

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

**КИРПА-НЕСМІЯН ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА**

УДК 581.056:502.75

**ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ДЕСАТУРАЗ  
ЦІАНОБАКТЕРІЙ У ВИЩИХ РОСЛИНАХ**

**03.00.20 – біотехнологія**

Автореферат  
на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

**Науковий керівник:** кандидат біологічних наук  
**Шелудько Юрій Всеволодович,**  
старший науковий співробітник  
відділу генетичної інженерії.  
Інститут клітинної біології та  
генетичної інженерії НАН України,

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

доктор біологічних наук,  
**Дубровна Оксана Василівна,**  
старший науковий співробітник відділу генетичного  
поліпшення рослин  
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Захист дисертації відбудеться « 19 » жовтня 2017 р. об 11 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного 148.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного 148.

Автореферат розіслано «\_\_\_» вересня 2017 р.

Вчений секретар

Спеціалізованої вченої ради, к.б.н.



Листван К.В.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** В даний час досить актуальним є дослідження механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів. Вивчення нових напрямків в адаптації рослин до абіотичних стресів важливе у зв'язку зі змінами клімату та різкими температурними перепадами, пов'язаних з антропогенною діяльністю на території України які ми спостерігаємо в останні десятиріччя (Шевцов А.І., 2007). Адаптація рослин до абіотичних стресів (впливу критичних температур, сильного вітру, суховіїв, пилових буревіїв, заморозків тощо) проходить декількома етапами. Доцільним є отримання рослин методами генетичної інженерії, що дозволяють протягом декількох років модифікувати рослинні організми, які будуть стійкими одночасно до декількох абіотичних факторів [Рышкель И. В и др., 2016]. Адаптація рослин до стресу залежить, насамперед, від властивостей мембран. Зі збільшенням частки ненасичених жирних кислот у складі мембранних ліпідів підвищується в'язкість мембран, збільшується їх пластичність, що дозволяє запобігати механічним пошкодженням (тріщини, розриви) під час впливу температурних стресів або нестачі вологи.

Десатурази – це ферменти, що каталізують утворення подвійних зв'язків у жирних кислотах (ЖК) та тим самим перетворюють їх з насичених в ненасичені. Підвищується стійкість рослин до знижених температур та заморозків, умов зневоднення рослин внаслідок нестачі вологи або дії сильних вітрів, засоленості ґрунтів. Загалом, ферменти десатурази поділяються на три групи залежно від переносника субстрату: ацил-ліпідні десатурази використовують у якості субстрата ЖК, які знаходяться в складі ліпідів, ацил-АПБ використовують ЖК, які зв'язані з ацил-переносним білком, ацил-КоА використовують ЖК, які приєднані до коферменту ацетилювання. У рослин функціонують два види десатураз – ацил-АПБ та ацил-ліпідні десатурази (Лось Д.А., 2005). У роботі використовували гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, які утворюють подвійні зв'язки у положеннях  $\Delta 9$  (ген *desC*) та  $\Delta 12$  (ген *desA*).

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

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

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

#### **Мета і завдання дослідження**

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

Відповідно до мети були поставлені завдання:

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

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

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

**Методи дослідження.** Вирощування рослин в умовах *in vitro* та *in vivo*. Генетична трансформація листових дисків рослин здійснювалась *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом. Дослідження наявності перенесених генів здійснювалось методом ПЛР. Дослідження активності ферментів десатураз відбувалось за ферментативною активністю репортерного білка термостабільної ліхенази, ген якого був трансляційно злитий із геном десатурази, методом якісного та кількісного ліхеназного тесту. Визначення активності ферменту супероксиддисмутази, визначення

накопичення малонового діальдегіду, дослідження рівня втрати електролітів. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії.

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

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

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

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

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

**Особистий внесок здобувача.** Результати досліджень, представлені у роботі, були виконані автором у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України разом із деякими співробітниками. Вибір об'єкту і напрямку досліджень та інтерпретація деяких результатів були здійснені разом із науковим керівником – к.б.н., с.н.с. Шелудьком Ю. В. Здобувачем виконано більшу частину досліджень. Отримано трансгенні лінії тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно гібридні гени десатураз *desA* і *desC*, та рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1.

Виділено ДНК, здійснено аналіз ПЛР для детекції перенесених генів та якісні і кількісні ліхеназні реакції для підтвердження експресії генів десатураз за репортерним білком. Здійснено аналізи активності ферменту супероксиддисмутази, рівня накопичення малонового діальдегіду, рівня електролітів. Культивування рослин тютюну та картоплі *in vitro* та *in vivo*.

Було пророщено насіння на середовищі MS із додаванням селективних агентів *N. tabacum* покоління T1 *in vitro*, та переведено їх в умови культивування *in vivo*.

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

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

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

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

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

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

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

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі дано характеристику видам абіотичних стресів та характеристику захисних механізмів боротьби з ними рослинних організмів. Наведено сучасні уявлення про генетичну регуляцію стійкості рослин до абіотичних стресів. Представлено сучасну класифікацію та показано характеристику ферментів десатураз живих організмів, в тому числі рослинних. Приділено увагу методам оцінки деструкції клітин та їх компартментів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували ген *desC*, що кодує  $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus*, та ген *desA*, що кодує  $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Герасименко І. М., и др., 2010), злиті з оптимізованою версією *licBM3* репортерного гена термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* (Zverlov V. V., et al. 1991). Гібридні гени *desA:licBM3* та *desC:licBM3* клонували у вектори на основі pBISN (з селективним геном *nptII* та *bar* відповідно) під контролем 35S промотора ДНК вірусу мозаїки цвітної капусти (Arencibia A. D., et al., 1998). Також використовували ген *desA:licBM3*, який клонували у вектор на основі pBISN (з селективним геном *nptII*) під контролем холодоіндукованого промотора CBF1 (Курпа-Несміян Т.М., 2015). Ген  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази був трансляційно злитий в одній рамці зчитування з сигналом транспорту в хлоропласти (*ats1A::desC::licBM3*), оскільки субстрат ферменту – стеаринова кислота – утворюється у хлоропластах.

В якості контролю використовували трансгенні рослини, з аналогічними векторними конструкціями, що містять замість гена десатурази (*desA* або *desC*) репортерний ген зеленого флюоресцентного білка медузи *Aequorea victoria* (*gfp*) (Кирпа-Несміян Т. М., та ін., 2015). Всі генетичні конструкції були клоновані та люб'язно надані к.б.н., н.с. відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України Герасименко І. М.

Генетичну трансформацію рослин здійснювали *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом. Для трансформації рослинного матеріалу генетичними конструкціями застосовували метод “листяних дисків”.

Для пророщування насіння *N. tabacum*, які містять у своєму геномі та експресують гени *ats1A::desC::licBM3* або *desA::licBM3*, використовували умови культивування *in vitro*: температура 25°C, вологість 30-40% у темноті протягом двох тижнів. Після чого проростки переносили у умови *in vivo* у теплицю. Аналізували рослини віком 3 місяці.

Рослинну ДНК виділяли за допомогою СТАВ-методу. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Якісне та кількісне визначення активності термостабільної ліхенази проводили використовуючи ліхенан (“Sigma”, США) в якості субстрата. Концентрацію відновлюючих цукрів визначали спектрофотометричним методом з використанням калібрувального графіку, побудованому по глюкозі. За одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлюючих цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 хв (в перерахунку на 1 мг білка). Питому активність розраховували на кількість розчинного білка.

Аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза за методикою фотохімічного окислення нітросинього театразолію. Визначення рівня втрати електролітів проводили шляхом вимірювань виходу електролітів у деіонізаті та загальної кількості електролітів у листках. Малоновий диальдегід (МДА) визначали за допомогою його здатності вступати в реакцію з тіобарбітуратовою кислотою з утворенням червоної флуоресцентної сполуки, що дозволяє проводити спектрофотометричний аналіз вмісту МДА.

У всіх експериментах використовували 12 біологічних повторностей, аналітичних 1.

Середнє значення, стандартні відхилення та довірчий інтервал розраховували за допомогою програми Excel Microsoft Office 2010. Достовірність різниці між вибірковими середніми оцінювали за допомогою парного t-теста Стьюдента. Значення *p* розраховували за допомогою програми Excel.

## ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН ТЮТЮНУ *NICOTIANA TABACUM*, ЩО МІСТЯТЬ У СВОЄМУ ГЕНОМІ ТА ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *DESA* АБО *DESC*

Дослідження проводили з рослинами тютюну *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* ціанобактерії *S. sp.* PCC 6803 або *ats1A::desC::licBM3* ціанобактерії *S. vulcanus* (рис. 1).



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



Дані трансгенні рослини були отримані методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації (Герасименко І. М., et al., 2010) та були перевірені за допомогою мультиплексної ПЛР на наявність вставки гібридного гена. Після чого у ліній, які виявились позитивними за наявністю перенесених генів, перевіряли експресію гена за ферментативною активністю репортерного білка – термостабільної ліхенази (якісним ліхеназним методом), трансляційно злитої із білком десатурази. Відібрали дві з п'яти трансгенних ліній, що експресують ген *desA::licVM3*, та п'ять з шести ліній, що експресують ген *ats1A::desC::licVM3* (Курра-Nesmiian Т.М., et al., 2015). Рослини вирощували на живильному середовищі MS протягом 3-4 тижнів. Контролем слугували нетрансформовані рослини тютюну та трансформанти, що містять та експресують ген *gfp::licVM3*. Використовували верхні розкриті листки.

Кількісний аналіз активності ліхенази проводили для того, щоб відібрати трансгенні лінії з максимальним накопиченням гібридних білків. Експресія гена, що кодує рекомбінантну  $\Delta 12$  десатуразу (*desA::licVM3*), в рослинах призвела до достовірного збільшення частки C(18:2) і зменшення рівня C(18:3) ( $P \leq 0,01$ ) (табл. 1).

Дослідження пошкоджень рослин після дії холодового стресу. Відомо, що фермент супероксиддисмутаза (СОД) є важливим компонентом антиоксидантної системи рослин, індукція її активності необхідна для захисту клітин від пошкоджень активними формами кисню. При впливі низьких температур було зареєстровано збільшення активності СОД на 30-50% в екстрактах всіх рослин, які експресують гібридні гени десатураз.

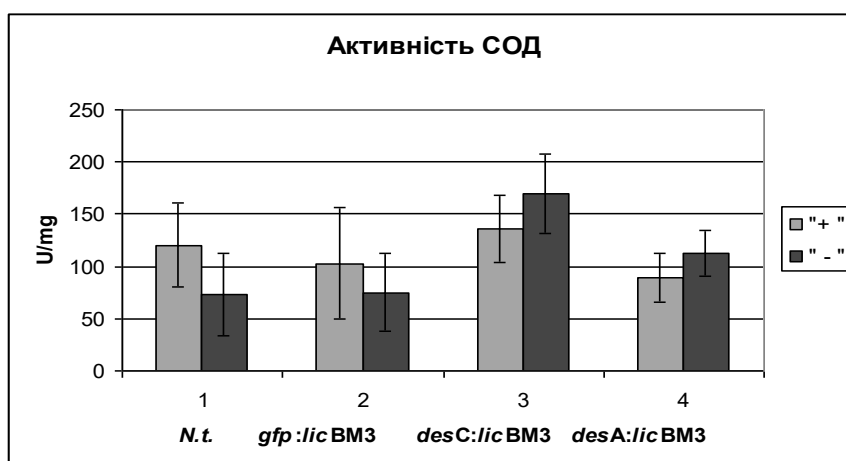
**Табл. 1.** Склад ЖК ліпідів листя досліджуваних рослин тютюну, що містять гени *gfp::licVM3*, *ats1A::desC::licVM3*, та *desA::licVM3* (мол. %  $\pm$  SD)

| Рослина                       | C16:0          | C16:3         | C18:0         | C18:2          | C18:3          |
|-------------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>N. tabacum</i>             | 21,1 $\pm$ 1,8 | 1,6 $\pm$ 0,5 | 1,1 $\pm$ 0,2 | 18,5 $\pm$ 5,5 | 57,6 $\pm$ 6,0 |
| <i>gfp::licVM3/19</i>         | 20,9 $\pm$ 2,6 | 1,9 $\pm$ 1,5 | 1,8 $\pm$ 1,4 | 17,5 $\pm$ 4,7 | 57,9 $\pm$ 3,7 |
| <i>ats1A::desC::licVM3/3</i>  | 18,2 $\pm$ 2,0 | 2,3 $\pm$ 1,0 | 1,0 $\pm$ 0,8 | 11,0 $\pm$ 2,3 | 67,3 $\pm$ 1,6 |
| <i>ats1A::desC::licVM3/13</i> | 19,6 $\pm$ 2,7 | 1,7 $\pm$ 0,6 | 0,7 $\pm$ 0,6 | 10,4 $\pm$ 3,2 | 67,6 $\pm$ 5,5 |
| <i>ats1A::desC::licVM3/15</i> | 19,7 $\pm$ 1,0 | 1,7 $\pm$ 0,8 | 0,9 $\pm$ 0,3 | 13,1 $\pm$ 2,8 | 64,7 $\pm$ 2,9 |
| <i>desA::licVM3/9</i>         | 20,2 $\pm$ 1,9 | 1,0 $\pm$ 0,8 | 1,0 $\pm$ 0,8 | 35,3 $\pm$ 3,3 | 39,7 $\pm$ 2,8 |
| <i>desA::licVM3/10</i>        | 19,7 $\pm$ 1,7 | 0,9 $\pm$ 0,4 | 2,1 $\pm$ 0,9 | 33,6 $\pm$ 3,3 | 41,0 $\pm$ 3,7 |

Примітка SD – стандартне відхилення. Також дослідили у складі незначну кількість ЖК 16:1, 16:2 і 18:1, масова доля кожної складала менше 0.5%.

(*desA::licVM3* і *ats1A::desC::licVM3*), в той час як в екстрактах нетрансформованих і контрольних трансгенних рослин (*gfp::licVM3*) активність СОД знижувалася при цих же температурних умовах (рис. 2).

Оскільки електроліти впливають на обмінні процеси між клітинами та між компартментами клітин, втрата електролітів слугує одним із параметрів пошкоджень клітини. Спостерігали тенденцію до зменшення рівня втрати електролітів на 20-30% у порівнянні з контрольними рослинами. Малоновий діальдегід утворюється внаслідок переокисного окислення мембранних ліпідів та є маркером їх окислення. Спостерігали зменшення рівня накопичення малонового діальдегіду у рослин, що експресують додаткові гени десатураз, порівняно з контрольними не трансгенними рослинами на 15-25%, а порівняно з контрольними трансгенними рослинами (*gfp::licBM3*) на 50-60%.

