

НУБІП України

НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.07 – МР. 1764 “С” 2020.11.12. 05 ПЗ

**ШЕНЬ КАТЕРИНИ ВАЛЕРІЇВНИ**

**2021 р.**

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет Захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:632:633.854.79

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету  
Захисту рослин, біотехнологій  
та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри  
Екобіотехнологій та біорізноманіття

Коломієць Ю. В.

(підпис)

(ПШ)

“ ” 20 р.

Кваско О. Ю.

(підпис)

(ПШ)

“ ” 20 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Створення генетичних конструкцій для отримання біотехнологічних ліній гіпаку *Brassica napus* L. стійких до гліфосату»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ПШ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Доцент к.б.н.,

(підпис)

Гринчук К. В.

Виконала

(підпис)

Шень К. В.

КИЇВ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет Захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Екобіотехнології та  
біорізноманіття

к.б.н. Кваско Олена Юрївна

(підпис)

20 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ  
СТУДЕНТУ

Шень Катерині Валеріївні

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Створення генетичних конструкцій  
для отримання біотехнологічних ліній ріпаку *Brassica napus* L., стійких до  
гліфосату»

затверджена наказом ректора НУБІП України від «12» листопада 2020р. № 1764

«С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 2021.12.07

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: рекомендований  
список літературних джерел, протокол виконання Golden Gate клонування,  
протоколи бактеріальної трансформації, протокол агробактеріальної  
трансформації *Arabidopsis thaliana* L., гліцеролові бактеріальні стоки *Escherichia  
Coli* та *Agrobacterium Tumefaciens* L. штам GV3101.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Визначити генетичні послідовності, які надають стійкість до гербіциду  
гліфосат

2. Розробити архітектуру рекомбінантних ДНК конструкцій для ефективно експресії генів стійкості до гербіцидів гліфосатної групи в рослинах виду *Brassica napus* L., а також ефективної селекції трансгенних рослин;

3. За допомогою методів клонування ДНК зібрати розроблені рекомбінатні плазмідні вектори;

4. Провести трансформацію *Agrobacterium tumefaciens* зі створеними конструкціями;

5. Перевірити функціональність створених конструкцій за допомогою агробактеріальної трансформації *Arabidopsis thaliana* L.

Дата видачі завдання "15" листопада 2020 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Гринчук К.В.

(підпис)

Завдання прийняв до виконання

Шень К.В.

(підпис)

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота: 55 сторінок, 17 рисунків, 48 джерел, 1 додаток.

Мета роботи - створення генетичних конструкцій для трансформації рослин з метою отримання ліній ріпаку, стійких до гербіцидів гліфосатної групи.

Об'єкт дослідження - створення трансгенних рослин ріпаку зі стійкістю до гербіцидів.

Предмет дослідження - створення рекомбінантних ДНК конструкцій з генами стійкості до гербіцидів гліфосатної групи для експресії в рослинах ріпаку *Brassica napus L.*

Створення генетичних конструкцій для *Brassica napus L.* з генами стійкості до гліфосату обумовлена поширенням ГМ продукції у світі та широким використанням ріпаку для різного виробництва.

У першому розділі проведено загальний огляд виду *Brassica napus L.*, умови вирощування та застосування культури. Крім того, проаналізовано розроблені на сьогодні досягнення в генетичній інженерії ріпаку. Досліджено існуючі гени стійкості до гербіцидів гліфосатної групи, які будуть використані у подальших дослідженнях. Вивчено питання використання ГМ ріпаку у світі та питанням вирощування та використання його на території України.

У другому розділі описано реактиви та розчини, а також методики досліджень, використаних у дослідженні.

У третьому розділі проведено створення проміжних а кінцевих генетичних конструкцій з генами стійкості до гліфосату методом Golden Gate клонування.

Перевірено ефективність трансформації *A. Tumefaciens* шляхом ПЛР аналізу.

Проведено попередню перевірку створених конструкцій шляхом агробактеріальної трансформації *Arabidopsis thaliana L.* з якої зроблені висновки щодо функціональності отриманих векторів.

