного стресу в асептичних умовах [369, 407, 408]. Показано підвищення накопичення біомаси проростками, отриманими з насіння, обробленого розчинами інтерферону різної концентрації, яке супроводжувалось зростанням активності СОД. Це дало підстави зробити висновок, що зміни у біохімічних параметрах трансгенних рослин викликані експресією гетерологічного білка. Визначено оптимальну концентрацію інтерферону, приготованого із препарату Laferon (рекомбінантний ІНФ альфа-2b людини, 1 М МО, INTER-PHARM-BIOTEK, Україна), для пришвидшення росту проростків, яка становила 10^3 МО/мл. Виявлено

позитивний вплив обробки розчином інтерферону на фізіологічні (накопичення сирої біомаси) і біохімічні (вміст СРБ і фотосинтетичних пігментів, активність СОД) характеристики пагонів ріпаку за умов осмотичного стресу *in vitro*, індукованого манітолом. Проведено порівняння впливу екзогенного і трансгенного інтерферону на рослини ріпаку. Показана позитивна лінійна кореляція між показниками СОД активності і сирою біомасою, вмістом СРБ, вмістом хлорофілів *a* і *b*, вмістом каротиноїдів за нормальних умов і за осмотичного стресу на прикладі рослин, оброблених розчином інтерферону.

Раніше показано, що у клітинах тварин обробка екзогенним альфа-інтерфероном супроводжувалась активацією НАДФ-оксидаз, які продукують супероксид-радикали, і підвищенням активності СОД [58, 244, 332, 341]. Інгібітори СОД викликали зниження захисної дії інтерферону на культури клітин тварин і людини, інфікованих вірусами. Супероксид задіяний у багатьох клітинних реакціях, в тому числі росту розтягуванням, що може приводити до прискорення темпів росту і збільшення накопичення біомаси як трансгенними рослинами з геном інтерферона, так і рослинами, які пройшли обробку розчинами цього цитокіна. Ми вважаємо, що зміни у метаболізмі трансгенних рослин ріпаку відбуваються завдяки експресії гетерологічного гена *HuInfα-2b*, яка спричинює підвищення активності СОД через індукцію супероксида.

Трансгенні рослини ріпаку з геном тваринного походження *sup11A1* (із мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби) відрізнялись від контрольних рослин сорту Марія за накопиченням біомаси, вмістом сумарного розчинного білка, активністю СОД і антиоксидантною активністю, відносним вмістом води у листках та кількісним складом жирних кислот у ліпідах з насіння як за умов стресів (проростання насіння за підвищеної температури, осмотичний стрес, індукований манітолом, високотемпературний стрес за умов кліматичної камери), так і за фізіологічних умов. Рослини ріпаку з трансгеном *sup11A1* за нормальних

умов росту характеризувались здатністю до більшого до 33% накопичення біомаси, а також підвищеним до 30% вмістом СРБ у листках, підвищеною до 76% активністю СОД, підвищеним до 6% вмістом олеїнової кислоти та зниженим удвічі (до 3М%) вмістом ліноленої кислоти у ліпідах з насіння [27, 33, 375, 376, 379, 380] у порівнянні з нетрансформованими. Ці рослини зменшували свою біомасу і СРБ в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом, до рівня контрольних в умовах без стресу. Біомаса контрольних рослин була достовірно нижчою за біомасу трансгенних рослин в умовах стресу. Окремі лінії (T₂1a) були здатні до накопичення біомаси в умовах стресу (500 мМ манітолу), яку контрольні рослини формували в нормальних умовах росту [371]. Трансгенні рослини ріпаку з геном *cup11A1* виявляли себе більш стійкими до пошкоджуючої дії високих (+42°C) температур за умов кліматичної камери [370, 372, 374]. Оскільки раніше було показано, що результати високотемпературного тесту корелюють з результатами росту рослин в польових умовах за підвищеної температури [184], можна сподіватись, що рослини ріпаку з геном *cup11A1* будуть більш стійкими і у польових випробовуваннях. Насіння цих рослин проростало швидше, проростки мали більшу сиру біомасу, довші корені і гіпокотилі, ніж нетрансформовані, при проростанні за підвищеної температури [23, 24].

У тварин експресія цитохрома P450_{SCC}, що його кодує ген *cup11A1*, супроводжується утворенням супероксида в реакціях утворення прегненолона з холестерину, які каталізує ця монооксигеназа. Витік електронів та їх взаємодія з киснем з продукуванням супероксида відбувається у ланцюзі адрендоксин редуктаза – адрендоксин – цитохром P450_{SCC}. Раніше показано, що в рослинах ріпаку субстратом для роботи гетерологічного цитохрома можуть бути фітостероли (β-сітостерол). Саме експресія гетерологічного цитохрома P450_{SCC} обумовлює фізіологічні і біохімічні зміни в трансгенних рослинах ріпаку з геном *cup11A1*.

В результаті експериментів виявлена підвищена толерантність до абіотичних стресів у рослин ріпаку з трансгенами *cup11A1* і *HuInf2b* в

асептичних умовах і умовах закритого ґрунту (кліматична камера) порівняно з нетрансформованим контролем. В той же час для інших отриманих і проаналізованих у нашій роботі рослин ріпаку таких відмінностей від нетрансформованих рослин не зафіксовано.

Рослини ріпаку з трансгенами *sup11A1* і *HuInfα-2b* відрізняються за сприятливих умов росту від контрольних підвищеною активністю СОД. Цей фермент реагує першим у тонко відрегульованій системі захисту рослин і тварин на підвищення кількості супероксид-радикалів за умов стресів, а також задіяний у коригуванні процесів росту і розвитку за нормальних умов росту. Дикорослі рослини часто мають підвищену активність СОД у порівнянні з культурними родичами. Спостерігаються відмінності за активністю СОД у різних сортів однієї культури, що також показано у наших експериментах [379, 380]. Трансгенні рослини з генами *sup11A1* і *HuInfα-2b* набувають підвищеної здатності до протидії несприятливим умовам зростання за рахунок підвищеної активності СОД за нормальних умов. Зміни у метаболізмі рослин відбуваються за рахунок експресії гетерологічних білків (інтерферону-альфа2b людини і цитохрому P450_{SCC}), які здатні індукувати підвищення рівня супероксида і відповідної активності СОД.

Експресія генів стійкості до антибіотика (*nptII*) і генів стійкості до гербіцидів (*bar* і *epsps*) не приводить до додаткових змін у метаболізмі трансгенних рослин, крім забезпечення стійкості до відповідних селективних агентів. Поєднання в одній рослині генів стійкості до двох гербіцидів різних груп не викликає неочікуваних біохімічних змін.

Дослідження змін активності СОД в отриманих нами трансгенних рослинах і рослинах, оброблених розчинами інтерферону, дозволило виявити позитивну кореляцію між змінами в накопиченні біомаси і змінами активності СОД. Таким чином, показники активності СОД доцільно використовувати як критерій для відбору рослин, стійких до осмотичного стресу.

Колекція створених трансгенних рослин ріпаку з гетерологічними генами різного походження може бути цінною в селекційній роботі. Окремі групи рослин, зокрема, рослини ріпаку з генами *sup11A1* і *HuInf-α2b* можуть слугувати матеріалом для подальших фундаментальних досліджень для виявлення, наприклад, особливостей гормонального статусу цих трансгенних рослин та особливостей притаманних їм вторинних метаболітів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми, що заключаються у розробці ефективної технології отримання трансгенних рослин важливої олійної культури – ріпаку (*Brassica napus* L.) з гетерологічними генами різного походження та виявленні рослин ріпаку з трансгенами *sup11A1* і *HuInf- α 2b*, що експресують цитохром P450_{SCC} або інтерферон альфа-2b людини, які мають покращені фізіологічні і біохімічні характеристики порівняно з нетрансформованими контрольними рослинами як за сприятливих умов росту, так і за дії стресів різної природи. Експресія генів *bar*, *nptII*, *epsps* або *desC::licBM3* не надає рослинам додаткових переваг за умов абіотичних стресів.

1. Запропонована ефективна методика генетичної трансформації ріпаку з використанням як експлантів листових дисків асептично вирощуваних рослин для отримання ліній з різними гетерологічними генами.
2. Стійкість до гербіциду фосфінотрицину в трансгенних рослинах ріпаку може бути досягнута за рахунок експресії безпромоторного гена *bar*, яка зберігається у рослин, принаймні, до третього покоління.
3. Виявлено, що рослини ріпаку з геном *bar* та з генами *bar* і *epsps*, стійкі до двох груп гербіцидів (фосфінотрицину і фосфонометилгліцину), не відрізняються від контрольних рослин за антиоксидантною активністю, накопиченням біомаси і вмістом сумарного розчинного білка.
4. Показано наявність і активність введених генів *bar*, *nptII*, *epsps* і *desC::licBM3* в трансгенних лініях ріпаку. Продемонстровано, що експресія гена ацил-ліпідної десатурази *desC* не впливає на толерантність рослин до дії низьких та високих температур і осмотичного стресу.
5. Показано біологічну активність гетерологічного білка в рослинах ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини та підвищення антиоксидантної активності тканин листків. Виявлено здатність до накопичення більшої

біомаси в порівнянні з вихідними рослинами як за сприятливих умов культивування, так і в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом *in vitro*.

6. В створених рослинах ріпаку з геном *sup11A1*, що кодує цитохром P450_{SCC} тваринного походження, виявлено здатність до накопичення ними підвищеної біомаси зі збільшеним вмістом загального розчинного білка за асептичних умов культивування. Зафіксовано підвищену антиоксидантну активність тканин листків та скорочення вегетативного періоду росту таких рослин. Виявлено зміни в жирнокислотному складі ліпідів листя і насіння у отриманих рослин, що корелювало з їх підвищеною толерантністю до осмотичного стресу *in vitro*, високої температури при пророщуванні насіння, високотемпературного стресу.
7. Серед отриманих трансгенних рослин ріпаку виділено дві групи, здатні формувати більшу, ніж нетрансформовані рослини, біомасу за фізіологічних умов і при дії абіотичних стресів (підвищена температура, водний дефіцит). Це рослини, що несуть гени *sup11A1* і *HuInfa-2b*.
8. Біотехнологічні рослини ріпаку з генами *sup11A1* і *HuInfa-2b* відрізняються від інших аналізованих в даній роботі за активністю першого фермента в системі антиоксидантного захисту рослин – супероксиддисмутази, яка є підвищеною за фізіологічних умов.
9. Підвищена активність СОД, ймовірно, є наслідком експресії гетерологічних генів P450_{SCC} і інтерферон альфа-2b людини, які здатні впливати на продукцію супероксид-радикалів.
10. Вперше продемонстровано, що обробка розчинами екзогенного інтерферону позитивно корелює з активністю СОД і толерантністю рослин ріпаку до умов водного дефіциту, а також покращує проростання насіння.
11. Показано, що трансгенні рослини, які експресують лише гени стійкості до антибіотиків (*nptII*) та/або гени стійкості до гербіцидів (*bar*, *epsps*) не відрізняються від нетрансформованих рослин за активністю СОД за

нормальних умов. Ці гени не надають рослинам додаткових переваг за умов стресів (знижена та підвищена температури).

12. Ріст рослин ріпаку може бути покращений за рахунок експресії цільових генів, здатних впливати на активність ферментів антиоксидантного захисту, зокрема СОД. Показники активності СОД доцільно використовувати як критерій для відбору рослин, стійких до осмотичного стресу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вехов В.Н. Культурные растения СССР/ В.Н. Вехов, И.А. Губанов, Г.Ф. Лебедева – Москва: Мысль, 1978. – 336 с.
2. Герасименко И.М. Получение и анализ трансгенных растений, несущих гены $\Delta 9$ и $\Delta 12$ десатураз цианобактерий / И.М. Герасименко, И.С. Головач, Е.М. Кищенко [и др.] // Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч.Дарвина и V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 21–28 июня 2009 г.: тезисы докл., ч.1. – Москва: изд-во РГАУ-МСХА, 2009. – С.537.
3. Герасименко И.М. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий / И.М. Герасименко, Л.А.Сахно, И.С. Головач [и др.]// Вестник ВОГиС. – 2010. – Т.14, № 1. – С.127-133.
4. Гирич А.М. Генетическая трансформация рапса *Brassica napus* L. с помощью *Agrobacterium tumefaciens* / А.М.Гирич, Н.Н.Череп, М.В.Скаржинская [и др.] // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 2. – Р. 20–25.
5. Голденкова-Павлова И.В. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам / И.В.Голденкова-Павлова, Н.Мирахорли, А.Р. Маали [и др.] // Цитология и генетика. – 2007. – 41, №3. – С. 44– 49.
6. Гольцов А.А. Рапс, сурепица / А.А. Гольцов, А.М. Ковальчук, В.Ф. Абрамов, Н.З. Милащенко.– М.: Колос, 1983. – 192с.
7. Граскова И.А. Динамика сезонных изменений жирнокислотного состава, степени ненасыщенности жирных кислот и активности ацил-липидных десатураз в тканях некоторых лекарственных растений, произрастающих в условиях Предбайкалья / И.А. Граскова, Л.В. Дударева, М.А. Живетьев [и др.] // Химия раст. сырья. – 2011. – Т.4. – С. 223– 230.

8. Еникеев А. Г. Влияние структуры генетического вектора на физиологические последствия трансформации рапса (*Brassica napus* L.) геном *acb* / А. Г. Еникеев, У. О. Мишутина // Физиология растений. – 2005. – Т.52, № 5. – С. 751-755.
9. Колупаєв Ю.Є. Активні форми кисню і антиоксидантна система при перехресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів / Ю.Є. Колупаєв, О.І. Обозний // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. – 2013. – Т.30, N 3. – С. 18-31.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин - М.: Высш.школа, 1990. – 352 с.
11. Лучаківська Ю.С. Експресія гена інтерферону альфа людини під контролем тканиноспецифічного та конститутивного промоторів у трансгенних рослинах тютюну (*Nicotaina tabacum* L.) / Ю.С. Лучаківська, О.М.Майстренко, З.М.Олевинська [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 2. – С.232-239.
12. Маали Р. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной $\Delta 9$ десатуразы в бактерии *Escherichia coli* / Р. Маали, Х.Р. Шимшилашвили, В.П. Пчёлкин [и др.] // Генетика. – 2007. – Т.43, № 2. – С.1–7.
13. Макаренко С. П. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков / С. П. Макаренко, Л. В. Дударева, А. И. Катышев [и др.] // Биологические мембраны. – 2010. – V.27, №6. – С. 482–488.
14. Максимов И.В. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 3. – С.250–261.
15. Мовсесян Н.Р. Трансгенные растения табака, экспрессирующие бактериальные гены термостабильных глюконаз / Н.Р. Мовсесян, Х. Ализаде, К.А. Мусийчук [и др.] // Генетика. – 2001. – Т.37, № 6. – С.745–753.