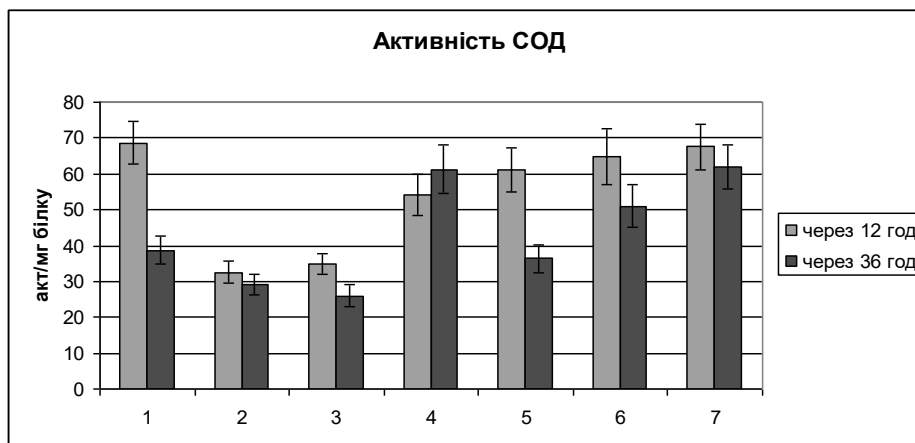


**Рис. 2** Активність ферменту супероксиддисмутаза: *N.t.* – *N. tabacum* дикого типу; *gfp::licBM3* – *N. tabacum*, що експресують ген біфункціонального репортера *gfp::licBM3*; *desC::licBM3* – *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3*; *desA::licBM3* – *N. tabacum*, що експресують ген *desA::licBM3*, “+” дослідження активності СОД при кімнатній температурі, “–” дослідження активності СОД після дії стресу.

Аналіз рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах підвищених температур. Дослідження рівня виходу електролітів здійснювали перевіряючи показники через 12 год та через 36 год. Достовірної різниці між трансгенними та контрольними зразками не було відмічено. Вимірювання активності СОД в даному дослідженні проводили через 12 год та через 36 год. Не спостерігали достовірних відмінностей між контрольними та дослідними рослинами ні через 12 год, ні через 36 год (рис. 3).

Аналізували рівень накопичення малонового діальдегіду через 12 год та через 36 год дії стресових температур. Виявили, що через 12 год рівень накопичення МДА був меншим у рослин, що експресують гени десатураз, порівняно з контрольними не трансгенними рослинами на 80-90%, а трансгенним контролем на 7-20%. Через 36 год дії стресових температур різниці між рівнем накопичення МДА досліджуваних рослин тютюну та трансгенним контролем не було. Оскільки цільові гени *desA* та *desC* знаходились в одній рамці зчитування з геном репортерного білка термостабільної ліхенази, було проведено кількісну ліхеназну реакцію для того, щоб опосередковано визначити рівень експресії генів десатураз за

активністю білків ліхенази. Визначили, що активність білка підвищилась через 12 год дії стресу та знизилась через 36 год, тоді коли активність ферментів біфункціонального репортера підвищилась через 36 год. Це може вказувати на аклімацію рослин *N. tabacum*, які експресують гени десатураз, порівняно з контролем.



**Рис.3.** Аналіз активності ферменту супероксиддисмутаза:

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

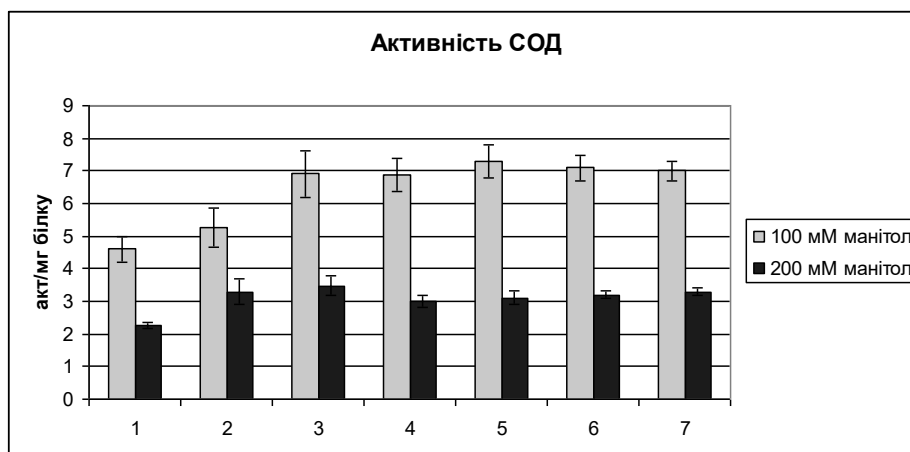
Дослідження рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах осмотичного стресу.

В даному дослідженні рослини *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* висаджували на середовище MS (Мурашиге-Скуга) з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ. Манітол є речовиною осмотиком, що сприяє виходу води з цитоплазми клітини та міжклітинних проміжків.

При вирощуванні рослин з додаванням 100 мМ манітолу було відзначено підвищення активності ферменту СОД у дослідних рослин порівняно з контрольними нетрансформованими рослинами тютюну на 3-15% та рослинами *N. tabacum*, що експресують ген *gfp::licBM3* на 7-21% (рис 4).

При вирощуванні рослин тютюну на середовищі з MS при додаванні 200 мМ манітолу даної кореляції не спостерігалось. Рівень накопичення малонового діальдегіду при осмотичному стресі є показником як механічного пошкодження у рослин, так і порушення обміну речовин, спричиненого дією стресора (Jiang Jingjing et al., 2017) Вимірювали показники МДА при культивуванні рослин як при 100 мМ, так і при 200 мМ концентрації манітолу. При культивуванні рослин з додаванням 100 мМ концентрації манітолу виявили збільшення рівня накопичення МДА у рослин тютюну дикого типу на 5-18%, суттєвих відмінностей між дослідними рослинами та трансгенним контролем не спостерігали.

Під час культивування рослин з додаванням 200 мМ концентрації манітолу було виявлено зменшення накопичення у рослин, що експресують



**Рис.4.** Аналіз активності ферменту супероксиддисмутаза:

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

гени десатураз, порівняно як з рослинами дикого типу (на 2-19%), так і з трансгенним контролем (на 20-45%). Визначення активності ліхенази, показало, що достовірної різниці між трансгенним контролем (рослини дикого типу не використовувались, оскільки вони не експресують даний фермент і дані їх реакції близькі до нуля) і рослинами, що експресують гени десатураз відмічено не було.

### **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM*, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГІБРИДНІ ГЕНИ *DESA::LICBM3* АБО *ATS1A::DESC::LICBM3* Т1 ПОКОЛІННЯ**

Було проаналізовано 30 рослин покоління Т1, що містять в своєму геномі ген  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази та 30 рослин покоління Т1, що містять в своєму геномі ген  $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази. Досліджено, що у 20% рослин, що мають успадкувати ген *ats1A::desC::licBM3* спостерігали успадкування гена *desC* або *licBM3*. У 40% рослин, що мають успадкувати ген *desA::licBM3* спостерігали успадкування гена *desA* або *licBM3*. Оскільки гени десатураз впливають на зміни в спектрі жирних кислот для рослин тютюну було проведено аналіз газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл. 2). Для дослідження використовували рослини *N. tabacum*, що експресують ген *ats1A::desC::licBM3* та *desA::licBM3*.

В рослин, що містять в своєму геномі та експресують ген  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази було відмічено збільшення частки ліноленової кислоти, а в рослин, що експресують ген  $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази – лінолевої кислоти. Це відповідає попереднім дослідженням рослин спектру жирних кислот рослин тютюну, що експресують перенесені гени десатураз. Для визначення стійкості рослин до стресу знижених температур та заморозків рослини піддавали дії холодного стресу 0°C – 20 хв, потім -5 °C – 80 хв. Після чого досліджували показники втрати електролітів, рівня накопичення

малонового диальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза. Перевіряли рівень електролітів, що залишились в рослині після дії холодного стресу, виявили найменшу втрату іонів у тютюнів, що містять в собі та експресують додаткові гени десатураз. Щодо рівня втрати електролітів у контрольних рослинах, то достовірної різниці між трансгенним контролем і не трансгеним не було відмічено.

**Табл. 2.** Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну покоління T1, що експресують гени  $\Delta 9$ - або  $\Delta 12$ - ацил-ліпідних десатураз (мол. %  $\pm$  SD) .

| Рослина                      | C16:0           | C16:3           | C18:0          | C18:2           | C18:3           |
|------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| <i>N.tabacum</i>             | 18,1 $\pm$ 1,8  | 1,7 $\pm$ 0,5   | 1,1 $\pm$ 0,2  | 18,5 $\pm$ 3,5  | 58,6 $\pm$ 6,0  |
| <i>gfp::licBM3/19</i>        | 21,9 $\pm$ 2,6  | 1,9 $\pm$ 1,5   | 1,8 $\pm$ 1,4  | 15,5 $\pm$ 2,7  | 56,9 $\pm$ 3,7  |
| <i>ats1A::desC::licBM3/1</i> | 19,1 $\pm$ 1,8  | 3,1 $\pm$ 0,7   | 1,1 $\pm$ 0,3  | 12,0 $\pm$ 3,1  | 68,4 $\pm$ 1,9  |
| <i>ats1A::desC::licBM3/2</i> | 17,9 $\pm$ 1,6  | 1,6 $\pm$ 0,67  | 0,6 $\pm$ 0,7  | 11,01 $\pm$ 1,2 | 69,1 $\pm$ 6,4  |
| <i>ats1A::desC::licBM3/3</i> | 19,3 $\pm$ 1,2  | 1,56 $\pm$ 0,7  | 0,89 $\pm$ 0,2 | 14.1 $\pm$ 3,2  | 66,5 $\pm$ 2,4  |
| <i>desA::licBM3/1</i>        | 21,02 $\pm$ 1,8 | 1,2 $\pm$ 0,7   | 1,1 $\pm$ 0,67 | 34,8 $\pm$ 2,4  | 40,5 $\pm$ 3,3  |
| <i>desA::licBM3/2</i>        | 18,9 $\pm$ 1,8  | 0,87 $\pm$ 0,36 | 1,9 $\pm$ 0,71 | 33,9 $\pm$ 2,8  | 42,01 $\pm$ 4,7 |
| <i>desA::licBM3/3</i>        | 19,4 $\pm$ 1,8  | 0,92 $\pm$ 0,53 | 3,1 $\pm$ 1,1  | 32,7 $\pm$ 3,6  | 41,3 $\pm$ 3,6  |

Аналізуючи показники ферменту супероксиддисмутаза виявили збільшення активності у трансгених рослин, що експресують гени десатураз порівняно з контролем після впливу холодного стресу. Проте, при звичайних фізіологічних умовах достовірної різниці між досліджуваними рослинами та контрольними не спостерігалось. Досліджували накопичення малонового диальдегіду у рослин після дії холодного стресу. Хоча у трансгених рослин тютюну, що експресують гени десатураз частка ненасичених ЖК збільшена, проте, було виявлено підвищення накопичення МДА у досліджуваних рослинах.

## **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *N. TABACUM*, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *DESA* ПІД ХОЛОДОІНДУКОВАНИМ ПРОМОТОРОМ**

При використанні холодоіндукованого промотора можна досягти експресії перенесених генів разом зі зниженням температури навколишнього середовища (Sharma G., Giri J., та Tyagi A., 2016). У роботі використовували конструкцію, що містила ген *desA* ( $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази), злитий з репортерним геном термостабільної ліхенази *licBM3* під холодоіндукованим *CBF1* промотром.

Було підтверджено методом ПЛР, що внаслідок *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було отримано 13 ліній трансформантів, що мають у своєму геномі ген *desA*. Для того, щоб перевірити експресію генів

використовували ліхеназний чашковий метод. Оскільки досліджувані гени знаходяться під контролем холодоіндукованого промотора, дану реакцію проводили після дії холододового стресу.

Якісним методом було визначено наявність експресії перенесених генів у 12 лініях. Для подальших досліджень використовували рослини трьох ліній. Аналіз спектру жирних кислот проводили методом газової хроматографії та мас-спектрометрії після дії холододового стресу (табл. 3). За допомогою цього дослідження було виявлено збільшення частки лінолевої кислоти у рослин тютюну, що експресують ген ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії та незначне підвищення ліноленової кислоти. Для того, щоб визначити адаптацію рослин до холододового стресу перевіряли рівень накопичення малонового диальдегіду, активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень втрати електролітів та рівень експресії генів десатураз за ферментативною активністю злитого репортерного білка після дії холододового стресу (0°C – 20 хв, -5 °C – 80 хв).

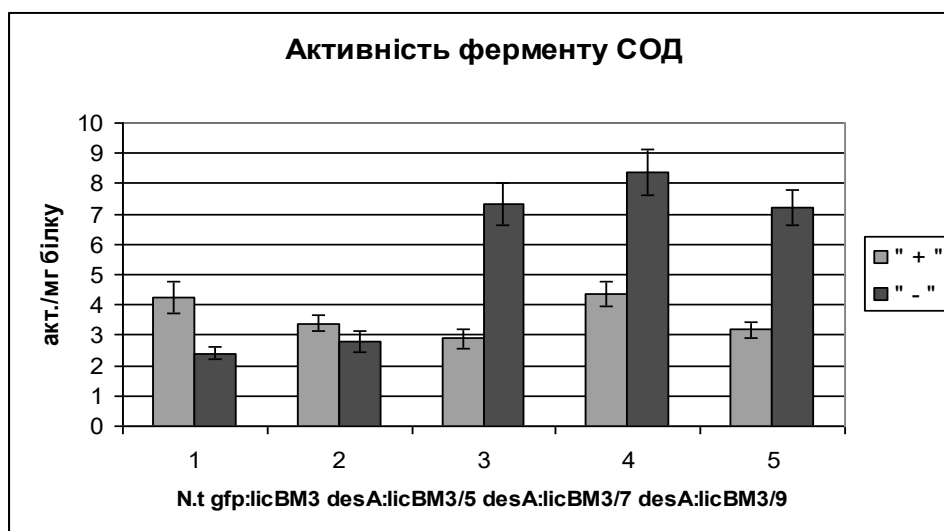
**Табл. 3.** Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну, що експресують гени *desA::licBM3* та *gfp::licBM3* після дії холододового стресу (мол. % ± SD).