16. Патент України на корисну модель № 39205, МПК А01Н1/00; А01Н4/00; А01Н5/00; С12Н1/00; С12Н5/00; С12Н15/00, Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є.А., Сахно Л.О., Кучук М.В., заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та біотехнології НАНУ, заявл. 3.10.2008; опубл. 10.02.2009, бюл. № 3.
17. Радчук В.В. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* / В.В. Радчук, Э. Клоке, Р.И. Радчук [и др.] // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 7. – С. 932–941.
18. Ралдугина Г.Н. Стабильность и наследование *трансгенов* в растениях рапса / Г.Н. Ралдугина, С.В. Горелова, А.В. Кожемякин // Физиология растений. – 2000. – Т.47, № 3. – С. 437 – 445.
19. Рудас В.А. Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду Баста, що містять ген *sup11A1* цитохрому P450_{SCC} / Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргун Б.В. [та ін.]// Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2009. – Т.7. – С. 245-250.
20. Сахно Л.А. Активность системы *Spm* транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансформацией корневых эксплантов / Л.А. Сахно, Е.С. Сытник, Н.Н. Череп [и др.] // Цитология и генетика. – 2002. – Т.36, № 6. – С. 3-8.
21. Сахно Л.А. Вариабельность жирнокислотного состава рапсового масла: классическая селекция и биотехнология / Л.А. Сахно // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, №6. – С. 70–80.
22. Сахно Л.А. Жирнокислотный состав листьев рапса с трансгеном *sup11A1* в условиях высокотемпературного стресса / Л.А.Сахно, М.С.Сливец, А.А.Петерсон [и др.] // Фактори експериментальної

- эволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2013. – Т.12. – С.301-306.
23. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения / Л.А. Сахно // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 2. – С.253–259.
24. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения [Электронный ресурс] / Л.А.Сахно // Материалы Международной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений», 30 мая – 1 июня 2011 г., Киев. – С.55. Режим доступа:
http://conference.icbge.org.ua/images/2011/Abstracts_ICBGE_2011.pdf
25. Сахно Л.А. Рапс с трансгеном DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*: жирнокислотный состав листьев / Л.А. Сахно, М.С. Сливец, А.Н. Остапчук, Н.А.Король, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // X Междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». 14-18 октября 2013 г., Казань: изд-во «Центр инновационных технологий». – С. 254–255.
26. Сахно Л.А. Рапс с трансгеном DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*: жирнокислотный состав листьев / Л.А. Сахно, М.С. Сливец, А.Н. Остапчук, Н.А.Король, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X Междунар. конф.: сб. ст., Казань, 14-18 октября 2013 года. – Казань: Центр инновационных технологий, 2013. – С.94–98.
27. Сахно Л.А. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения / Л.А. Сахно, Б.В. Моргун, Е.Ю. Кваско, Н.В. Кучук // Біотехнологія. – 2010. – Т.3, № 5. – С. 74–82.

28. Сахно Л.А. Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus* / Л.А. Сахно, И.М. Герасименко, И.К. Комарницкий, Ю.В.Шелудько, И.В.Голденкова-Павлова // *Biopolym. Cell.* – 2012. – Т. 28, № 6. – С.449–455.
29. Сахно Л.А. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса / Л.А. Сахно, Е.А.Гочева, И.К. Комарницкий, Н.В. Кучук // *Цитология и генетика.* – 2008. – Т. 42, №1. – С. 21–28.
30. Сахно Л.А. Трансгенные растения семейства крестоцветных как продуценты ненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью / Л.А. Сахно // *Біотехнологія.* – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 9-18.
31. Сахно Л.А. Экспрессия трансгена *desC* цианобактерии в растениях рапса не изменяет их холодоустойчивости / Л.А.Сахно, М.С. Сливец, Ю.В. Шелудько // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2013. – Т.11, № 2. – С.267–275.
32. Сахно Л.О. Антиоксидантна активність листків біотехнологічного ріпаку (*Brassica napus* L.) зі стійкістю до гербіцидів на основі гліфосату і глюфозінату /Л.О.Сахно, К.В.Листван, М.В.Кучук // *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту.* – 2015. – Т. 3, № 36. – С. 61-69.
33. Сахно Л.О. Жирнокислотний склад насіння ріпаку з трансгеном *cup11A1* цитохрому P450_{SCC} / Л.О.Сахно, А.М.Остапчук, В.В.Клочко, М.В.Кучук // *Біотехнологія.* – 2012. – Т.5, № 5. – С.27–33.
34. Сахно Л.О. Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.), одночасно стійких до дії гербіцидів на основі гліфосату і глюфозінату / Л.О.Сахно, І.К.Комарницький, Кучук М.В. // *Доповіді НАН України.* – 2015. – № 9. – С.84-90.
35. Сахно Л.О. Соматичні гібриди *Brassica napus*+*Orychophragmus violaceus*, стійкі до фосфінотрицина / Л.О.Сахно, І.К.Комарницький,

- М.Н.Череп, М.В. Кучук // Цитология и генетика. – 2007. – Т.41, № 1. – С.3-8.
36. Сахно Л.О. Створення рослин ріпаку, стійких до гербіцидів на основі гліфосату, за рахунок введення синтетичного гена *epsps* / Л.О. Сахно, І.К. Комарницький, П.Д. Майстров, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2011. – Т.11. – С. 388–393.
37. Сахно Л.О. Стійкість до гліфосату і глюфозінату в поколіннях T₁–T₂ біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) / Л.О.Сахно, І.К.Комарницький, М.В.Кучук // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т.13, № 1. – С.3-10.
38. Семенов В.Л. Метод определения антиокислительной активности биологического материала / В.Л. Семенов, А.М. Ярош // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50-52.
39. Спивак С.Г. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} / Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Ярмолинский Д.Г. [и др.] // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.
40. Степаненко О.В. Ріст рослин ріпаку з геном десатурази ціанобактерії DesC в умовах осмотичного стресу / О.В.Степаненко, Л.О.Сахно // Біотехнологія ХХІ століття. VI Всеукр. наук.-практ. конф., 5 квітня 2012 року: тези доповідей. – К.: вид-во НТУ «КП», 2012. – С.114.
41. Трегуб М.С. Рослини ріпаку з гетерологічними генами різного походження в умовах осмотичного стресу *in vitro* / М.С.Трегуб, О.В.Степаненко, Л.О.Сахно // Генетичні основи селекції, насінництва і біотехнологій: наука, освіта, практика. Міжнар. наук.-практ. конф. 21-24 травня 2012 р. – К.: НУБіП, 2012. – С.103.
42. Трегуб М.С. Особенности роста трансгенных растений рапса с геном *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} в условиях осмотического стресса / М.С.

- Трегуб, Л.А. Сахно // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (за ред. Кунаха В.А.). – 2012. – Т.4. – С.623–628.
43. Трегуб М.С. Ріст рослин ріпаку, трансформованих геном *sup11A1* цитохрома P450_{SCC}, в умовах осмотичного стресу / М.С.Трегуб, Л.О.Сахно // Біотехнологія ХХІ століття. VI Всеукр. наук.-практ. конф., 5 квітня 2012 року: тези доповідей. – К.: вид-во НТУ «КПІ», 2012. – С.197.
44. Фалетров Я.В. Трансгенные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие цитохром P450_{SCC}, в качестве потенциального биокатализатора синтеза прегнанов из стероидов / Я.В. Фалетров, Н.С. Фролова, Е.В. Рудая [и др.] // Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности. I Международная конференция Российского химического общества имени Д.И.Менделеева: Сб. тезисов докладов – М.: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2009. – С.176-177.
45. Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия генов ацил-липидных десатураз цианобактерий в растениях / Ю.В.Шелудько, Л.А.Сахно, И.М.Герасименко, Я.Р.Синдаровская, В.В.Ключко, А.Н.Остапчук, И.В.Голденкова-Павлова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2010. – Т.9. – С.369–374.
46. Шимшилашвили Х.Р. Изучение экспрессии генов, вовлечённых в модификацию жирных кислот, на экспериментальных моделях / Х.Р. Шимшилашвили // Автореферат дисс....канд.биол.наук.. – М.: ИОГ РАН, 2010. – 24 с.
47. Шишлова А.М. Введение кДНК *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения в растения рапса / А.М. Шишлова, Л.А.Сахно, Б.В.Моргун [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2010. – Т.11, № 2. – С.12-19.

48. Щербак Н.Л. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мерхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* / Н.Л.Щербак, В.Б.Белокурова, И.К.Комарницкий, Н.В.Кучук // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 3–8.
49. Щербак Н.Л. Изучение влияния *lox*-сайтов Cre *lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях/ Н.Л. Щербак, В.Б. Белокурова, И.О. Гецко [и др.] // Цитология и генетика. – 2006. – Т.40, № 1. – С. 3–9.
50. Abbadì A. Rapeseed breeding for oil content, quality, and sustainability / A. Abbadì, G. Leckband // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2011. – V.113, N 10. – P. 1198–1206.
51. Abebe T. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity / T. Abebe, A. C. Guenzi, B. Martin, J. C. Cushman // Plant Physiol. – 2003. – V. 131, N 4. – P. 1748-1755.
52. Abedi T. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) / T. Abedi, H. Pakniyat // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2010. – V. 46, N 1. – P. 27–34.
53. AbuQamar S. Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor / S. AbuQamar, H. Luo, K. Laluk [et al.] // Plant J. – 2009. – V.58, N 2. – P.347–360.
54. Aguado-Santacruz G. A. Genetic transformation of blue grama grass with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: regeneration of transgenic plants involves a “hairy embryo” stage/ G. A. Aguado-Santacruz, Q. Rascón-Cruz, B. Moreno-Gómez [et al.] // In Vitro Cell. Develop. Biol. – Plant. – 2009. – V.45, N 6. – P.681-692.
55. Ahmad R. Development of selection marker-free transgenic potato plants with enhanced tolerance to oxidative stress / R. Ahmad, Y.-H. Kim, M.D. Kim [et al.] // J. Plant Biol. – 2008. – V. 51, N 6. – P. 401-407.

56. Akolade J.O. Antidiabetic potentials of essential oil extracted from the leaves of *Hoslundia opposita* Vahl. / J.O.Akolade, L.A.Usman, O.E.Okereke, N.O. Muhammad // J. Med. Food. – 2014. – V.17, N 10. – P. 1122–1128.
57. Al-Saikhan M.S. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) / M.S. Al-Saikhan, L.R. Howard, J.C. Miller // J. Food Sci. – 1995. – V. 60, N 2. – P.341-347.
58. Al-Shabanah O.A. Enhanced generation of leukotriene B₄ and superoxide radical from calcium ionophore (A23187) stimulated human neutrophils after priming with interferon-alpha / O.A. Al-Shabanah, M.A. Mansour, M.M. Elmazar // Res.Comm. Mol. Pathol. Pharmacol. – 1999. – V.106, N1-2. – P. 115-128.
59. Amrhein N. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro* / N. Amrhein, B. Deus, P. Gehrke, H. C. Steinrücken // Plant Physiol. – 1980. – V.66, N 5. – P.830–834.
60. Aquil F. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants / F. Aquil, I. Ahmad, Z. Mehmood // Turk. J. Biol. – 2006. – V.30, N 3. – P.177–183.
61. Arisi A.-C. M. Overexpression of Iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen / A.-C. M. Arisi, G. Cornic, L. Jouanin, C.H. Foyer // Plant Physiol. – 1998. – V.117, № 3. – P. 565–574.
62. Arlen P.A. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b / P.A. Arlen, R. Falconer, S. Cherukumilli [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2007. – V. 5, N 4. – P.511-525.
63. Arunyanark A. Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut / A. Arunyanark, S. Jogloy, C. Akkasaeng [et al.] // J. Agronomy Crop Sci. – 2008. – V.194, N 2. – P. 113–125.

64. Ashraf M. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison / M. Ashraf, N.A. Akram // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – V.27, N 6. – P. 744–752.
65. Atkins C. A. Consequences of transforming narrow leafed lupin (*Lupinus angustifolius* [L.]) with an ipt gene under control of a flower-specific promoter / C. A. Atkins, R. J. N. Emery, P. M. C. Smith // *Transgenic Res.* – 2011. – V. 20, N 6. – P.1321-1332.
66. Babior B. M. Biological defense mechanisms: production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent / B. M.Babior, R. S.Kipnes, J. T. Curnutte // *J. Clin. Invest.* – 1973. – V.52, N 3. – P. 741–744.
67. Babwah A.V. Cytosine deaminase as a substrate-dependent negative selectable marker in *Brassica napus* / A.V.Babwah, C.S.Wandell // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 100, № 5. – P. 802–809.
68. Badawi G.H. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts/ G.H. Badawi, Y. Yamauchi, E. Shimada [et al.] // *Plant Sci.* – 2004. – V.166, N 4. – P.919-928.
69. Bae M-J. Transgenic rice overexpressing the *Brassica juncea* gamma-glutamylcysteine synthetase gene enhances tolerance to abiotic stress and improves grain yield under paddy field conditions / M-J. Bae, Y-S. Kim, I-S. Kim // *Mol. Breed.* – 2013. – V.31, N 4. – P.931-945.
70. Bagnoli F. Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut/ F. Bagnoli, M.Capuana, M.L. Racchi // *Aust. J. Plant Physiol.* – 1998. – V. 25, N 8. – P. 909–913.
71. Bai X. Overexpression of *GsCBRLK* from *Glycine soja* enhances tolerance to salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*)/ X. Bai, J. Liu, L.Tang [et al.] // *Funct. Plant Biol.* – 2013. – V. 40, N 10. – P. 1048–1056.
72. Bao Ai-Ke. Overexpression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*

- L.) / Ai-Ke Bao, S.-M. Wang, G.-Q. Wu [et al.] // *Plant Sci.* – 2009. – V.176, N 2. – P. 232–240.
73. Baron K. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development / K. Baron, C. Stasolla // *In Vitro Cell Dev Biol.-Plant.* – 2008. – V. 44. – P.384–395.
74. Basu U. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium / U.Basu, A. G.Good, J. Taylor // *Plant Cell Environ.* – 2001. – V. 24, N 12. – P.1269–1278.
75. Beermann C. Comparison of the structures of triacylglycerol from native and transgenic medium-chain fatty acid-enriched rapeseed oil by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry (LC – APCI-ITMS) / C. Beermann, N. Winterling, A. Green [et al.] // *Lipids.* – 2007. – V. 42, № 4. – P. 383–394.
76. Ben-Saad R. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the *ALSAP* gene exhibits a high level of tolerance to salinity and dehydration stresses / R. Ben-Saad, W. Ben-Ramdhan, N. Zouari [et al.]// *Mol. Breed.* – 2012. – V.30, N 1. – P.521-533.
77. Beyer W.F. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions / W.F. Beyer, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* – V. 161, № 2. –1987. – P. 559–566.
78. Bhatnagar-Mathur P. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects / P. Bhatnagar-Mathur, V.Vadez, K.K. Sharma // *Plant Cell Rep.* – 2008. – V. 27, N 3. – P. 411–424.
79. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical / M.S.Blois // *Nature.* – 1958. – V.181. – P.1199–1200.
80. Blum A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat / A. Blum, A. Ebercon // *Crop Sci.* – 1981. – V.21, N 1. – P. 43–47.