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

Активність ферменту СОД перевіряли як за кімнатної температури, так і за умов холододового стресу. Виявили збільшення активності даного ферменту після дії стресору у рослин, що експресують ген десатурази, порівняно з контрольними рослинами на 20-30% (рис. 5). Дослідження рівня накопичення малонового диальдегіду проводили після дії холододового стресу. Виявили зменшення накопичення даної речовини у рослин, які експресують ген десатурази, порівняно з контрольними рослинами тютюну дикого типу та трансгенним контролем на 50-70%.

Досліджуючи рівень електролітів можна дослідити рівень пошкоджень мембран, які супроводжуються втратою важливих для підтримання гомеостазу іонів. Виявили зменшення рівня втрати електролітів у рослин, що експресують додаткові гени десатураз на 35-70%, порівняно з контрольними рослинами тютюну. Під час дії холододового стресу доцільним є перевірка експресії перенесеного гена (Maali, R., et al., 2007). Рівень активності білків

визначали по репортерному білку термостабільної ліхенази. Вимірювання проводились через 30 хв після дії стресу. Виявили збільшення активності білків порівняно з контрольними трансгенними рослинами, що містять у своєму геномі та експресують ген біфункціонального репортеру *gfp::licBM3*. Даний результат вказує на те, що адаптація рослин до дії холодного стресу супроводжується підвищенням активності ферменту  $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази.



**Рис. 5.** Аналіз активності ферменту супероксиддисмутаза:

*desA:licBM3/5* – лінія №5 рослин *N. tabacum* з геном *desA:licBM3*; *desA:licBM3/7* – №7 *N. tabacum* з геном *desA:licBM3*; *desA:licBM3/9* – лінія №9 *N. tabacum*, з геном *desA:licBM3*.

## ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM*, ЩО ОДНОЧАСНО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГІБРИДНІ ГЕНИ *DESA* ТА *DESC*

Генетичну трансформацію трансгенних рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі ген *ats1A::desC::licBM3* було проведено методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації із застосуванням вектора, що містить послідовність гена *desA:licBM3*. З 16 відселектованих ліній 14 ліній показали наявність в геномі копії трансгену і не містили агробактеріальної контамінації. Таким чином було отримано 14 ліній рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі одночасно два гени ацил-ліпідних десатураз *desC* ціанобактерій *S. vulcanus* та *desA* *S. sp.* PCC6803. Наявність вставки генів було доведено методом ПЛР. Для трансформантів було здійснено аналіз спектру жирних кислот за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл. 4).

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

Перевірка експресії генів десатураз за ферментативною активністю репортерного білка, після дії холодного стресу, виявила підвищення активності білків ферменту ліхенази порівняно з трансгенним контролем на

23-51%. Щодо рівня втрати електролітів, то тут було виявлено менший рівень втрати у трансгенних рослин порівняно з контрольними. Різниці між трансгенним контролем та рослинами дикого типу виявлено не було.

**Табл. 4** Аналіз спектру жирних кислот рослин тютюну, що одночасно містять у своєму геномі та експресують гени *desA* та *desC* (мол. %  $\pm$  SD).

| Рослина  | C16:0          | C16:1          | C18:0          | C18:2           | C18:3          |
|--|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Контроль<br><i>N. tabacum</i>                        | 21,1 $\pm$ 0,8 | 1,6 $\pm$ 0,8  | 1,1 $\pm$ 0,5  | 18,5 $\pm$ 5,3  | 57,5 $\pm$ 5,7 |
| Контроль<br><i>N. tabacum</i> ( <i>gfp:licBM3</i> )  | 20,9 $\pm$ 2,6 | 1,9 $\pm$ 1,8  | 1,8 $\pm$ 0,3  | 17,5 $\pm$ 4,7  | 57,9 $\pm$ 3,2 |
| <i>N. tabacum</i><br>( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №5  | 13,2 $\pm$ 1,9 | 1,4 $\pm$ 0,05 | 2,3 $\pm$ 0,07 | 24,3 $\pm$ 0,05 | 61,5 $\pm$ 0,7 |
| <i>N. tabacum</i><br>( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №6  | 11,7 $\pm$ 1,8 | 0,9 $\pm$ 0,03 | 1,9 $\pm$ 0,08 | 23 $\pm$ 0,9    | 63,6 $\pm$ 1,3 |
| <i>N. tabacum</i><br>( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №15 | 12,3 $\pm$ 0,8 | 1,5 $\pm$ 0,04 | 1,8 $\pm$ 0,03 | 22 $\pm$ 0,8    | 65,8 $\pm$ 1,3 |

Накопичення малонового диальдегіду вказує на окисну деструкцію ненасичених жирних кислот (Kumar N., Robert E., 2016). Хоча, дані рослини одночасно експресують два гени десатураз та показники результатів хроматографічного аналізу ЖК вказують на підвищення частки ненасичених ЖК в спектрі цих рослин, однак, рівень накопичення малонового диальдегіду в них набагато менший, ніж такий у контрольних рослинах на 30-64%. Перевіряли активність ферменту супероксиддисмутаза за нормальної кімнатної температури та після дії умов холодного стресу (García A. S. et al., 2016). Виявили підвищення активності СОД після дії холодного стресу на 43-78%. За нормальних фізіологічних умовах достовірної різниці між контрольними та трансгенними рослинами відмічено не було.

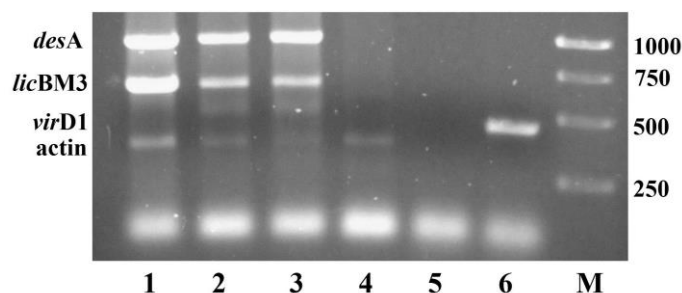
#### **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *SOLANUM TUBEROSUM*, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *DESA***

Картопля є однією з важливих сільськогосподарських культур, що має широке застосування у промисловості (харчовій, кормовій, технічній тощо) (Кирпа-Несміян Т. М. та ін., 2016). Неприятливі чинники навколишнього середовища, такі як температурні коливання, засоленість ґрунтів та посуха знижують врожайність даної культури. Рослини картоплі сортів української селекції були отримані шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації Для підтвердження вставки трансгена (*desA::licBM3*) було проведено ПЛР (рис.6).

Для опосередкованого підтвердження експресії гібридних генів було здійснено аналіз активності ферменту ліхенази за допомогою якісного ліхеназного методу.



Дослідження спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії підтверджує раніше отримані результати, які наводяться багатьма авторами в контексті використання гена  $\Delta 12$ -ацил-ліпідної



**Рис 6.** Аналіз трансгенних рослин *S. tuberosum* для визначення гібридних генів *desA* і *licBM3* методом мультиплексної ПЛР: 1 – ДНК трансгенної картоплі сорту “Серпанок 2”; 2 – ДНК трансгенної картоплі сорту “Слов’янка”; 3 – ДНК трансгенної картоплі сорту “Лугівська 2”; 4 – не трансгенна рослина; 5 – контроль н<sub>2</sub>о; 6 – ДНК *A. tumefaciens*; М – 100 п.о. ДНК маркер.

десатурази для створення нових ліній рослин, стійких до абіотичних стресів. Разом зі збільшенням частки лінолевої кислоти було помічено зменшення частки пальмітинової та пальмітоолеїнових кислот, це пояснюється тим, що вони було використанні в якості субстрату в ланцюгу перетворень для накопичення С 18:2 ненасиченої кислоти (табл. 5).

*Аналіз рослин S. tuberosum, що експресують гібридний ген desA::licBM3 в умовах осмотичного стресу.* Рослини висаджували на середовище MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ. Вирощували їх протягом двох місяців та аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза, рівень накопичення малонового діальдегіду та опосередковано рівень експресії генів десатураз за ферментативною

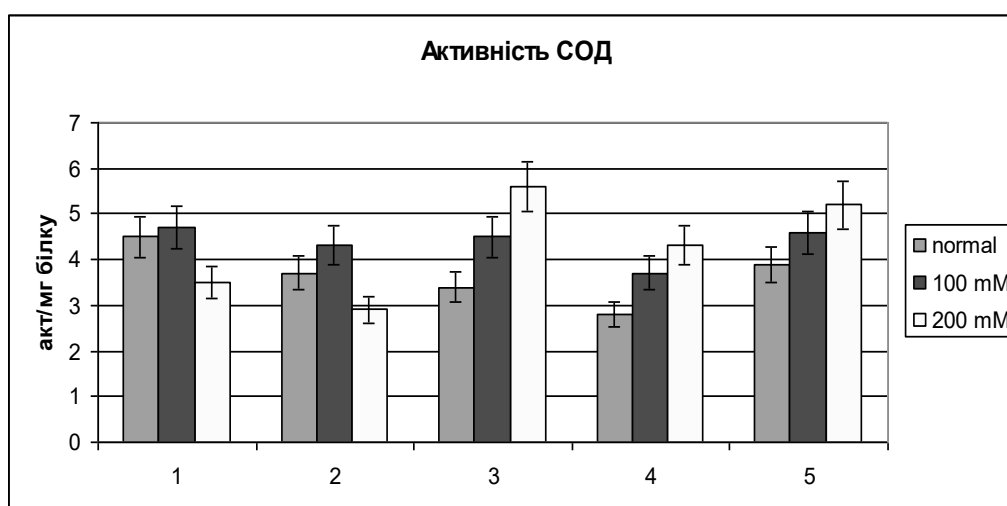
**Табл. 5.** Аналіз спектру ЖК рослин картоплі (мол. %  $\pm$  SD).

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

активністю репортерного білка термостабільної ліхенази. Активність СОД перевіряли при культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням манітолу у концентраціях 100 мМ та 200 мМ та стандартному середовищі MS (нормальні фізіологічні умови) (рис 7). Виявили підвищення активності даного ферменту на 2-11% порівняно з контрольними рослинами в умовах культивування рослин на середовищі з додаванням 200 мМ манітолу. При

культивуванні на стандартному середовищі MS та MS з додаванням 100 мМ манітолу достовірних відмінностей не було помічено. Рівень накопичення малонового діальдегіду показав зниження даної речовини у рослин, що експресують гени десатураз за винятком лінії сорту “Слов’янка 1”.

При культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням 200 мМ манітолу відзначали збільшення активності ферментів десатураз за ферментативною активністю репортерного білка ліхенази у ліній сортів “Серпанок 2”, “Лугівська 2”, “Незабудка 7”, проте, у рослин картоплі сорту “Слов’янка 1” не було виявлено підвищення активності цих ферментів. Дані результати вказують на те, що здатність отриманих трансгенних рослин



**Рис.7.** Дослідження активності СОД рослин картоплі: 1 – контрольна рослина *Solanum tuberosum*; 2 – картопля сорту “Слов’янка 1”, що експресує ген *desA::licBM3*; 3 - картопля сорту “Серпанок 2”, що експресує ген *desA::licBM3*; 4 - картопля сорту “Лугівська 2”, що експресує ген *desA::licBM3*; 5 – картопля сорту “Незабудка 7”, що експресує ген *desA::licBM3*.

адаптуватись однакова на середовищі MS з додаванням 100 мМ манітолу, проте, адаптація рослин до осмотичного стресу при вирощуванні на середовищі MS з додаванням 200 мМ манітолу відрізняється. Лінія сорту “Слов’янка 1” характеризується зниженою адаптацією при підвищеному осмотичному стресі.

### **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *DENDROBIUM LINGUELLA*, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *DESC***

Створення орхідей, які будуть стійкими до низьких температур та заморозків є досить актуальним завданням. В даній роботі було використано ген  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *S. vulcanus*. Отриманим трансгенним рослинам було проведено аналіз жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії (табл. 6).

У трьох трансгенних лініях (№1 та №2) було відмічено зниження частки двоненасиченої ЖК та збільшення частки триненасиченої ЖК. Також в цих лініях було помічено появу в складі мембранних ліпідів частки C19:0.

Аналіз рослин *D. linguella*, що експресують гібридний ген *desC* в умовах зижених температур. Перевіряли активність ферменту супероксиддисмутаза, рівень активності ферментів десатураз за

**Табл. 6.** Аналіз жирних кислот рослин орхідей, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3* (мол. %  $\pm$  SD).

|   | Лінії рослин                                       | C 16:0          | C 18:0         | C18:1           | C18:2           | C18:3           | C19:0         |
|---|--|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 1 | <i>D. linguella</i>                                | 24,4 $\pm$ 1,3  | 7,8 $\pm$ 0,36 | 6,7 $\pm$ 0,18  | 25,8 $\pm$ 2,4  | 33,4 $\pm$ 2,06 | 0             |
| 2 | <i>D. linguella</i><br>( <i>gfp::licBM3</i> )      | 30,9 $\pm$ 0,9  | 8,4 $\pm$ 0,3  | 6,6 $\pm$ 0,25  | 21,01 $\pm$ 1,8 | 30,3 $\pm$ 0,91 | 0             |
| 3 | <i>D. linguella</i><br>( <i>desC::licBM3</i> ) №1  | 23,5 $\pm$ 1,99 | 6,8 $\pm$ 1,7  | 5,28 $\pm$ 0,73 | 20,8 $\pm$ 1,29 | 39,6 $\pm$ 1,26 | 7 $\pm$ 2,1   |
| 4 | <i>D. linguella</i><br>( <i>desC::licBM3</i> ) №2  | 25,99 $\pm$ 0,4 | 7,7 $\pm$ 0,5  | 4,9 $\pm$ 0,3   | 16,07 $\pm$ 0,5 | 41,7 $\pm$ 0,98 | 6,2 $\pm$ 0,4 |
| 5 | <i>D. linguella</i><br>( <i>desC::licBM3</i> ) №3  | 25,2 $\pm$ 0,8  | 6,8 $\pm$ 0,3  | 5,6 $\pm$ 0,5   | 22,9 $\pm$ 2,8  | 40,3 $\pm$ 1,5  | 0             |
| 6 | <i>D. linguella</i><br>( <i>desC::licBM3</i> ) №9  | 24,2 $\pm$ 0,6  | 7,3 $\pm$ 0,2  | 4,8 $\pm$ 0,3   | 22,1 $\pm$ 0,5  | 41,3 $\pm$ 1,1  | 0             |
| 7 | <i>D. linguella</i><br>( <i>desC::licBM3</i> ) №24 | 23,4 $\pm$ 0,9  | 7,9 $\pm$ 0,6  | 5,6 $\pm$ 0,3   | 21,1 $\pm$ 0,3  | 41,7 $\pm$ 1,2  | 0             |

ферментативною активністю репортерного білка та рівень накопичення малонового діальдегіду під час та після дії холодового стресу. Холодовий стрес: 20 днів у холодильній камері при 0°C.