81. Bömer M. Increased vegetative development and sturdiness of *storekeeper*-transgenic tobacco / M. Bömer, J.F. Uhrig, G. Jach, K.J. Müller // Central European Journal of Biology. – 2011. – V. 6, N 3. – P.342-351.
82. Bowler C. Superoxide dismutase and stress tolerance / C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol. – 1992 – V.43, N. 1. – P.83 -116.
83. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle to protein dye binding / M.M. Bradford // Anal Biochem. – 1976. – V.72. – P.248–254.
84. Broul Y. C. Water stress induces overexpression of superoxide dismutases that contribute to the protection of cowpea plants against oxidative stress / Y. C. Broul, A. Zézé, O. Diouf, M. Eyletters // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – V. 6, N 17. – P. 1982-1986.
85. Bueno P. Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons / P. Bueno, J. Varela, G. Gimenez-Gallego, L. A. Del Rio // Plant Physiol. – 1995. – V. 108, N 3. – P. 1151–1160.
86. Cai H. Overexpressed *glutamine synthetase* gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice / H.Cai, Y.Zhou, J.Xiao [et al.] // Plant Cell Reps. – 2009. – V.28, N 3. – P.527–537.
87. Canam T. Varied growth, biomass and cellulose content in tobacco expressing yeast-derived invertases/ T. Canam, J.-Y. Park, K.Y. Yu [et al.]// Planta. – 2006. – V.224, N 6. – P.1315-1327.
88. Candan N. Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves / N. Candan, L. Tarhan // Plant Physiol. Biochem. – 2003. – V. 41, N 1. – P. 35–40.
89. Capecka E. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species / E. Capecka, A. Mareczek, M. Leja // Food Chem. – 2005. – V. 93, N 2. – P. 223-226.

90. Cardoza V. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants / V. Cardoza, C.N. Stewart // *Plant Cell Rep.* – 2003. – V. 21, № 6. – P. 599 – 604.
91. Chandler S.F. Characterization of growth, water relations, and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv Westar (Canola) / S.F. Chandler, T.A. Thorpe // *Plant Physiol.* – 1987. – V. 84, N 1. – P.106-111.
92. Chatzidimitriadou K. Expression of SOD transgene in pepper confers stress tolerance and improves shoot regeneration/ K. Chatzidimitriadou, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, R. Perl-Treves // *Electron. J. Biotechnol.* – 2009. – V.12, N 4. Режим доступа: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582009000400007&script=sci_arttext&tlng=pt#
93. Chaudhuri K. Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation / K. Chaudhuri, S. Das, M. Bandyopadhyay [et al.] // *Transgenic Res.* – 2009. – V.18, N 1. – P.121–134.
94. Cha-Um S. Effect of mannitol- and salt-induced isoosmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) / S. Cha-Um, N.T.H. Nhung, C.Kirdmanee // *Pak. J. Bot.* – 2010. – V.42, N 2. – P.927-941.
95. Chen I.-C. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates / I.-C.Chen, H.-C.Chang, H.-W.Yang, G.-L.Chen // *JFDA.* – 2004. – V.12, № 1. – P. 29–33.
96. Chen M. Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced plant length, pollen viability, and abiotic stress tolerance / M. Chen, J. Chen, J. Fang, [et al.] // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2014. – V.116, № 3. – P.311–322.

97. Chen Z. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling / Z. Chen, T.E. Young, J. Ling [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100, N. 6. – P. 3525–3530.
98. Cheng Y.-J. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing choline oxidase in chloroplasts against water stress / Y.-J. Cheng, X.-P. Deng, S.-S. Kwak // Bot. Stud. – 2013. – 54:30. Режим доступа: <http://www.as-botanicalstudies.com/content/54/1/30>.
99. Cheung W.Y. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses / W.Y. Cheung, N. Hubert, B.S. Landry // PCR Meths Applics. – 1993. – V.3, № 1. – P. 69–70.
100. Chhapekar S. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate / Chhapekar S., Raghavendrarao S., Pavan G. [et al.] // Plant Cell Rep. – 2015. – V.34, N 5. – P.721–731.
101. Choi S.M. Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light / S.M. Choi, S. W. Jeong, W. J. Jeong [et al.] // Planta. – 2002. – V. 216, N 2. – P. 315–324.
102. Chung B. C. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta / B. C. Chung, K. J. Matteson, R. Voutilainen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – V.83, N 23. – P. 8962-8966.
103. Cochu C.M. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability/ C.M. Cochu, M. Pilon // Physiol. Plant. – 2007. – V.129, N 4. – P. 747–755.
104. Coleman H. D. Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development / H. D. Coleman, L. Beamish, A. Reid [et al.] // Transgenic Res. – 2010. – V.19, N 2. – P.269-283.
105. Confalonieri M. Enhanced osmotic stress tolerance in *Medicago truncatula* plants overexpressing the DNA repair gene *MtTdp2a* (tyrosyl-

- DNA phosphodiesterase 2) / Confalonieri M., Faè M., Balestrazzi A., [et al.] // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2014. – V.116, N 2. – P.187–203.
106. Costa França M.G. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress / M.G. Costa França, A.T. Pham Thi, C. Pimentel [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2000. – V.43, N 3. – P. 227–237.
107. Craig W. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance / W. Craig, P. Lenzi, N. Scotti [et al.] // *Transgenic Res.* – 2008. – V.17, N 5. – P.769–782.
108. Crawford N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth / N.M. Crawford // *Plant Cell.* – 1995. – V.7, N 7. – P.859–68.
109. Crum C.J. Tobacco mosaic virus infection stimulates the phosphorylation of a plant protein associated with double-stranded RNA-dependent protein kinase activity / C.J. Crum, J. Hu, H.J. Hiddinga, D.A. Roth // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V.263, N 26. – P. 13440-13443.
110. Cui K. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L./ K. Cui, G. Xing, X. Liu [et al.] // *Plant Sci.* – 1999. – V. 146, N 1. – P. 9-16.
111. D'Halluin K. The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant engineering/ K. D'Halluin, M. De Block, J. Denecke [et al.] // *Methods in Enzymol.* – 1992. – V. 216. – P. 415 – 426.
112. Daley M. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants / M.Daley, V.C.Knauf, K.R.Summerfelt, J.C.Turner // *Plant Cell Rep.* – 1998. – V. 17, № 6–7. – P. 489–496.
113. Damgaard O. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars / O.Damgaard, L.H.Jensen, O.S.Rasmussen // *Transgen. Res.* – 1997. – V. 6, № 4. – P. 279–288.

114. Daniel H. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals / H. Daniel, N.D. Singh, H. Mason, S.J. Streatfield // Trends Plant Sci. – 2009. – V. 14, N 12. – P. 669 – 679.
115. Dayan J. Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA 2-oxidase / J. Dayan, M. Schwarzkopf, A. Avni, R. Aloni // Plant Biotechnology Journal. – 2010. – V.8, N 4. – P.425–435.
116. De Block M. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme / M. De Block, J. Botterman, M.Vandewiele [et al.]// EMBO J. – 1987. – V. 6, N 9. – P.2513–2518.
117. De Block M. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus / M.De Block, D. Debrouwer // Theor. Appl. Genet. – 1991.– V. 82, N 3. – P. 257-263.
118. De Gara L. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction / L. de Gara, M.C. de Pinto, F. Tommasi // Plant Physiol. Biochem. – 2003. – V.41, N 10. – P. 863–870.
119. De Leede L.G. Novel controlled-release *Lemna*-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial / L.G. De Leede, J.E. Humphries [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2008. – V.28, N 2. – P.113-122.
120. De Palma M. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants / M. De Palma, S. Grillo, I. Massarelli [et al.] // Mol. Breed. – 2008. – V. 21, N 1. – P. 15–26.
121. Debnath M. Responses of *Bacopa monnieri* to salinity and drought stress *in vitro* / M. Debnath // J. Med. Plant Res. – 2008. – V.2, N 11. – P.347-351.
122. Dechorgnat J. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants/ J. Dechorgnat, C.T. Nguyen, P. Armengaud [et al.] // J. Exp. Bot. – 2011. – V.62, N 4. – P. 1349–1359.

123. Dehesh K. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of *Ch FatB2*, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana* / K.Dehesh, A.Jones, D.S.Knutzon, T.A Voelker / Plant J. – 1996. – V.9, № 2. – P. 167–172.
124. Demeke T. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat / T. Demeke, P. Huel, M. Baga [et al.] // Ther.Appl.Genet. – 1999. – V. 99, № 9. – P. 947–953.
125. Demura T. Regulation of plant biomass production / T. Demura, Z.-H. Ye // Current Opinion in Plant Biology. – 2010. – V.13, N 3. – P.299–304.
126. Deng B. Ectopic expression of riboflavin-binding protein gene *TsRfBP* paradoxically enhances both plant growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* / B.Deng, H. Dong // J. Plant Growth Regul. – 2013. – V.32, N 1. – P.170-181.
127. Devash Y. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf disks is inhibited by (2'-5) oligoadenylate / Y. Devash, S. Biggs, I. Sela / Science. – 1982. – V.216. – P. 1415-1416.
128. Devi P. S. Activity of antioxidant enzymes and secondary metabolites during in vitro regeneration of *Sterculia urens* / P. S. Devi, B. Satyanarayana, A. Arundhati, T. R. Rao // Biol. Plant. – 2013. – V. 57, N 4. – P. 778-782.
129. Dhindsa R.S. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase / R.S. Dhindsa, P.Plumb-Dhindsa, T.A. Thorpe // J. Exp. Bot. – 1981. – V. 32, N 1. – P. 93-101.
130. Diaz-Vivancos P. Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants / P.Diaz-Vivancos, G. Barba-Espin, M.J.Clemente-Moreno, J.A. Hernandez // Biol. plantarum. – 2010. – V. 54, N 1. – P. 76-82.

131. Dill G.M. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations / G.M. Dill, C.A. CaJacob, S.R. Padgett // *Pest Manag. Sci.* – 2008. – V. 64, N 4. – P. 326–331.
132. Dolatabadian A. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress / Dolatabadian A., Sanavy S. A. M. M., Chashmi N. A. // *J.Agron. Crop Sci.* – 2008. – V.194, N 3. – P. 206–213.
133. Dong C. Stress-responsive gene *ICE1* from *Vitis amurensis* increases cold tolerance in tobacco / C. Dong, Z. Zhang, J. Ren [et al.] // *Plant Physiol.Biochem.* – 2013. – V.71. – P. 212–217.
134. Dong X. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*) / X. Dong, R. Ji, X. Guo [et al.] // *Planta.* – 2008. – V. 228, N 2. – P. 331-340.
135. Doty S.L. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees / S.L. Doty, C.A. James, A. L. Moore [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.104, N 43. – P.16816 – 16821.
136. Dubouzet J.G. Potential transgenic routes to increase tree biomass/ J. G. Dubouzet, T. J. Strabala, A. Wagner// *Plant Sci.* – 2013. – V. 212, N 1. – P. 72–101.
137. Dudonné S. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays / S. Dudonné, X. Vitrac, P. Coutière [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V.57, N 5. – P. 1768–1774.
138. Dugas D.V. Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases / D.V. Dugas, B. Bartel // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – V.67, N 4. – P. 403–417.
139. Ebrahimi N. Cloning, transformation and expression of human gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / N. Ebrahimi,

- H.R. Memari, M.A. Ebrahimi, M.R. Ardakani // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2012. – V.26, N 2. – P.2925–2929.
140. Eccleston V.S. Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauroyl acyl carrier protein thioesterase / V.S. Eccleston, A.M. Cranmer, T.A. Voelker, J.B. Ohlrogge // *Planta.* – 1996. – V.198, № 1. – P. 46–53.
141. Edelman A.M., Blumenthal D.K., Krebs E.G. Protein serine/threonine kinases / A.M. Edelman, D.K. Blumenthal, E.G. Krebs // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – V.56. – P. 567-613.
142. Egami T. The effects of introduction of a fungal *glutamate dehydrogenase* gene (*gdhA*) on the photosynthetic rates, biomass, carbon and nitrogen contents in transgenic potato / T. Egami, M. Wakayama, N. Aoki [*et al.*] // *Plant Biotechnol.* – 2012. – V. 29, N 1. – P. 57–64.
143. Erdal S. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants/ S. Erdal, R. Dumlupinar // *Acta Physiol. Plant.* – 2011. – V.33, N 3. – P.1011–1017.
144. Eriksson M. E. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length / M. E. Eriksson, M. Israelsson, O. Olsson, T. Moritz // *Nature Biotechnol.* – 2000. – V.18, N 7. – P. 784–788.
145. EU register of genetically modified food and feed. Oilseed rape GT73. Art. 8(1)(a),(b) and 20(1)(b) of the Regulation (EC) No 1829/2003 Article 19(3) of Directive 2001/18/EC.
146. Event name: 5307 x MIR604 x Bt11 xTC1507 x GA21 x MIR162 [Электронный ресурс]. Режим доступа: [<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=331&Event=5307%20x%20MIR604%20x%20Bt11%20x%20TC1507%20x%20GA21%20x%20MIR162>].

147. Facciotti M.T. Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase / M.T. Facciotti, P.B. Bertain, L. Yuan // *Nat. Biotech.* – 1999. – V. 17. – P. 593–597.
148. Faize M. Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enhance *in vitro* shoot multiplication in transgenic plum / M. Faize, L. Faize, C. Petri [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2013. – V.170, N 7. – P.625-632.
149. Falcone D.L. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alternations in membrane lipid composition [Электронный ресурс] / D.L. Falcone, J.P. Ogas, C.R. Somerville // *BMC Plant Biol.* – 2004. – V.4: 17. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/17>.
150. FAOSTAT [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QD/E>.
151. Farooq M. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.) / M. Farooq, S.M.A. Basra, A. Wahid [et al.] // *J. Agronomy Crop Sci.* – 2008. – V.194, N 5. – P.325–333.
152. Farwell A. J. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site / A. J. Farwell, S. Vesely, V. Nero [et al.] // *Environ. Pollution.* – 2007. – V.147, N3. – P.540-545.
153. Fazelli F. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars / F. Fazelli, M. Ghorbanli, V. Niknam // *Biol. Plant.* – 2007. – V.51, N 1. – P. 98-103.
154. Feng W. Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.) / W. Feng, W. Hongbin, L. Bing, W. Jinfa // *Plant Cell Rep.* – 2006. – V. 24, N 12. – P. 734–742.

155. Foreman J. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth / J. Foreman, V. Demidchik, J.H. Bothwell [et al.] // *Nature*. – 2003. – V. 422, N 6930. – P. 442-446.
156. Fouad W. M. Transplastomic expression of bacterial l-aspartate- α -decarboxylase enhances photosynthesis and biomass production in response to high temperature stress / W. M. Fouad, F. Altpeter // *Transgenic Res.* – 2009. – V.18, N 5. – P.707-718.
157. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. / I. Fridovich // *J. Biol.Chem.* – 1989. – V. 264, № 14. – P. 7761–7764.
158. Fry J. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors / J. Fry, A. Barnason, K.B. Horsch // *Plant Cell Repts.* – 1987. – V. 6, № 5. – P. 321–326.
159. Fu C. Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production / Fu C., Sunkar R., Zhou C. [et al.] // *Plant Biotech. J.* – 2012. – V.10, N 4.– P.443–452.
160. Fuchs J. A noninvasive platform for imaging and quantifying oil storage in submillimeter tobacco seed / J. Fuchs, T. Neuberger, H. Rolletschek [et al.] // *Plant Physiol.* – 2013. – V. 161, №2. – P. 583–593.
161. Funke T. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops / T.Funke, H.Han, M. L. Healy-Fried [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. –V.103, N 35. – P.13010-13015.
162. Galvez Ranilla L. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America / L.Galvez Ranilla, Y.-In Kwon, E. Apostolidis, K. Shetty // *Bioresource Technol.* – 2010. – V.101, N 12. – P. 4676–4689.
163. Garces R. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues / R.Garces, M.Mancha // *Anal. Biochem.* – 1993. – V.211, № 1. – P.139 –143.

164. Garchery C. A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit / C. Garchery, N. Gest, P. T. Do [et al.]// *Plant Cell Environ.* – 2013. – V.36, N 1. – P.159–175.
165. Gerasymenko I.M. Multiplex PCR assay for detection of human interferon alpha 2b gene in transgenic plants / I.M. Gerasymenko, L.O. Sakhno, M.G. Mazur, Y.V. Sheludko // *Цитология и генетика.* – 2012. – V.46, N 4. – P.3-8.
166. Gerasymenko I.M. Obtaining and analysis of tobacco, lettuce, and rape plants transformed with human interferon alpha 2b gene / I.M.Gerasymenko, N.M. Лурова, L.A. Sakhno [et al.] – *Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А.* – Київ: Логос. – 2009. – Т.7. – С.274–279.
167. Ghasemi K.. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues / K. Ghasemi, Y. Ghasemi, M.A. Ebrahimzadeh // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2009. – V. 22, N 3. – P.277-281.
168. Giannopolitis C. N. Superoxide dismutases. II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiol.* – 1977. – V. 59, N 2. – P. 315-318.
169. Gill T. Over-expression of *Potentilla* superoxide dismutase improves salt stress tolerance during germination and growth in *Arabidopsis thaliana* / T. Gill, S. Kumar, P.S. Ahuja, Y. Sreenivasulu // *J Plant Genet & Transgenics.* – 2010. – V.1, N 1. – P. 1-10.
170. Goma A.M. Response of transgenic rape plants bearing the *Osmyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature / A.M. Goma, G. N. Raldugina, N. A. Burmistrova [et al.] // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2012. – V.59, N 1. – P.105-114.
171. Good A.G. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase / A.G. Good, S.J. Jonson, M. de Pauw [et al.] // *Can.J.Bot.* – 2007. – V.85, N 3. – P. 252-262.

172. Gou J. Tissue-specific expression of *Populus* C19 GA 2-oxidases differentially regulate above- and below-ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations / J. Gou, C. Ma, M. Kadmiel [et al.] // *New Phytologist*. – 2011. – V.192, N 3. – P. 626–639.
173. Green J.M. The benefits of herbicide-resistant crops/ J.M. Green // *Pest Manag. Sci.* – 2012. – V. 68, N 10. – P.1323-1331.
174. Green J.M. Transitioning from single to multiple herbicide-resistant crops / J.M.Green, L.A.Castle // In: *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management* (ed. By Nandula V.K.) – 2010. – P. 67-88.
175. Groom O.J. *rbohA* a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene / O.J. Groom, M.A. Torres, A.P. Fordhamskelton [et al.] // *Plant J.* – 1996. – V.10, N 3. – P. 515-522.
176. Guan Z.J. Morphological and physiological characteristics of transgenic cherry tomato mutant with *HbsAg* gene / Z.J. Guan, B.Guo, Y.I. Huo [et al.] // *Rus.J.Genetics*. – 2011. – V.47, N 8. – P. 923-930.
177. Guo J.-C. Isopentenyl transferase gene (*ipt*) downstream transcriptionally fused with gene expression improves the growth of transgenic plants / J.-C.Guo, R.-J. Duan, X.-W. Hu [et al.] // *Transgenic Res.* – 2010. – V.19, N 2. – P.197-209.
178. Guo M. Maize *ARGOS1* (*ZARI*) transgenic alleles increase hybrid maize yield / M. Guo, M.A. Rupe, J. Wei [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2014. – V. 65, N 1. – P. 249–260.
179. Guo W. A soybean b-expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses / W. Guo, J. Zhao, X. Li [et al.] // *Plant J.* – 2011. – V.66, N 3. – P.541–552.
180. Guo Z. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity/ Z. Guo, W. Ou, S. Lu, Q. Zhong // *Plant Physiol. Biochem.* – 2006. – V.44, N 11-12. – P.828–836.

181. Gupta S.A. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase / S.A. Gupta, J.I. Heinen, A.S. Holaday [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90, N 4. – P.1629-1633.
182. Gupta S.A. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants) / S.A. Gupta, R.P. Webb, A.S. Holaday, R.D. Allen // Plant Physiol. – 1993. – V.103, N 4. – 1067-1073.
183. Gupta V. Genetic transformation of *Brassica nigra* by *Agrobacterium* based vector and direct plasmid uptake / V. Gupta, G.L. Sita, M.S. Shaila, V. Jagannathan // Plant Cell Repts. – 1993. – V.12, N 7. – P. 418-421.
184. Gusta L.V. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology / L.V.Gusta, N.T.Benning, G.Wu [et al.] // Mol Breed. – 2009. – V.24, № 2. – P.103–115.
185. Halvorsen B.L. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants / B.L. Halvorsen, K. Holte, M.C.W. Myhrstad // J. Nutr. – 2002. – V.132, N 3. – P. 461–471.
186. Han J. Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. / J. Han, W. Lühs, K. Sonntag [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2001. – V.46, № 2. – P. 229–239.
187. Hanukoglu I. Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system / I. Hanukoglu, R.Rapoport, L.Weiner, D. Sklan // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. –V. 305, N 2. – P. 489–498.
188. Hasanuzzaman M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor / Hasanuzzaman M., Hossain A.M., Teixeira da Silva J.A., Fujita M.// In: B. Venkateswarlu et al. (eds.). Crop stress and its management: perspectives and strategies. Springer Netherlands; 2012. – P.261-315.

189. Hassanein A.M.A. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium* / A.M.A. Hassanein // J. Hortic. Sci.&Ornam. Plants. – 2010. – V.2, N 1. – P.8-15.
190. Havaux M. Loss of chlorophyll with limited reduction of photosynthesis as an adaptive response of Syrian barley landraces to high-light and heat stress / M. Havaux, F. Tardy // Aust. J. Plant Physiol. – 1999. – V.26, N 6. – P. 569–578.
191. Hawkins D.J. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola / D.J. Hawkins, J.C. Kridl // Plant J. – 1998. – V.13, N 6. – P. 743–752.
192. He C. Enhancement of drought resistance and biomass by increasing the amount of glycine betaine in wheat seedling / C. He, W. Zhang, Q. Gao [et al.] // Euphytica. – 2011. – V.177, N 2. – P.151-167.
193. He S. *In vitro* selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl / S. He, Y.Han, Y. Wang [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2009. – V. 96, N 1. – P.69–74.
194. Heikkila R.E. *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate / R.E.Heikkila, F.S.Cabbat, G.Cohen // J. Biol. Chem. – 1976. – V.251, № 7. – P.2182-2185.
195. Hemavathi. Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses / Hemavathi, C.P. Upadhyaya, N. Akula [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2010. – V. 32, N 2. – P. 321-330.
196. Herbicide tolerance technology: glyphosate and glufosinate [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/10/default.asp>.
197. Hervé C. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein gene and a selectable marker gene /

- C.Hervé, D.Rouan, P.Guerche [et al.] // *Plant Sci.* – 1993. – V.91, N 2. – P.181–193.
198. Hong H.P. The promoter of a *Brassica napus* polygalacturonase gene directs pollen expression of β -glucuronidase in transgenic *Brassica* plants / H.P. Hong, L.J. Gerster, R.S.S. Datla [et al.] // *Plant Cell Repts.* – 1997. – V. 16, № 6. – P. 373–378.
199. Horsch R. B. A simple and general method for transferring genes into plants / R. B.Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffmann [et al.] // *Science.* – 1985. – V. 227, N 4691. – P. 1229-1231.
200. Huang B. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos / B. Huang // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1992. – V. 28, N 2. – P. 53–58.
201. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance / K. Iba // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – V.53. – P. 225–245.
202. Ingot A.D. The hormonal concept of interferon / A.D. Ingot // *Arch. Virol.* – 1983. – V.76, N 1. – P. 1-13.
203. Iqbal N. Modulation of endogenous levels of some key organic metabolites by exogenous application of glycine betaine in drought stressed plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.)/ N. Iqbal, Y. Ashraf, M. Ashraf // *Plant Growth Regul.* – 2011. – V.63, N 1. – P.7–12.
204. Ishizaki-Nishizawa O. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase / O. Ishizaki-Nishizawa, T. Fujii, M. Azuma [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 1996. – V.14, № 8. – P.1003-1006.
205. Jackson C. Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants/ C. Jackson, J. Dench, A. L. Moore [et al.] // *Europ.J. Biochem.* – 1978. – V. 91, N. 2. – P. 339–344.

206. Jain A.K. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants / A.K. Jain, C.L. Nessler // *Mol. Breed.* – 2000. – V. 6, N 1. – P. 73-78.
207. Jaleel C.A. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints / C.A. Jaleel, K. Riadh, R. Gopi [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2009. – V.31, N 3. – P.427–436.
208. James C. ISAAA Briefs: Preview, Global Status of Commercialized Transgenic Crops / C. James // *ISAAA Briefs 30*, ISAAA, Ithaca, NY // 2003. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/30/default.html>.
209. Janeczko A. The presence and activity of progesterone in the plant kingdom/ A. Janeczko // *Steroids.* – 2012. – V.77, N 3. – P.169–173.
210. Jardak-Jamoussi R. The use of phosphinothricin resistance as selectable marker for genetic transformation of grapevine / R. Jardak-Jamoussi, B. Bouamama, A. Mliki [et al.] // *Vitis.* – 2008. – V.47, N 1. – P.35–37.
211. Jiang F. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair / F. Jiang, Y. Zhang, G.J. Dusting // *Pharmacol Rev.* – 2011. – V.63. – P.218-242.
212. Jiang J. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment / Jiang J., Su M., Chen Y. [et al.] // *Biologia.* – 2013. – V.68, N 2. – P. 231–240.
213. Jiang M. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves / M. Jiang, J. Zhang // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V.53, N 379. – P.2401-2410.
214. Jiang Y. Overexpression of *GhSusA1* increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality / Y. Jiang, W. Guo, H. Zhu [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – V.10, N 3. – P.301–312.

215. Jiang Y. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation / Y. Jiang, B. Huang // *Crop Sci.* – 2001. – V. 41, N 2. – P. 436–442.
216. Jin S. Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of β -glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters / S. Jin, A. Kanagaraj, D. Verma [et al.] // *Plant Physiol.* – 2011. – V.155, N 1. – P. 222–235.
217. Jin S.H. Genotypic differences in the responses of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes to Aluminium stress in *Festuca arundinacea* / S.H. Jin, X.Q. Li, X.I. Jia // *Физиология растений.* – 2011. – V.58, N 4. – С.502-508.
218. Joensuu J. J. Transgenic plants for animal health: plant-made vaccine antigens for animal infectious disease control / J. J. Joensuu, V. Niklander-Teeri, J. E. Brandle // *Phytochem. Rev.* – 2008. – V. 7, N 3. – P. 553–577.
219. Jung S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought/ S. Jung// *Plant Sci.* – 2004. – V. 66, N 2. – P. 459–466.
220. Kähkönen M.P. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds / M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, H. J. Vuorela [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – V.47, N 10. – P.3954–3962.
221. Kahrizi D. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate / D.Kahrizi, A.H.Salmanian, A. Afshari [et al.] // *Plant Cell Repts.* –2007. – V.26, № 1. – P.95–104.
222. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins / T. Kakimoto // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – V.54. – P. 605–627.
223. Kanematsu S. Cu/zn-superoxide dismutases in rice: occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-

- photosynthetic tissues / S. Kanematsu, K. Asada // *Plant Cell Physiol.* – 1989. – V. 30, N. 3. – P. 381–391.
224. Kang H.-M. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles / H.-M. Kang, M.E. Saltveit // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – V.50, N 3. – P. 513-518.
225. Kang H.-M. Effect of chilling on antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity of high- and low-vigour cucumber seedling radicles / H.-M. Kang, M.E. Saltveit // *Plant Cell Environ.* – 2002. – V. 25, N 10. – P.1233–1238.
226. Karaba A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene / A. Karaba, S. Dixit, R. Greco [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.104, N 39. – P.15270–1527.
227. Karuppanapandian T. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms / T. Karuppanapandian, J.-C. Moon, C. Kim [et al.] // *Aust. J. Crop Sci.* – 2011. – V. 5, N 6. – P. 709-725.
228. Kawahigashi H. Transgenic rice plants expressing human P450 genes involved in xenobiotic metabolism for phytoremediation / H. Kawahigashi, S. Hirose, H. Ohkawa, Y. Ohkawa // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 15, N.2-3. – P. 212 – 219.
229. Kebeish R. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana* / R. Kebeish, M. Niessen, K. Thiruveedhi [et al.] // *Nature biotechnol.* – 2007. – V. 25, N 5. – P.593-599.
230. Keller T. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs / T. Keller, H.G. Damude, D. Werner [et al.] // *Plant Cell.* – 1998. – V.10, N 2. – P. 255–266.