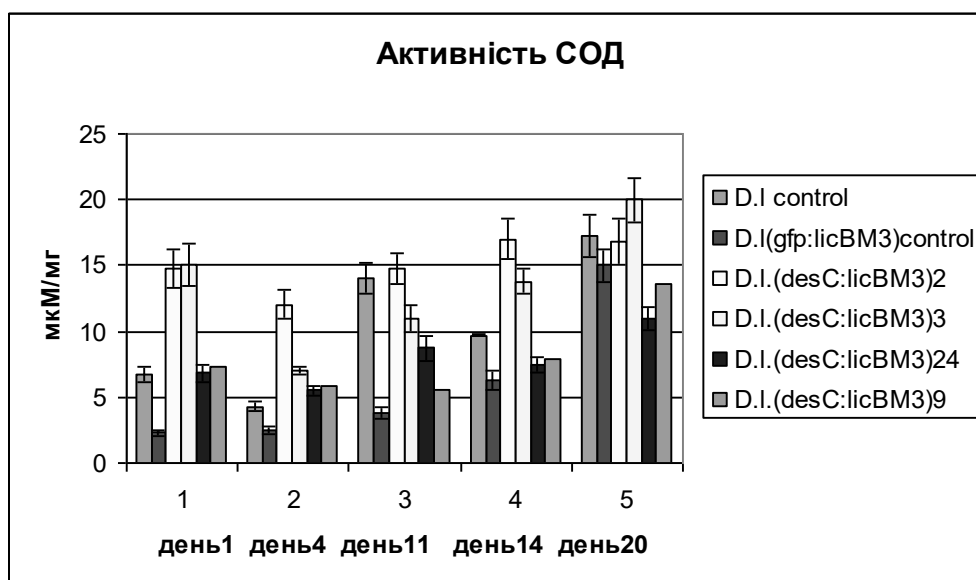
Активність ферменту СОД перевіряли після дії холодового стресу в перший день, на четвертий день, на одинадцятий день, на чотирнадцятий день та на двадцятий день. Виявили збільшення активності ферменту СОД у рослин, які мали відмінності у спектрі ЖК. В цих рослинах спостерігали підвищення активності даного ферменту протягом всього експерименту. У рослин, в яких не було виявлено збільшення частки триненасиченої ліноленової кислоти, спостерігалась активність СОД нижче контролю (рис. 8).

Рівень накопичення МДА вказує на ступінь окисної деструкції (Li Qi, Xin Qi та Wenjun Jia. 2016). Було виявлено менший вміст даного альдегіду у всіх трансгенних рослинах, що експресують ген десатурази порівняно з контролем (дикий тип та трансгенна рослина, що експресує ген *gfp::licBM3*) протягом усього періоду експерименту. Дослідження активності ферменту десатураз за ферментативною активністю репортерного білка термостабільної ліхенази показало підвищення експресії на 4 та 14 дні, що вказує на процеси аклімації даних рослин (Musiyuchuk K. A., et al. 2000).

Невисока активність у перший день може вказувати на порівняно нижчий ступінь пошкодження (недостатня дія стресора), а на 11-й та 20-й дні – період

відносного спокою, оскільки, рослини ввійшли у фазу адаптації. Досліджуючи адаптацію рослин орхідей до стресу знижених температур було виявлено підвищення активності ферменту супероксиддисмутаза, менший рівень накопичення малонового діальдегіду у рослин, що експресують перенесений ген  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази порівняно з контрольними рослинами.

Щодо експресії генів десатураз, то її перевіряли за допомогою репортерного гена термостабільної ліхенази кількісним методом. Було



**Рис.8.** Активність ферменту СОД: *D.l. control* – не трансгенна рослина *D. linguella*; *D.l. (gfp::licBM3) control* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *gfp::licBM3* використовувалась як контроль; *D.l. (desC::licBM3)2* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №2; *D.l. (desC::licBM3)3* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №3; *D.l. (desC::licBM3)24* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №24; *D.l. (desC::licBM3)9* – трансгенна рослина *D. linguella*, що експресує ген *ats1A::desC::licBM3*, лінія №9.

виявлено підвищення активності ферментів десатураз за активністю репортерного білка на 4 та 14 дні порівняно з трансгенним контролем, це пояснює також підвищення активності ферменту СОД в цей же період, оскільки реакція десатурації, як і активність СОД посилюється у відповідь на підвищення концентрації кисневих радикалів у клітинах.

Також це пояснює результати по визначенню накопичення МДА: на четвертий день та чотирнадцятий день помітили зниження рівня даної речовини порівняно з контролем.

Результати вказують на те, що експресія гену десатурази сприяє стійкості рослин орхідеї до стресу знижених температур.

## ВИСНОВКИ

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

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

## ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Герасименко И. М., Сахно Л. А., Кирпа Т. Н., Остапчук А. Н., Хаджиев Т. А., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. В. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены  $\Delta 9$  или  $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы // Физиология растений, 2015, том 62, № 3, 1–10. (вирощування рослин для досліджень, якісний та кількісний ліхеназні тести, аналіз активності ферменту СОД)

2. Курпа-Nesmiiian T. Getting plants *Nicotiana tabacum* that simultaneously express heterologous gene of two acyl-lipid desaturases cyanobacterium *desC* and *desA*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XX, ISSN 2285-1364, 65 – 68. (генетична трансформація рослин *N. tabacum* *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом, ПЛР, опрацювання результатів, написання статті)
3. Кирпа-Несміян Т.М., Кучук М.В., Шелудько Ю.В. Дослідження фізіолого-біохімічних характеристик рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени *desA* або *desC* в умовах стресів різних температур. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. Київ, Логос – 2016, Т – 2 № 14, 21-26. (вирощування рослин для досліджень, аналіз рівня МДА, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті)
4. Кирпа-Несміян Т.М., Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени  $\Delta 9$ - та  $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2016, Т – 19, 139-143. (вирощування рослин тютюну в умовах *in vivo*, дослідження рівня втрати електролітів, рівень МДА, активність ферменту СОД, кількісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів та написання статті)
5. Кирпа-Несміян Т.М., Герасименко І.М., Сахно Л.О., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В., Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени  $\Delta-9$  і  $\Delta-12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос – 2015, Т – 17, 197-200. (вирощування рослин для досліджень, аналіз визначення втрати електролітів, опрацювання результатів, написання статті)
6. Кирпа-Несміян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А., Кучук Н.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum* экспрессирующие ген  $\Delta 12$ - ацил-липидной десатуразы цианобактерии. // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т – 24. – 432, 81-87. (ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів, написання статті)
7. Кирпа Т.Н., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко І.М., Иванников Р.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии в орхидее *Dendrobium linguella* Rchb. F. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос. – 2013, – Т – 12, 244-248. (підбирання умов холодового стресу, аналіз визначення втрати електролітів)
8. Кирпа Т. М., Герасименко І.М., Сахно Л.А., Клочко В.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В. Экспрессия в *Nicotiana tabacum*