231. Kelly A.A. Suppression of the *SUGAR-DEPENDENT1* triacylglycerol lipase family during seed development enhances oil yield in oilseed rape (*Brassica napus* L.) / A.A. Kelly, E. Shaw, S.J. Powers [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2013. – V.11, N 3. – P.355-361.
232. Kim M. D. Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the *CuZnSOD*, *APX* and *NDPK2* genes / M. D. Kim, Y.-H. Kim, S.-Y. Kwon [et al.] // *Physiol. Plantarum.* – 2010. – V.140, N 2. – P. 153–162.
233. Kim Y.-H. Expression of Arabidopsis *NDPK2* increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants / Kim Y.-H., Lim S., Yang K.-S. // *Mol. Breed.* – 2009. – V. 24, № 3. – P. 233–244.
234. Kim Y.-S. Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) / Y.-S. Kim, I.-S. Kim, M.-J. Bae [et al.] // *Planta.* – 2013. – V.237, N 6. – P.1613-1625.
235. Kingston A.H. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities/ A.H. Kingston, C.H. Foyer // *J.Exp. Bot.* – 2000. – V.51, N 352. – P.1867-1877.
236. Király L. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase / L. Király, Y.M. Hafez, J. Fodor, Z. Király // *J. Gen. Virol.* – 2008. – V.89, N 3. – P.799–808.
237. Kliebenstein D.J. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization/ D.J. Kliebenstein, R.A. Monde, R.L. Last // *Plant Physiol.* – 1998. – V.118, N 2. – P.637-650.

238. Knutzon D.S. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearol-acyl carrier protein desaturase gene / D.S. Knutzon, G.A.Thompson, S. E. Radke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89, N 7. – P. 2624 – 2628.
239. Koba K. Genetically modified rapeseed oil containing cis-9, trans-11, cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice / K. Koba, J. Imamura, A. Akashoshi [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – V. 55, № 9. – P 3741–3748.
240. Kodama H. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast *w*-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco / H.Kodama, T.Hamada, C.Horiguchi [et al.] // Plant Physiol. – 1994. – V.105, N2.– P. 601–605.
241. Kulaeva O.N. Biological activities of human interferon and 2'-5' oligoadenylates in plants / O.N. Kulaeva, A.B. Fedina, E.A. Burkhanova [et al.] // Plant Mol Biol. – 1992. – V.20, N 3. – P.383-393.
242. Kuluev B.R. Constitutive expression of the *ARGOS* gene driven by dahlia mosaic virus promoter in tobacco plants / B.R. Kuluev, A.V. Knyazev, A.A.Iljassowa, A.V. Chemeris // Rus. J. Plant Physiol. – 2011. – V.58, N 3. – P. 507-515.
243. Kumar A. *Arabidopsis thaliana* expressing a thermostable chimeric Rubisco activase exhibits enhanced growth and higher rates of photosynthesis at moderately high temperatures / A. Kumar, C. Li, A. R. Portis // Photosynthesis Res. – 2009. – V.100, N 3. – P.143-153.
244. Kuwano Y. Interferon- γ activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells / Y. Kuwano, T. Kawahara, H. Yamamoto [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2006. – V.290, N 2. – P.433–443.
245. Kvasko O.Yu. Increasing of antioxidant and superoxide dismutase activity in chicory transgenic plants / O.Yu. Kvasko, N.A. Matvieieva // Biopolym. Cell. – 2013. – V.29, N 2. – P.163-166.

246. Langland J.O. Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein-kinase / J.O. Langland, S. Jin, B.L. Jacobs, D.A. Roth // *Plant Physiol.* – 1995. – V.108, N 3. – P.1259–1267.
247. Lascano H.R. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies / H.R. Lascano, G.E. Antonicelli, C.M. Luna [et al.] // *Austr. J. Plant Physiol.* – 2001. – V.28, N 11. – P.1095–1102.
248. Lassner M.W. Lysophosphatidic acid acyltransferase from Meadow foam mediates insertion of erucic acid at the *sn*-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil / M.W. Lassner, C.K. Levering, H.M. Davies, D.S. Knutzon // *Plant Physiol.* – 1995. – V.109, N 4. – P. 1389–1394.
249. Latef A.A.H.A. Ameliorative effect of calcium chloride on growth, antioxidant enzymes, protein pattern and some metabolic activity of canola (*Brassica napus* L.) under seawater stress / A.A.H.A. Latef // *J.Plant Nutrition.* – 2011. – V.34, N 9. – P.1303-1320.
250. Lea P.J. The action of 2-amino-4-(methylphosphiny)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxoderivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants / P.J. Lea, K.W. Joy, J.L. Ramos, M.G. Guerrero // *Phytochem.* – 1984. – V.23, N 1. – P.1–6.
251. Lee S.E. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity / S.E. Lee, H.J. Hwang, J.S. Ha [et al.] // *Life Sci.* – 2003. – V.73, N 2. – P. 167–179.
252. Lee S.Y. Inheritance and expression of transgene in SOD2-Transgenic petunia descendants and their morphological traits / S.Y. Lee, B.H. Han, A.Y. Cho // *J. Plant Biotech.* – 2009. – V.36, N 3. – P.289–293.
253. Lee S.Y. Transfer of SOD2 or NDP kinase 2 genes into purebred lines of petunia / S.Y. Lee, B.H. Han, E.W. Noh, S.S. Kwak // *J. Plant Biotech.* – 2009. – V.36, N 2. – P.144–148.

254. Lee Y.P. Improved tolerance of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase expressing transgenic tobacco seeds and seedlings against multiple abiotic stresses / Y.P. Lee, R. Ahmad, H.S. Lee [et al.] // *Int. J. Agric. Biol.* – 2013. – V.15, № 4. – P. 725–730.
255. Li C. Enhanced drought tolerance of tobacco overexpressing *OjERF* gene is associated with alteration in proline and antioxidant metabolism / C. Li, L.-B. Han, X. Zhang // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2012. – V. 137, N 2. – P. 107–113.
256. Li M. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis reduces heat-enhanced photoinhibition by enhancing antioxidative defense and alleviating lipid peroxidation in tomato / M. Li, Z. Li, S. Li [et al.] // *Plant Mol Biol Rep.* – 2014. – V. 32, N 1. – P.42-51.
257. Li X. Purple canola: *Arabidopsis PAPI* increases antioxidants and phenolics in *Brassica napus* leaves / X. Li, M.-J. Gao, H.-Yu. Pan [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – V.58, N 3. – P. 1639–1645.
258. Liang C.-Y. Characterization of two putative protein phosphatase genes and their involvement in phosphorus efficiency in *Phaseolus vulgaris* / C.-Y. Liang, Z.-J. Chen, Z.-F. Yao [et al.] // *J. Integrat. Plant Biol.* – 2012. – V.54, N 6. – P.400–411.
259. Libik M. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant/ M. Libik, R. Konieczny, B. Pater [et al.]// *Plant Cell Rep.* – 2005. – V.23, N 12. – P.834–841.
260. Libik-Konieczny M. The localization of NADPH oxidase and reactive oxygen species in *in vitro*-cultured *Mesembryanthemum crystallinum* L. hypocotyls discloses their differing roles in rhizogenesis / M. Libik-Konieczny, M. Kozieradzka-Kiszkurno, C. Desel [et al.]// *Protoplasma.* – 2015. – v. 252, N 2. – P.477–487.

261. Lim P.O. Multiple virus resistance in transgenic plants conferred by the human dsRNA-dependent protein kinase / P.O. Lim, U. Lee, J.S. Ryu [et al.] // Mol Breed. – 2002. – V.10, N 1. – P.11-18.
262. Liu C. Expression of a rice *CYP81A6* gene confers tolerance to bentazon and sulfonylurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco / C. Liu, S. Liu, F. Wang [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – V. 109, N 3. – P. 419-428.
263. Liu H. Expression of a wheat MYB gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*, and to drought and salt stresses / H. Liu, X. Zhou, N. Dong // Functional & Integrative Genomics. – 2011. – V. 11, N 3. – P 431-443.
264. Liu H. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots / H. Liu, Q. Wang, M. Yu [et al.] // Plant Cell Environ. – 2008. – V.31, N 9. – P.1325–1334.
265. Liu J.-W. Characterization of oil exhibiting high γ -linolenic acid from a genetically transformed canola strain / J.-W. Liu, S. DeMichele, M. Bergana [et al.] // J. Amer. Oil Chem. Soc. – 2001. – V.78, N 5. – P. 489 – 493.
266. Liu M. Transgenic expression of *ThIPK2* gene in soybean improves stress tolerance, oleic acid content and seed size / M. Liu, D. Li, Z. Wang [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – V.111, N 3. – P.277-289.
267. Logermann J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues / J. Logermann, J. Schell, L. Willmitzer // Anal. Biochem. – 1987. – V.163, № 1. – P. 16–20.
268. Lohar D.P. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker / D.P.Lohar, K.Schuller, D. M. Buzas [et al.] // J. Exp. Bot. – 2001. – V. 52, N 361. – P.1697–1702.

269. Los D. A. Structure and expression of fatty acid desaturases / D.A. Los, N. Murata // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – V.1394, № 1. – P.3–15.
270. Lowther W. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* / W. Lowther, K. Lorick [et al.] // *Transgenic Res.* – 2012. – V.21, N 6. – P.1349-1357.
271. Lu G. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells / G. Lu, I. Shimizu, X. Cui [et al.] // *J. Medical Investigation*. – 2002. – V.49, N3-4. – P. 172-181.
272. Lü J. Improved phosphorus acquisition by tobacco through transgenic expression of mitochondrial malate dehydrogenase from *Penicillium oxalicum* / J. Lü, X. Gao, Z. Dong [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2012. – V.31, N 1. – P. 49-56.
273. Lu S. Antioxidant responses of radiation-induced dwarf mutants of bermudagrass to drought stress / S. Lu, Z. Wang, Y. Niu et al. // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2008. – V.133, N 3. – P.360–366.
274. Luchakivskaya Yu. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants / Yu. Luchakivskaya, O. Kishchenko [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2011. – V.30, N 3. – P.407–415.
275. Lühs W. Breeding high-erucic acid rapeseed by means of *Brassica napus* resynthesis / W. Lühs, W. Friedt // *Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.* – Cambridge, 1995. – P. 449–451.
276. Luo J.-P. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities / K. Cui, G. Xing, X. Liu [et al.] // *Plant Sci.* – 2001. – V. 161, N 1. – P. 125-132.
277. Luo X. Synergistic effects of *GhSOD1* and *GhCAT1* overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses / X. Luo, J. Wu, Y. Li, [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – V.8, N 1. –

e54002.

Режим

доступу:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054002>

278. Ma L. Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of *Musa AAA* cv. Yueyoukang 1 / L. Ma, L. Xie, G. Lin [et al.] // *Sci. Hortic.* – 2012. – V. 144, N. – P. 87–92.
279. Ma X.-F. Transgenic expression of phytase and acid phosphatase genes in alfalfa (*Medicago sativa*) leads to improved phosphate uptake in natural soils / X.-F. Ma, S. Tudor, T. Butler [et al.] // *Mol. Breed.* – 2012. – V.30, N 1. – P.377-391.
280. Maali A.R. Acyl-lipid Δ 12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) / A.R.Maali, I.V.Goldenkova-Pavlova, V.D.Pchelkin [et al.] // *Biologia.* – 2007. – V.53, N 2. – P. 4–7.
281. Madi L. Stress on avocado fruits regulates Δ 9-stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack / L. Madi, X. Wang, I. Kobiler [et al.] // *Physiol. Mol.Plant Pathol.* – 2003. – V. 62, N 5. – P. 277–283.
282. Mäkelä P. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity/ P. Mäkelä, J. Kärkkäinen, S. Somersalo // *Biol. Plant.* – 2000. – V.43, N 3. – P.471-475.
283. Maleki M. The effect of drought stress and exogenous abscisic acid on growth, protein content and antioxidative enzyme activity in saffron (*Crocus sativus* L.) / M. Maleki, H. Ebrahimzade, M. Gholami, V. Niknam // *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – V.10, N 45. – P. 9068-9075.
284. Malenčić D. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts / D. Malenčić, Z. Maksimović, M. Popović, J. Miladinović // *Bioresource Technol.* – 2008. – V.99, N 14. – P. 6688–6691.

285. Manabe Y. CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana* / Y. Manabe, N.Tinker, A. Colville, B. Miki // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V.48, N 9. – P. 1340–1358.
286. Manickavasagam M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds / M. Manickavasagam, A. Ganapathi, V.R. Anbazhagan [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2004. – V.23, N 3. – P.134-143.
287. Marino D. A burst of plant NADPH oxidases / D. Marino, C. Dunand, A. Puppo, N. Pauly // *Trends Plant Sci.* – 2012. – V.17, N 1. – P.9–15.
288. Martin A. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production / A. Martin, J. Lee, T. Kichey [et al.] // *Plant Cell.* – 2006. – V.18, N 11. – P.3252–3274.
289. Martinez C.A. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress / C.A. Martinez, M.E. Loureiro, M.A. Oliva, M. Maestri // *Plant Sci.* – 2001. – V.160. – P.505–515.
290. Martins L.L. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts / L.L. Martins, M.P. Mourato, A.I. Cardoso [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2011. – V.33, N 4. – P. 1375–1383.
291. Masumura T. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice / T. Masumura, S. Morita, Y. Miki [et al.] // *Plant Biotechnol.* – 2006. – V.23, N 1. – P.91-97.
292. Matamoros M.A. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits / M.A. Matamoros, J. Loscos, K.-J. Dietz [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2010. – V.61, N 1. – P. 87-97.
293. Mattson F.N. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats / F.N. Mattson, R.A. Volpenhein // *J. Biol. Chem.* – 1961. – V.236, № 7. – P. 1891–1894.

294. Matvieieva N.A. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon $\alpha 2b$ gene / N.A. Matvieieva, Yu.I. Kudryavets, A.A. Likhova [et al.] // Cytol. Genet. – 2012. – V.46, N 5. – P.285–290.
295. Matvieieva N.A. Edible vaccines produced by transgenic chicory, canola and tomato / N.A.Matvieieva, L.A.Sakhno, V.A.Rudas, A.M.Shachovsky, M.J.Spivak, M.V.Kuchuk // Україно-німецький симпозиум з фізики та хімії наноструктур та нанотехнологій. Берегове, Україна, 6-10 вересня 2010: К., вид-во НВК «Комункомплекс Україна», 2010. – С.216.
296. McAllister C. H. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status / C.H. McAllister, P.H. Beatty, A.G. Good // Plant Biotechnol. J. – 2012. – V.10, N 9. – P. 1011–1025.
297. McCord J.M. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin) / J.M. McCord, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1969. – V. 244, N 22. – P.6049–6055.
298. McKersie B.D. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase / B.D. McKersie, S.R. Bowley S.R., E. Harjanto, O. Leprince // Plant Physiol. – 1996. – V.111. – P.1177-1181.
299. McKersie B.D. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase / B.D. McKersie, S.R. Bowley, K.S. Jones // Plant Physiol. – 1999. – V.119, N 3. – P.839-848.
300. Miki B. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety / B.Miki, S.McHugh // J. Biotechnol. – 2004. – V.107, № 3. – P.193–232.
301. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler// Trends Plant Sci. – 2002. – V.7, N 9. – P. 405-410.
302. Mittova V. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased

- activities of antioxidant enzymes in root plastids / V. Mittova, M. Guy, M. Tal, M. Volokita // *Free Radic. Res.* – 2002. – V.36, N 2. – P.195–202.
303. Mohammadkhani N. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties / N. Mohammadkhani, R. Heidari // *Turk. J. Biol.* – 2008. – V.32, N 1. – P.23-30.
304. Molina-Rueda J.J. The *Populus* superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a) / J.J. Molina-Rueda, C.J. Tsai, E.G. Kirby // *PLOS ONE.* – 2013. – V.8: e56421. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056421>.
305. Moloney M.M. High efficiency transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* vectors / M.M. Moloney, J.M. Walker, K.K. Sharma // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 8, № 4. – P. 238–242.
306. Morgan M.J. Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis / M.J. Morgan, M. Lehmann, M. Schwarzländer [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – V.147, N 1. – P. 101–114.
307. Morinaka Y. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice / Y. Morinaka, T. Sakamoto, Y. Inukai [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – V.141, N 3. – P. 924–931.
308. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.Murashige, F.Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473–497.
309. Myouga F. A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* / F. Myouga, C. Hosoda, T. Umezawa [et al.]// *Plant Cell.* – 2008. – V.20, N 12. – P. 3148–3162.

310. Naqvi S. When more is better: multigene engineering in plants / S.Naqvi, Farré G., Sanahuja G. // Trends in Plant Sci. – 2009. – V.15, N 1.– P.48–56.
311. Nath U.K. Inheritance and variation of erucic content in a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) doubled haploid population / U.K. Nath, G. Gosmani, R. Clemens [et al.] // Mol. Breed. – 2009. – V. 23, N 1. – P. 125–138.
312. Nath U.K. Increasing erucic acid content through combination of endogenous low polyunsaturated fatty acids alleles with *Ld_LPAAT+Bn-fae1* transgenes in rapeseed (*Brassica napus* L.) / U.K. Nath, J. A.Wilmer, E.J. Wallington [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2009. – V.118, N 4. – P. 765–773.
313. Nicolia A. Expression of an evolved engineered variant of a bacterial glycine oxidase leads to glyphosate resistance in alfalfa / A. Nicolia, N. Ferradini, G. Molla [et al.] // J. Biotechnol. – 2014. – V.184. – P.201–208.
314. Novikova L. A. From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering / L. A. Novikova, A. V. Faletrov, I. E. Kovaleva [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2009. – V. 74, N 13. – P.1482-1504.
315. Nunes C. Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv Jemalong to water deficit / C. Nunes, S. de Sousa-Araujo, J. Marques da Silva [et al.] // Environ. Exp. Bot. – 2008. – V.63, N 1-3. – P.289–296.
316. Oberdoerfer R. B. Rice (*Oryza sativa* L.) containing the *bar* gene is compositionally equivalent to the nontransgenic counterpart / R. B. Oberdoerfer, R.D. Shilito, M. De Beuckleer, D.H. Mitten // J. Agric. Food Chem. – 2005. – V. 53, N. 5. – P.1457-1465.
317. Ohya K. Expression of two subtypes of human IFN alpha in transgenic potato plants/ K. Ohya, T. Matsumura, K. Ohashi [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – V.21, N 8. – P.595-602.

318. Olhoft P.M. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells / P.M. Olhoft, K. Lin, J. Galbraith [et al.] // *Plant Cell Repts.* – 2001. – V. 20, N 8. – P. 731–737.
319. Öncel I. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants / I. Öncel, E. Yurdakulol, Y. Keleş [et al.]//*Acta Oecologica.* – 2004. – V.26. – P. 211–218.
320. Orchansky P. Human interferons protect plants from virus infection / P. Orchansky, M. Rubinstein, I. Sela // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – V.79, N 7. – P.2278-2280.
321. Orlova I.V. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants / I.V.Orlova, T.S.Serebriiskaya, V. Popov [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – V.44, N 4. – P. 447–450.
322. Ortega J.L. Constitutive overexpression of cytosolic *glutamine synthetase (GS1)* gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover / J.L. Ortega, S.J. Temple, C. Sengupta-Gopalan // *Plant Physiol.* – 2001. – V.126, N 1. – P.109–121.
323. Pan Y. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) / Y. Pan, L.J. Wu, Z.L. Yu // *Plant Growth Regul.* – 2006. – V.49, N 2. – P.157–165.
324. Panda S. K. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress / S. K. Panda, M.H. Khan // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2004. – V.16, N 2. – P.115-118.
325. Pandey P. Water deficit and aluminum tolerance are associated with a high antioxidative enzyme capacity in Indica rice seedlings / P. Pandey,

- R.K. Srivastava, R.S. Dubey // *Protoplasma*. – 2014. – V.251, N 1. – P.147-160.
326. Parida A. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures / A. Parida, A.B. Das, P. Das // *J. Plant Biol.* – 2002. – V.45, N 1. – P.28-36.
327. Park J. The impact of the EU regulatory constraint of transgenic crops on farm income/ J. Park, I. McFarlane, R. Phipps, G. Ceddia // *New Biotechnol.* – 2011. – V. 28, N 4. – P. 396-406.
328. Park S. Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination / S. Park, K. Back // *J. Pineal Res.* – 2012. – V.53, N 4. – P.385–389.
329. Patrick J. W. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants / J. W. Patrick, F. C. Botha, R. G. Birch // *Plant Biotechnol. J.* – 2013. – V.11, N 2. – P.142–156.
330. Percy R. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. / R. Percy // *Plant Physiol.* – 1978. – V. 61, N 4. – P. 484–486.
331. Pechan P.M. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium* / P.M.Pechan // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 8, N 7. – P. 387–390.
332. Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn / S. Pestka // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V.282, N 28. – P.20047–20051.
333. Peterhansel C. Metabolic Engineering Towards the Enhancement of Photosynthesis / C. Peterhansel, M. Niessen, R.M. Kebeish // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – V.84, N 6. – P.1317–1323.
334. Phillips B.E. Glycerides of *Limnanthes douglasii* seed oil / B.E. Phillips, C.R. Smith, W.H. Tallent // *Lipids.* – 1971. – V.6, N 2. – P. 93–99.

335. Phogat S.K. High frequency regeneration of *Brassica napus* varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restorer genes for two cytoplasmic male sterility systems / S.K. Phogat, P.K.Burma, D.Pental // J. Plant Biochem. Biothechnol. – 2000. – V. 9, N 2. – P. 73–79.
336. Pilon M. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases/ M. Pilon, K. Ravet, W. Tapken // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V.1807, N 8. – P. 989-998.
337. Pilon-Smits E. A. H. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress / E. A. H. Pilon-Smits, M. J. M. Ebskamp, M. J. Paul [et al.] // Plant Physiol. – 1995. – V.107, N 1. – P. 125-130.
338. Poorter H. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control / H. Poorter, K. J. Niklas, P. B. Reich [et al.] // New Phytologist. – 2012. – V.193, N 1. – P. 30–50.
339. Popov V. N. Specific features of oxidative stress in the chilled tobacco plants following transformation with the *desC* gene for acyl-lipid $\Delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* / V. N. Popov, N. V. Kipaikina, N. V. Astakhova, T. I. Trunova // Rus. J. Plant Physiol. – 2006. – V. 53, N 4. – P. 469-473.
340. Posmyk M.M. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations / M.M. Posmyk, H. Kuran, K. Marciniak, K.M. Janas // J. Pineal Res. – 2008. – V.45, N 1. – P.24–31.
341. Pottathil R. Establishment of the interferon-mediated antiviral state: possible role of superoxide dismutase / R. Pottathil, K.A. Chandrabose, P. Cuatrecasas, D.J. Lang // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – V.78. – P.3343–3347.
342. Prashanth S. R. Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice var Pusa

- Basmati-1 confers abiotic stress tolerance / S. R. Prashanth, V. Sadhasivam, A. Parida // *Transgenic Res.* – 2008. – V. 17, N 2. – P.281–291.
343. Price A.H. Plants under drought stress generated activated oxygen / A.H. Price, N. Atherton, G.A.F. Hendry // *Free Radical Res. Commun.* – 1989. – V.8, N 1. – P.61–66.
344. Pua E.C. Transgenic plants of *Brassica napus* L. / E.C.Pua, A.Mehra-Palta, F.Nagy, N.–H.Chua // *Biotechnol.* – 1987. – V. 5, N 8. – P. 815 – 817.
345. Qaderi M.M. Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought / M.M. Qaderi, L.V. Kurepin, D.M. Reid // *Physiol. Plant.* – 2006. – V.128, N 4. – P.710–721.
346. Qasim M. Salt-induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance / M. Qasim, M. Ashraf, M.Y. Ashraf [et al.] // *Biol. Plant.* – 2003. – V.46, N 4. – P.629-632.
347. Qi W. Over-expression of a conserved RNA-binding motif (RRM) domain (*csRRM2*) improves components of *Brassica napus* yield by regulating cell size / W. Qi, F. Zhang, F. Sun [et al.] // *Plant Breed.* – 2012. – V.131, № 5. – P. 614–619.
348. Qiao G. Transformation of *Liquidambar formosana* L. via *Agrobacterium tumefaciens* using a mannose selection system and recovery of salt tolerant lines / G. Qiao, J. Zhou, J. Jiang [et al.]// *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2010. – V.102, N 2. – P.163–170.
349. Qin H. Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (*ipt*) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions / H. Qin, Q. Gu, J. Zhang [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – V. 52, N 11. – P.1904–1914.
350. Quartacci M. F. Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings / M. F. Quartacci, F. Navari-Izzo // *J. Plant Physiol.* – 1992. – V.139, N 5. – P.621–625.

351. Querci M. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms / Querci M., Jermini M., Van der Eede G. (eds). – 2006. – Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. – 21 p.
352. Racchi M. L. Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and *in vitro* micropropagated oak (*Quercus robur* L.) / M. L. Racchi, F. Bagnoli, I. Balla, S. Danti// Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20, N 2. – P. 169–174.
353. Radchuk V.V. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous in planta transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains / V.V.Radchuk, D. T.Van, E.Klocke // Plant Sci. – 2005. – V.168, N 6.– P.1515–1523.
354. Ragauskas A. J. The path forward for biofuels and biomaterials / A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison [et al.] // Science. – 2006. – V.311, N 5759. – P.484-489.
355. Rahman H. Genetics and breeding for clubroot resistance in Canadian spring canola (*Brassica napus* L.)/ H. Rahman, G. Peng, F. Yu, [et al.] // Can. J. Plant Pathol. – 2014. – V. 36, N. S1. – P. 122–134.
356. Rai A. C. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants / A. C. Rai, M. Singh, K. Shah // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – V.61. – P.108-114.
357. Ral J.-P. Down-regulation of Glucan, Water-Dikinase activity in wheat endosperm increases vegetative biomass and yield / J.-P. Ral, A. F. Bowerman, Z. Li [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2012. – V.10, N 7. – P. 871–882.
358. Ranathunge K. *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced NH_4^+ permeability show superior growth and higher yield under optimal and

- suboptimal NH_4^+ conditions / K. Ranathunge, A. El-kereamy, S. Gidda [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2014. – V. 65, N. 4. – P. 965–979.
359. Randhir R. Microwave-induced stimulation of l-DOPA, phenolics and antioxidant activity in fava bean (*Vicia faba*) for Parkinson's diet / R. Randhir, K. Shetty // *Process Biochem.* – 2004. – V.39, N 11. – P. 1775–1784.
360. Raschke M. Enhanced levels of vitamin B6 increase aerial organ size and positively affect stress tolerance in *Arabidopsis* / Raschke M., Boycheva S., Crèvecoeur M. [et al.]. // *Plant J.* – 2011. – V.66, N 3. – P.414–432.
361. Reguera M. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops / Reguera M., Peleg Z., Blumwald E. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V.1819, N 2. – P.186–194.
362. Ribera-Fonseca A. Early induction of *Fe-SOD* gene expression is involved in tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass / A. Ribera-Fonseca, C. Inostroza-Blancheteau, P. Cartes [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2013. – V. 73. – P. 77–82.
363. Rizhsky L. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress / L. Rizhsky, H. Liang, R. Mittler // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278, № 40. – P. 38921–38925.
364. Rook F. Impaired sucrose induction 1 encodes a conserved plant-specific protein that couples carbohydrate availability to gene expression and plant growth / Rook F., Corke F., Baier M.[et al.] // *Plant J.* – 2006. – V. 46, N 6. – P.1045–1058.
365. Routaboul J.-M. *Arabidopsis* mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids / J.-M. Routaboul, C. Skidmore, J. G. Wallis, J. Browse // *J. Exp. Bot.* – 2012. – V.63, N 3. – P. 1435–1443.
366. Rubinstein S. Convenient assay for interferons / S. Rubinstein, Ph. Familletti, S. Petska // *J. Virol.* – 1981. – V.37, № 5. – P.755–758.

367. Sacristan M.D. Incorporation of hygromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *Brassica napus* through asymmetric protoplast fusion / M.D. Sacristan, M. Gerdemann-Knorck, O. Schieder // Theor.Appl.Genet. – 1989. – V. 78, № 2. – P. 194–200.
368. Sagi M. Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection/ M. Sagi, R. Fluhr// Plant Physiol. – 2001. – V.126, N 3. – P.1281–1290.
369. Sakhno L. Interferon application causes canola seedling biomass increase [Електронний ресурс] / L. Sakhno // JMBFS. – 2014. – V.3, № 6. – P.436–439. Режим доступу: http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2014/05/jmbfs_0612_sakhno.pdf.
370. Sakhno L. Short-term heat stress effects on a *cyp11A1* canola plants / L. Sakhno, M. Slyvets, N. Korol, N. Karbovska, A. Ostapchuk, M. Kuchuk // Biotechnologia. – 2013. – V.93 (3). – 6th Conference of the PSEPB. – September 16-19, 2013. – Łódź, Poland. – P. 409.
371. Sakhno L.O. Adaptive plasticity in osmotic stress of biotech canola (*Brassica napus* L.) possessing *cyp11A1* or simultaneously *desC* and *epsps* transgenes [Електронний ресурс] / L.O. Sakhno // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – №5 (54). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_5/9.pdf.
372. Sakhno L.O. Changes in fatty acid composition of leaf lipids in canola biotech plants under short-time heat stress [Електронний ресурс] / L.O. Sakhno, M.S.Slyvets, N.A. Korol [et al.] // JSPB. – 2014. – V.10, № 2. – P.24–34. Режим доступу: http://www.jspb.ru/issues/2014/N2/JSPB_2014_2_24-34.html.
373. Sakhno L.O. Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene/ L.O. Sakhno, O.Y. Kvasko, Z.M. Olevinska [et al.] // Цитология и генетика. – 2012. – V.46, № 6. – P.12–18.