генов ацил-липидных десатураз цианобактерий без сигналов транспорта в хлоропласты. // Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» 15-16 листопада, 2012, Київ, Україна. 267-268. (вирощування рослин для досліджень, якісна ліхеназна реакція, опрацювання результатів)

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

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

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

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

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

14. Гра О.А., Хаджиев Т.А., Тюрин А.А., Кирпа-Несмиян Т.Н., Рудас В.А., Герасименко И.М., Юрьева Н.О., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологичных генов десатураз стимулирует биосинтез ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов в растениях и увеличивает их толерантность к стрессовым факторам. Генетика и Биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»). II Международная научная конференция, г. Минск, 13–16 октября, 2015 г.: материалы конференции / Ред. колл.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015 г. 56. (*вирощування рослин для досліджень, підготовка рослинних екстрактів для аналізу спектру жирних кислот, інтерпретація результатів*)
15. Кирпа-Несмиян Т.М., Рудас В.А., Осипенко В.А., Хархота М.А, Кучук М.В. Растения картофеля *Solanum tuberosum*, которые несут ген *desA* десатуразы цианобактерии. Международная научно-практическая конференция «Современное картофелеводство Евразийского содружества: от науки до практики» 11-14 июля 2016, Самохваловичи, Республика Беларусь. 132. (*ПЛР, підготовка проб до проведення аналізу спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, опрацювання результатів, написання тез*)
16. Кирпа-Несмиян Т.М. Дослідження успадкування гена  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії у рослин тютюну T1 покоління. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017», Тернопіль, 20–22 квітня, 2017 р. 254. (*вирощування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, інтерпретація результатів, написання тез*)
17. Tetiana Kyrpa-Nesmiian. Research plants *Nicotiana tabacum* generation T1 expressing gene *desA* in terms hot stress. International conference “Smart Bio” 2017, May 18-20, Kaunas, Lithuania, 128. (*вирощування рослин для досліджень, ПЛР, якісний ліхеназний тест, опрацювання результатів, написання тез*)

## АНОТАЦІЯ

**Кирпа-Несмиян Т.М.** Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2017.

Роботу присвячено дослідженню впливу зміни спектру жирних кислот вищих рослин на їх адаптацію до абіотичних стресів. Під час досліджень поставленої проблематики було отримано подвійні трансформанти тютюну *Nicotiana tabacum*, що одночасно експресують два гени десатураз (*desA* і *desC*) та рослини тютюну, що містять у своєму геномі та експресують ген  $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази (*desA*) під контролем холодоіндукованого промотора CBF1.



Було досліджено адаптацію рослин тютюну *Nicotiana tabacum*, картоплі *Solanum tuberosum*, орхідей *Dendrobium linguella* з гетерологічною експресією генів ацил-ліпідних десатураз в умовах абіотичних стресів. Показано, що тютюн *Nicotiana tabacum* з додатковими генами десатураз краще переносить умови гіпертермічного, гіпотермічного та осмотичного стресів. Рослини орхідеї *Dendrobium linguella* з експресією  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази (*desC*) краще адаптуються до умов знижених температур порівняно з контрольними не трансгенними рослинами та рослини картоплі *Solanum tuberosum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* відрізняються кращою адаптацією до умов осмотичного стресу порівняно з контролем за показниками активності ферменту супероксиддисмутаза, рівня накопичення малонового діальдегіду та втрати електролітів.

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

## АННОТАЦІЯ

**Кирпа-Несмиян Т.М.** Исследование гетерологической экспрессии генов десатураз цианобактерий в высших растениях – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20. – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2017.

Работа посвящена исследованию влияния изменения спектра жирных кислот высших растений на их адаптацию к абиотическим стрессам. Целесообразным является получение растений методами генетической инженерии, позволяющие в течение нескольких лет модифицировать растительные организмы, которые будут устойчивыми одновременно к нескольким абиотическим факторам. Адаптация растений к стрессу зависит прежде всего от свойств мембран. С увеличением доли ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов повышается вязкость мембран, увеличивается их пластичность, что позволяет предотвращать механические повреждения (трещины, разрывы) при воздействии температурных стрессов или недостатка влаги. Десатуразы – это ферменты, которые катализируют образование двойных связей в жирных кислотах (ЖК) и тем самым превращают их с насыщенных в ненасыщенные.

Во время исследований поставленной проблематики были получены двойные трансформанты табака *Nicotiana tabacum*, одновременно экспрессирующие два гена десатураз (*desA* и *desC*), а также растения табака, которые имеют в своем геноме и экспрессируют ген  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы (*desA*) под контролем холодоиндуцибельного промотора CBF1 методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации.

Исследовали адаптацию растений табака *Nicotiana tabacum*, которые экспрессируют гены десатураз цианобактерий в условиях гипотермического, гипертермического, и осмотического стрессов. Полученные трансгенные

растения картофеля *Solanum tuberosum*, которые экспрессируют ген *desA* исследовали в условиях осмотического стресса. Адаптация полученных трансгенных орхидей *Dendrobium linguella* с экспрессией гена *desC* была исследована в условиях гипотермического стресса.

Анализ спектра жирных кислот методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии показал увеличение доли линолевой кислоты у растений, которые экспрессируют ген *desA* и увеличение доли линоленовой кислоты у растений, которые экспрессируют ген *desC*. Для изучения уровня повреждений мембран после действия температурных и осмотического стрессов были исследованы показатели активности фермента супероксиддисмутазы, уровня накопления малонового диальдегида, а также потери электролитов у всех исследуемых растений. Следует отметить, что все полученные трансгенные растения показали лучшую адаптацию по сравнению с контрольными растениями по данным показателям.

Ключевые слова: ацил-липидные десатуразы цианобактерий, абиотический стресс, генетическая трансформация растений, *Nicotiana tabacum*, *Dendrobium linguella*, *Solanum tuberosum*.

### SUMMARY

**Курпа-Nesmiian T.M.** Research of heterologous expression of desaturase genes of cyanobacteria in higher plants – Manuscript.

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

The work is devoted to research the impact of changes in the spectrum of fatty acids in higher plants on their adaptation to abiotic stresses. During the research issues set double transformants of tobacco *Nicotiana tabacum*, simultaneously expressing two transferred desaturase genes (*desA* and *desC*) and tobacco plants carrying and expressing the gene of  $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase (*desA*) under the control of the cold inducible CBF1 promoter were obtained.

It was investigated plant adaptation of tobacco *Nicotiana tabacum*, potato *Solanum tuberosum*, orchids *Dendrobium linguella* with heterologous expression of acyl-lipid desaturase genes under conditions of abiotic stress. It is shown that tobacco *Nicotiana tabacum* having the additional desaturase genes is better tolerated to the conditions of hyperthermal, hypothermic and osmotic stresses. *Dendrobium linguella* orchid plant expressing  $\Delta 9$  acyl-lipid desaturase (*desC*) is better adapted to the conditions of low temperatures comparing with the control nontransgenic plants on indicators of superoxide dismutase, malondialdehyde and loss of electrolytes. Potato *Solanum tuberosum* plants, carrying and expressing *desA* gene, demonstrate better adaptation to osmotic stress comparing with the control.

Keywords: acyl-lipid desaturases of cyanobacteria, abiotic stresses, plant genetic transformation, *Nicotiana tabacum*, *Dendrobium linguella*, *Solanum tuberosum*.