374. Sakhno L.O. *Cyp11A1* canola plants under heat stress conditions / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets, M.V. Kuchuk // *Cytol.Genet.* – 2014. – V.48, № 5. – P.279–284.
375. Sakhno L.O. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene / L.O. Sakhno, A.M. Ostapchuk, V.V. Klochko, M.V. Kuchuk // *Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph – part III/ Editor-in-Chief Edward Szlyk.* – Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń. – 2011. – P.55–59.
376. Sakhno L.O. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene / L.O.Sakhno, A.M.Ostapchuk, V.V. Klochko, M.V. Kuchuk // *Rapeseed oil in European modern economy. 10th Int. Conf. on Research and Technology.* – Torun, Poland, October 5-8, 2011. – P.37.
377. Sakhno L.O. Leaf antioxidant activity of biotechnological canola (*Brassica napus* L.) plants resistant to both glyphosate and glufosinate herbicides / L.O. Sakhno, K.V.Lystvan, M.V. Kuchuk // «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology).11-13 жовтня 2015 р., Львів, Інститут біології клітини НАНУ. – 2015. – P.141.
378. Sakhno L.O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering / L.O. Sakhno // *Biopolym. Cell.* – 2013. – V. 29, № 6. – P.443–453.
379. Sakhno L.O. Superoxide dismutase activity in transgenic canola / L.O. Sakhno, M.S. Slyvets // *Инновационные направления современной физиологии растений: Всерос. конф. с междунар.участием.* Москва, Россия. 2-6 июня 2013 г. – С. 111–112.
380. Sakhno L.O. Superoxide dismutase activity in transgenic canola / L.O.Sakhno, M.S. Slyvets // *Цитология и генетика.* – 2014. – Т.48, № 3. – С. 12–17.

381. Sakhno L.O. Alterations in superoxide dismutase activity due to heterologous gene expression: plant peculiarities // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2015. – Т.17. – С.274-279.
382. Sales C.R.G. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature / C.R.G. Sales, R.V. Ribeiro, J.A.G. Silveira [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2013. – V.73. – P.326–336.
383. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / J.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989. – 1500 p.
384. Samis K. Pyramid Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa / K. Samis, S.R. Bowley, B.D. McKersie // J. Exp. Bot. – 2002. – V.53, N 372. – P. 1343-1350.
385. Sanz-Barrio R. Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves / R. Sanz-Barrio, P. Corral-Martinez, M. Ancin [et al.] // Plant Biotechnol.J. – 2013. – V.11, N 5. – P.618-627.
386. Sasongko N.D. Towards increasing erucic acid content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the combination with genes for oleic acid / N.D. Sasongko, C. Möllers // J. Amer. Oil. Chem. Soc. – 2005. – V.82, N 6. – P. 445–449.
387. Savić J. The activity of peroxidases and superoxide dismutases in transgenic phosphinothricin-resistant *Lotus corniculatus* shoots / J. Savić, J. Platiša, M. Dragičević [et al.] // Arch. Biol. Sci. – 2010. – V.62, N 4. – P.1063-1070.
388. Saxena S.C. Differentially expressed *myo*-inositol monophosphatase gene (*CaIMP*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed

- germination and seedling growth under abiotic stresses / S.C. Saxena, P. Salvi, H. Kaur [et al.] // J. Exp. Bot. – 2013. – V. 64, N 18. – P. 5623–5639.
389. Scandalios J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases / J. G. Scandalios // Plant Physiol. – 1993. – V. 101, N 1. – P. 7–12.
390. Scarth R. Designer oil canola – a review of new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types / R. Scarth, P.B.E. McVetty // In Proc. 10th Int. Rapeseed Cong., Canberra, Australia. – 1999. – P. 57.
391. Scarth R. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches / R. Scarth, J.Tang // Crop.Sci. – 2006. – V.46, N 3. – P. 1225–1236.
392. Scarth R. Mercury high erucic acid low glucosinolate summer rape/ R. Scarth, P.B.E. McVetty, S.A. Rimmer // Can. J. Plant Sci. – 1995. – V.75, N 1. – P. 205–206.
393. Scarth R. Hero summer rape / R. Scarth, P.B.E. McVetty, S.A. Rimmer, B.R. Stefanson // Can. J. Plant Sci. – 1991. – V.71, N 3. – P. 865–866.
394. Scebba F. Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves / F. Scebba, L. Sebastiani, C. Vitagliano // Biol. plantarum. – 2001. – V.44, N 1. – P.41-46.
395. Schnell J. Comparability of imazapyr-resistant Arabidopsis created by transgenesis and mutagenesis / J. Schnell, H. Labbé, N. Kovinich [et al.] // Transgenic Res. – 2012. – V.21, N 6. – P.1255-1264.
396. Schnurbusch T. A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content / T. Schnurbusch, C. Mollers, H.C. Becker // Plant Breed. – 1999. – V.119, № 2. – P. 141–144.
397. Schröder-Pontoppidan M., Skarzhinskaya M., Dixelius C. et al. Very long chain and hydroxylated fatty acids in offspring of somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* / M. Schröder-

- Pontoppidan, M. Skarzhinskaya, C. Dixelius [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – V. 99, N 1/2. – P. 108–114.
398. Shcherbak N. *Lox*-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation / N.Shcherbak, O.Kishchenko, L.Sakhno, I. Komarnitsky, M. Kuchuk // *Цитология и генетика.* – 2013. – Т. 47, № 3. – С.21–32.
399. Sheludko Y.V. Recent advances in plant biotechnology and genetic engineering for production of secondary metabolites / Y.V. Scheludko // *Cytology and Genetics.* – 2010. – V. 44, № 1. – С.65-75.
400. Shen Q. Expression of a *Brassica napus* heme oxygenase confers plant tolerance to mercury toxicity / Q. Shen, M. Jiang, H. Li [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2011. – V.34, N 5. – P.752-763.
401. Sheng J. Improving zinc content and antioxidant activity in transgenic tomato plants with expression of mouse metallothionein-I by *mt-I* gene / J. Sheng, K. Liu, B. Fan [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55, N 24. – P.9846-9849.
402. Shi H. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin / H. Shi, C. Jiang, T. Ye [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66, N. 3. – P. 681–694.
403. Shugaev A.G. Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and dormant sugar beet roots / A.G. Shugaev, D.A. Lashtabega, N.A. Shugaeva, E.I. Vyskrebentseva // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2011. – V.58, N 3. – P.387-393.
404. Sinoh T. N. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress / T. N. Sinoh, L. G. Paleo, D. Aspinall // *Aust. J. Biol. Sci.* – 1973. – V. 26, N 1. – P. 45-56.
405. Sivamani E. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing

- the barley *HVA1* gene / E.Sivamani, A.Bahieldinb, J. M. Wraith [et al.] // *Plant Sci.* – 2000. – V.155, N 1. – P. 1–9.
406. Skarzhinskaya M. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats / M.Skarzhinskaya, M. Landgren, K.Glimelius // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – V.93, № 8. – P. 1242–1250.
407. Slyvets M. Human interferon alpha 2b positively affects plant growth in both aseptic non-stress and water deficit conditions / M. Slyvets, L. Sakhno // «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні аспекти». 11-12 листопада 2014 р., Харків: Харківський національний університет ім.В.Н.Каразіна. – 2014. – С.142–143.
408. Slyvets M. Human interferon alpha 2b positively affects canola growth in both aseptic non-stress and water deficit conditions [Електронний ресурс] / M. Slyvets, L. Sakhno // *Int. J. Biosci. Nanosci.* – 2014. – V.1, N 5. – P.104-118. Режим доступу: http://ijbsans.com/journal14/oct14/MS-09-14-01_3.pdf
409. Slyvets M.S. DesC desaturase of cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* expression in canola plants does not improve the low positive temperature growth / M.S. Slyvets, L.O.Sakhno, Y.V. Sheludko // *Eurobiotech 2013. Leading area: White and Green Biotechnology: 5th Central European Congress of Life Sciences, 8-11 October, 2013, Krakow, Poland: abstracts.* – 2013. – P. 130.
410. Smidansky E.D. Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase / E.D. Smidansky, J.M. Martin, C.L. Hannah [et al.]/ *Planta.* – 2003. – V.216, N 4. – P. 656-664.
411. Snider J.L. Genotypic differences in thermotolerance are dependent upon prestress capacity for antioxidant protection of the photosynthetic apparatus in *Gossypium hirsutum* / J. L. Snider, D. M. Oosterhuis, E. M. Kawakami // *Physiol. Plant.* – 2010. – V. 138, N 3. – P. 268–277.

412. Song G.-Q. Evaluation of a herbicide-resistant trait conferred by the *bar* gene driven by four distinct promoters in transgenic blueberry plants / G.-Q. Song, K.C. Sink, P.W. Callow [et al.] // JASHS. – 2008. – V.133, N. 4. – P.605–611.
413. Spencer T.M. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture/ T.M.Spencer, W.J. Gordon-Kamm, R.J. Daines [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1990. – V.79, N 5. – P.625-631.
414. Spivak S.G. Some peculiarities of steroid metabolism in transgenic *Nicotiana tabacum* plants bearing the *CYP11A1* cDNA of cytochrome P450_{SCC} from the bovine adrenal cortex / S. G. Spivak, I. N. Berdichevets, R.P. Litvinovskaya [et al.] // Bioorg. Khim. – 2010. – V.36. – P.241–250.
415. Srivastava V. Alternative splicing studies of the reactive oxygen species gene network in *Populus* reveal two isoforms of high-isoelectric-point superoxide dismutase / V. Srivastava, M.K. Srivastava, K.Chibani [et al.] // Plant physiol. – 2009. – V. 149, N 4. – P. 1848–1859.
416. Sticklen M. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels / M. Sticklen // Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – V.17, N 3. – P.315–319.
417. Stoutjesdijk P.A. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B.juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous $\Delta 12$ -desaturase / P.A. Stoutjesdijk, C. Hurlestone, S.P. Singh, A.G. Green // Biochem. Soc. Transactions. – 2000. – V. 28, N 6. – P. 938 – 940.
418. Su X. Overexpression of the maize *psbA* gene enhances sulfur dioxide tolerance in transgenic tobacco / X. Su, P. Zhou, R. Wang [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. – V.120, N 1. – P. 303-311.
419. Sun F. A dual-targeted purple acid phosphatase in *Arabidopsis thaliana* moderates carbon metabolism and its overexpression leads to faster plant growth and higher seed yield / F.Sun, P. K.Suen, Y. Zhang [et al.] // New Phytologist. – 2012. – V.194, N 1. – P.206–219.

420. Sun W.-H. Reduction of methyl viologen-mediated oxidative stress tolerance in antisense transgenic tobacco seedlings through restricted expression of *StAPX*/ W.-H. Sun, Y. Wang, H.-G. He [et al.] // J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). – 2013. – V. 14, N 7. – P.578-585.
421. Sunkar R. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance / R.Sunkar, A.Kapoor, J. Zhu / Plant Cell. – 2006. – V.18, N 8. – P. 2051–2065.
422. Susuki N. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling / N. Susuki, G. Miller, J. Morales [et al.] // Curr. Opin. Plant Biol. – 2011. – V.14, N 6. – P.691–699.
423. Swanson E.B. Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens* / E.B. Swanson, L.R. Eriksson // Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 78, N 6. – P. 831–835.
424. Tabuchi M. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGSI;1*, a cytosolic *glutamine synthetase1;1* / M. Tabuchi, K. Sugiyama, K. Ishiyama [et al.] // Plant J. – 2005. – V.42, N 5. – P. 641–651.
425. Talukdar D. Superoxide-dismutase deficient mutants in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): genetic control, differential expressions of isozymes, and sensitivity to Arsenic [Электронный ресурс] / D. Talukdar, T. Talukdar // BioMed Res. Int. – 2013. – Article ID 782450, 11 pages. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/782450>.
426. Tan D.-X. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science / D.-X. Tan, R. Hardeland, L. C. Manchester [et al.] // J. Exp. Bot. – 2012. – V.63, N 2. – P. 577-597.
427. Tan H. Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* *LEAFY COTYLEDON1* and *LEC1-LIKE* in developing seeds / H. Tan, X. Yang, F. Zhang [et al.] // Plant Physiol. – 2011. – V.156, N 7. – P. 1577–1588.

428. Tanaka Y. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts / Y.Tanaka, T. Hibino, Y. Hayashi [et al.] // *Plant Sci.* – 1999. – V.148, N 2. – P.131–138.
429. Tang L. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature/ L.Tang, S.-Y. Kwon, S.-H. Kim [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2006. – V. 25, N 12. – P. 1380–1386.
430. Taranenko A.M. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants / A.M.Taranenko, L.O. Sakhno, B.V. Morgun, M.V. Kuchuk // *Biotechnol. acta.* – 2015. – V. 8, N 2. – P.52-57.
431. Tenea G.N. Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation / G.N. Tenea, A. Calin, L Gavrilă., N. Cucu // *Roum. Biotechnol. Lett.* – 2008. – V.13, N 5. – P. 3922 -3932.
432. Tepperman J.M. Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity / J.M.Tepperman, P.Dunsmuir // *Plant Mol. Biol.* – 1990. – V.14, N 4. – P.501–511.
433. Tertivanidis K. Superoxide dismutase transgenes in sugarbeets confer resistance to oxidative agents and the fungus *C. beticola* / K. Tertivanidis, C. Goudoula, C. Vasilikiotis [et al.] // *Transgen. Res.* – 2004. – V.13, № 3. – P. 225–233.
434. Tewari R.K. Oxidative stress and antioxidant responses of mulberry (*Morus alba*) plants subjected to deficiency and excess of manganese/ R.K.Tewari, P. Kumar, P.N. Sharma // *Acta Physiol. Plant.* – 2013. – V.35, N 12. – P.3345–3356.
435. Thompson C.J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* / C.J. Thompson, N.R. Movva, R. Tizard [et al.] // *The EMBO J.* – 1987. – V. 6, N 9. – P. 2519-2523.

436. Thomzik J.E. Transgenic *Brassica napus* plants obtained by cocultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens* / J.E.Thomzik, R.Hain // Plant Cell Repts. – 1990. – V. 9, N 5. – P. 233–236.
437. Torres M.A. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91^{phox}*)/ M.A.Torres, H. Onouchi, S. Hamada [et al.] // Plant J. – 1998. – V.14, N 3. – P.365-370.
438. Trehub M.S. Superoxide dismutase activity in leaves of rapeseed expressing cytochrome P450_{SCC} *CYP11A1* gene under osmotic stress conditions / M.S. Trehub, L.O. Sakhno // Int. Symp. on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology. May 16-20, 2012. Resort Livadiya, Yalta. – P. 179.
439. Trehub M.S. Transgenic *Brassica napus* plants expressing cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene under *in vitro* osmotic stress conditions / M.S. Trehub, L.O. Sakhno // Biotechnology and Plant Breeding. Perspective Towards Food Security and Sustainability: Int. Conf. Radzikow, Poland. September 10-12, 2012. – P. 156.
440. Trindade I. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula* / I. Trindade, C. Capitão, T. Dalmay [et al.] // Planta. – 2010. – V.231, N 3. – P.705–716.
441. Tseng M. J. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts / M. J. Tseng, C.-W. Liu, J.-C. Yiu // Plant Physiol. Biochem. – 2007. – V.45, N10-11. – P. 822-833.
442. Ursin V.M. Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids / V.M. Ursin // J. Nutrition. – 2003. – V.133, N 12. – P. 4271–4274.
443. Uzunova V. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine / V. Uzunova, Y. Sheline, J. M. Davis [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, N 6. – P. 3239-3244.

444. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease/ M.Valko, D.Leibfritz, J. Moncol [et al.]// Int. J. Biochem. Cell B. – 2007. – V.39, N 1. – P.44–84.
445. Van Altvorst A. C. Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes rol* genes on tomato plant and flower development / A. C. van Altvorst, R. J. Bino, A. J. van Dijk [et al.] // Plant Sci. – 1992. – V.83, N 1. – P. 77–85.
446. Van Breusegem F. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress / F. van Breusegem, L.Slooten, J.-M. Stassart [et al.] // J. Exp. Bot. – 1999. – V. 50, N 330. – P. 71–78.
447. Van Camp W. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage / W. van Camp, H. Willekens, C. Bowler [et al.] // Nature Biotechnol. – 1994. – V.12, № 2. – P. 165–168.
448. Van Camp W. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts / W. van Camp, K. Capiiau, M. van Montagu [et al.] // Plant Physiol. – 1996. – V.112, N 4. – P. 1703–1714.
449. Vance C.P. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource/ C.P. Vance, S.C. Uhde, D.L. Allan // New Phytol. – 2003. – V.157, N 3. –P.423–447.
450. Vatankhah E. Activity of antioxidant enzyme during *in vitro* organogenesis in *Crocus sativus* / E. Vatankhah, V. Niknam, H. Ebrahimzadeh // Biol. Plant. – 2010. – V. 54, N 3. – P. 509-514.
451. Vencill W.K. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops / W.K. Vencill, R.L. Nichols, T.M. Webster [et al.] // Weed Science. – 2012. – Special Issue. – P.2–30.

452. Vicente M. Inhibition of plant viruses by human gamma interferon / M. Vicente, G. De Fazio, M.E. Menezes, R.R. Golgher // J. Phytopathol. – 1987. – V.119, N 1. – P.25-31.
453. Vigeolas H. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by overexpression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter / H. Vigeolas, P. Waldek, T. Zank, P. Geigenberger // Plant Biotechnol. J. – 2007. – V.5, N 3. – P. 431 – 441.
454. Vila-Aiub M.M. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive *EPSPS* gene amplification in *Amaranthus palmeri* / M.M. Vila-Aiub, S.S. Goh, T.A. Gaines [et al.] // Planta. – 2014. – V.239, N 4. – P.793–801.
455. Vilkki J.P. Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland / J.P. Vilkki, P.K. Tanhuanpää // Proc. 9th Int. Rapeseed Cong., Cambridge, UK. – 1995. – P. 386 – 388.
456. Voelker T.A. Genetic engineering of a quantitative trait: Metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed / T.A. Voelker, T.R. Hayes, A.M. Cranmer [et al.] // Plant J. – 1996. – V.9, N 2. – P. 229–241.
457. Von Schweinichen C. Expression of a plant cell wall invertase in roots of *Arabidopsis* leads to early flowering and an increase in whole plant biomass / C. von Schweinichen, M. Buttner // Plant Biol. – 2005. – V.7, N 5. – P. 469-475.
458. Vyacheslavova A.O. Thermostable lichenase of *Clostridium thermocellum* as a perspective reporter and carrier for expression of heterologous proteins / A.O.Vyacheslavova, I.M.Gerasymenko, L.O. Sakhno [et al.] // International Conference “Plant transformation technologies II”. Vienna, Austria. February 19-22, 2011. – P.47.

459. Wahid A. Heat tolerance in plants: an overview / A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad // *Environ. Exp. Bot.* – 2007. – V. 61, N 3. – P.199–233.
460. Wan J. Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses / J. Wan, R. Griffiths, J. Ying [et al.] // *Crop Sci.* – 2009. – V.49, N 5. – P.1539–1554.
461. Wan X. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂ / X. Wan, J. Tan, S. Lu // *Physiol Plant.* – 2009. – V.136, N 1. – P.30–44.
462. Wang B. Ectopic expression of a Chinese cabbage *BrARGOS* gene in *Arabidopsis* increases organ size/ B. Wang, X. Zhou, F. Xu, J. Gao // *Transgenic Res.* – 2010. – V.19, N 3. – P. 461-472.
463. Wang F.Z. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase/ F.Z.Wang, Q.-B. Wang, S-Y. Kwon [et al.] // *J Plant Physiol.* – 2005. – V.162, N 4. – P.465-72.
464. Wang J. X., Zhao F. Y., Xu P. Use of *aroA-M1* as a selectable marker for *Brassica napus* transformation // *Crop Sci.* – 2006. – V.46, N 2. – P.706–711.
465. Wang Q. Simultaneous overexpression of citrate synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves augments citrate exclusion and Al resistance in transgenic tobacco / Q. Wang, Q. Yi, Q. Hu [et al.] // *Plant Mol. Biol. Report.* – 2012. – V.30, N 4. – P. 992-1005.
466. Wang W.-B. Differential antioxidation activities in two alfalfa cultivars under chilling stress / W.-B. Wang, Y.-H. Kim, H.-S. Lee [et al.] // *Plant Biotechnol. Rep.* – 2009. – V. 3, N 4. – P.301–307.
467. Wang W.C. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants / W.C.Wang, G. Menon, G. Hansen // *Plant Cell Rep.* – 2003. – V.22, N 4. – P. 274–281.

468. Wang Y. Constitutive expression of pea defence gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptoshearia maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*) / Y.Wang, G.Nowak, D. Culley [et al.] // Molecular Plant Microbe Interactions. – 1999. – V. 12, N 5. – P. 410–418.
469. Wang Y. Ectopic expression of Mn-SOD in *Lycopersicon esculentum* leads to enhanced tolerance to salt and oxidative stress/ Y. Wang, M. Wisniewski, R. Meilan [et al.] // J. Appl. Horticult. – 2007. – V.9, N 1. – P. 3–8.
470. Wang Y. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection/ Y. Wang, J. Ying, M. Kuzma [et al.] // Plant J. – 2005. – V.43, N 3. – P.413–424.
471. Wang Y. Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (α -subunit) for yield protection against drought in canola/ Y. Wang, M. Beath, M. Chalifoux [et al.] // Molecul. Plant. – 2009. – V.2, N 1. –P. 191–200.
472. Wang Y.C. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii* / Y.C. Wang, G.Z. Qu, H.Y. Li [et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2010. – V.37, № 2. – P.1119–1124.
473. Wang Y.P., Sonntag K., Rudloff E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica* / Y.P. Wang, K. Sonntag, E. Rudloff // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V.106, N 7. – P. 1147–1155.
474. Weier D. Trierucoylglycerol biosynthesis in transgenic plants of rapeseed (*Brassica napus* L.)/ D.Weier, C. Hanke, A. Eickelkamp [et al.] // Lipid-Fett. – 1997. – V.99, N 5. – P. 160–165.
475. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A.R. Wellburn // J.Plant Physiol. – 1994. – V.144, N 3. – P. 307–313.

476. What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://roundupreadycanola.com.au/wp-content/uploads/2014/03/What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola1.pdf>
477. Wittkop B. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe / B. Wittkop, R.J. Snowdon, W. Friedt // *Euphytica*. – 2009. – V. 170, N 1. – P. 131-140.
478. WO02/36831 Canola event *pv-bngt04(rt73)* and compositions and methods for detection thereof/ Krieb; Rachel; Zeng; Qingyi - PCT filed October 22, 2001. PCT pub. Date May 10, 2002.
479. Wojdyło A. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs / A. Wojdyło, J. Oszmianrski, R. Czemerys // *Food Chem.* – 2007. – V.105, N 3. – P. 940–949.
480. Wood T.M. Methods for measuring cellulase activities / Wood T.M., Bhat K.M. // *Methods Enzymol.* – 1988. – V.160. – P.87–112.
481. Xie Z. Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity/ Z. Xie, L. Duan, X. Tian [et al.] // *J Plant Physiol.* – 2008. – V.165, N 4. – P.375–384.
482. Xu L. Effects of water-stress on growth and physiological changes in *Pterocarya stenoptera* seedlings / L. Xu, Y. Pan, F. Yu // *Sci. Hortic-Amsterdam.* – 2015. – V.190, N 1. – P. 11–23.
483. Xu W. Unintended effects were investigated in antioxidant activity between genetically modified organisms and their nontransgenic control / W. Xu, F. Guo, X. Zhou [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – V. 10, N 46. – P. 9272-9279.
484. Yamada T. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the *cyp1A1* gene / T. Yamada, Y. Ohashi, M. Ohsima [et al.] // *Theor.Appl. Genet.* – 2002. – V. 104, N 2. – P. 308–314.
485. Yang G. Overexpression of a *GST* gene (*ThGSTZ1*) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to

- scavenge reactive oxygen species / G. Yang, Y. Wang, D. Xia [et al.] // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2014. – V.117, N 1. – P. 99-112.
486. Yang L. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing *AtIpk2b*, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana* / L. Yang, R. Tang, J. Zhu // *Plant Mol Biol.* – 2008. – V. 66, N 4. – P. 329–343.
487. Yang X. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances thermotolerance of photosystem II in tobacco plants / X. Yang, X. Wen, H. Gong // *Planta.* – 2007. – V. 225, N 3. – P.719–733.
488. Yesilbag D. Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity / D. Yesilbag, M. Eren, H. Agel [et al.] // *Brit. Poultry Sci.* – 2011. – V.52, N 4. – P. 472-482.
489. Yu B. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase / B. Yu, D.J. Lydiate, L.W. Young [et al.] // *Transgenic Res.* – 2008. – V.17, N 4. – P. 573–585.
490. Zaefyzadeh M. The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces / M. Zaefyzadeh, R.A. Quliyev, S.M. Babayeva, M.A. Abbasov // *Turk. J. Biol.* – 2009. – V.33, N 1. – P. 1-7.
491. Zakharchenko N. S. Physiological features of rapeseed plants expressing the gene for an antimicrobial peptide cecropin P1/ N. S. Zakharchenko, Ya. I. Buryanov, A. A. Lebedeva// *Rus. J. Plant Physiol.* - 2013. – V. 60, N 3. – P. 411-419.
492. Zamani K. Improved phosphate metabolism and biomass production by overexpression of *AtPAP18* in tobacco / K. Zamani, M. S. Sabet, T. Lohrasebi [et al.] // *Biologia.* – 2012. – V.67, N 4. – P.713-720.
493. Zambre M. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells / M. Zambre, N. Terry, J. De Clercq [et al.] // *Planta.* – 2003. – V. 216, N 4. – P.580–586.

494. Zang H.X. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation / H.X. Zang, J.N. Hodson, J.P. Williams, E. Blumwald // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V.98, N 22. – P.12832-12836.
495. Zang M. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cell and plants / M. Zang, R. Barg, M. Yin [et al.] // Plant J. – 2005. – V.44, N 3. – P.361-371.
496. Zang N. Efficient production of transgenic plants using the *bar* gene for herbicide resistance in sweetpotato/ N. Zang, H. Zhai, S. Gao [et al.] // Scientia Horticul. – 2009. – V.122, N 4. – P.649–653.
497. Zarhloul M.K. Breeding high-stearic oilseed rape (*Brassica napus*) with high- and low-erucic background using optimized promoter gene constructs / M.K. Zarhloul, C. Stoll, W. Lühs [et al.] // Mol. Breed. – 2006. – V.18, N 3. – P. 241–251.
498. Zhang H. Increased glycine betaine synthesis and salinity tolerance in *AhCMO* transgenic cotton lines/ H. Zhang, H. Dong, W. Li [et al.] // Mol. Breed. – 2009. – V. 23, N 2. – P.289-298.
499. Zhang J. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species / J. Zhang, M.B. Kirkham // Plant Cell Physiol. – 1994. – V. 35, N 5. – P.785-791.
500. Zhang L. Cotton GhMPK2 is involved in multiple signaling pathways and mediates defense responses to pathogen infection and oxidative stress / L. Zhang, D. Xi, L. Luo [et al.]// FEBS J. – 2011. – V. 278, N 8. – P. 1367–1378.
501. Zhang Y. Over-expressing *SgNCED1* in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities and stress tolerance / Y. Zhang, J. Yang, S. Lu [et al.] // J. Plant Growth Regul. – 2008. – V. 27, N 2. – P.151–158.
502. Zhao B. Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation/ B. Zhao, J. Li // J. Integrat. Plant Biol. – 2012. – V. 54, N 10. – P. 746–759.

503. Zhou B. Calcium is involved in the abscisic acid-induced ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and chilling resistance in *Stylosanthes guianensis*/ B. Zhou, Z. Guo // Biol. plant. – 2009. – V. 53, N 1. – P. 63-68.
504. Zhou L. Overexpression of *PtSOS2* enhances salt tolerance in transgenic poplars / J. Zhou, J. Wang, Y. Bi [et al.] // Plant Mol. Biol. Report. – 2014. – V. 32, N 1. – P. 185-197.
505. Zhu B. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice / B. Zhu, J. Su, M. Chang [et al.] // Plant Sci. – 1998. – V. 139, N 1. – P. 41–48.
506. Zhu C. Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies / C. Zhu, G. Sanahuja, D. Yuan // Plant Biotechnol. J. – 2013. – V. 11, N 2. – P. 129–141.
507. Zhu Z. Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants / Z. Zhu, K.W. Hughes [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 1994. – V. 36, N 2. – P.197-204.
508. Zielinski H. Antioxidant capacity and its components of cruciferous sprouts / H. Zielinski, V.R. Piskula, A. Michalska, H. Kozłowska // Pol. J. Food Nutr. Sci. – 2007. – V. 57, N 3. – P. 315–322.
509. Zou W. Differences in biochemical responses to cold stress in two contrasting varieties of rape seed (*Brassica napus* L.) / W. Zou, Y. Chen, C. Lu // Forestry Stud. China. – 2007. – V. 9, N 2. – P. 142-146.