EPSPS GOLDEN GATE BRASSICA NAPUS L. ГЛІФОСАТ РІПАК  
CP4 ТРАНСФОРМАЦІЯ ТРАНСФОРМАЦІЯ

## ЗМІСТ

1. ВСТУП.....	8
2. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
2.1. Загальний опис виду <i>Brassica napus L.</i> .....	11
2.2. Вирощування та застосування як культури.....	13
2.3. Сучасні досягнення в генетичній інженерії виду <i>Brassica napus L.</i> .....	17
2.4. Гени стійкості до гербіцидів.....	19
2.2. Безпечність застосування гену <i>cp4epsps</i> .....	21
2.3. Метод клонування ДНК Golden Gate.....	22
2.4. Сучасний спектр використання трансгенного ріпаку у світі.....	25
2.5. Питання використання трансгенних рослин в Україні.....	27
3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	29
3.1. Реактиви і розчини, використані у дослідженні.....	30
3.2. Протоколи проведення досліджень.....	32
4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	38
4.1. Створення конструкцій методом Golden Gate клонування.....	38
4.2. Отримання та перевірка кінцевих векторів конструкцій.....	42
4.4. Трансформація штаму <i>A. tumefaciens GV</i> створеними конструкціями.....	46
4.5. Експресія створених генетичних конструкцій.....	48
3. ВИСНОВКИ.....	50
4. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	51
ДОДАТКИ.....	57

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГМ – генетично модифіковані  
п.н. – полінуклеотидів

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

5'UTR - 5' послідовність, що не трансліюється

3'UTR - 3' послідовність, що не трансліюється

п.н. – пар нуклеотидів

EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) - 5-енолпірувіл-шікімат-3-фосфат-синтаза

GOX (glyphosate oxidoreductase) - гліфосат оксидаза

що синтезуються/продукуються бактерією *Bacillus thuringiensis*.

PAT (Phosphotricin N-acetyltransferase) - фосфотрицин-N-ацетилтрансфераза

LB – живильне середовище Luria-Bertani

## 1. ВСТУП

Сільськогосподарські рослини є одним із найбільш часто цитованих прикладів генетично модифікованих організмів. Більшість розробок у напрямку рослинництва полягають у підвищенні врожайності культур, надання стійкості до шкідників та пестицидів, підвищенні кількості вмісту поживних речовин.

*Brassica Napus L.*, тобто ріпак, використовується для виробництва високоякісної рослинної олії для споживання людиною та як борошно з високим вмістом білка для годівлі великої рогатої худоби, птиці, свиней та риби. Сорти *B. napus* також застосовуються як сировина для біопалива.

Генетичні конструкції є важливою частиною біотехнології, що дозволяє керувати експресією гетерологічних генів залежно від того, які елементи входять до її складу. Зазвичай рівень експресії гетерологічних генів як за транз'єнтною, так і за стабільною генетичною трансформацією має бути високого рівня.

Відповідно, актуальність дослідження обумовлена сучасним станом розвитку сільського господарства та широким застосуванням гербіцидів гліфосат-вмісних груп, відповідно необхідністю отримання стійких біотехнологічних ліній ріпаку *Brassica napus L.*, як однієї з важливих промислових культур.

Метою дослідження є створення генетичних конструкцій для трансформації рослин з метою стримання ліній ріпаку, стійких до гербіцидів гліфосатної групи. Для досягнення мети було визначено наступні завдання:

1. Визначити генетичні послідовності, які надають стійкість до гербіциду гліфосат.
2. Розробити архітектуру рекомбінантних ДНК конструкцій для ефективної експресії генів стійкості до гербіцидів гліфосатної групи в рослинах виду *Brassica napus L.*, а також ефективної селекції трансгенних рослин;
3. За допомогою методів клонування ДНК зібрати розроблені рекомбінантні плазмідні вектори;



4. Провести трансформацію *Agrobacterium tumefaciens* зі створеними конструкціями;

5. Перевірити функціональність створених конструкцій за допомогою агробактеріальної трансформації *Arabidopsis thaliana* L.

**Об'єкт дослідження:** створення трансгенних рослин ріпаку зі стійкістю до гербіцидів

**Предмет вивчення:** створення рекомбінантних ДНК конструкцій з генами стійкості до гербіцидів гліфосатної групи для експресії в рослинах ріпаку *Brassica napus* L.

**Матеріали і методи досліджень.**

- набори плазмідних векторів для клонування «The MoClo Plant Parts Kit» [5];
- штами бактерій використані у роботі: *E. coli* штам TOP10, *A. Tumefaciens* штам GV 3101;
- синтезовані кодуючі послідовності генів *gax* [10], *zmer:ps* [28], *sp4epsps* [9], *bnepsps*;
- насіння *Arabidopsis thaliana* (L.);
- конструкції створено за допомогою методу ДНК клонування Golden Gate assembly;
- для напрацювання клонованих конструкцій здійснено трансформацію *E. Coli* методом heat shock;
- конструкції було перевірено за допомогою рестрикційного аналізу;
- здійснено генетичну трансформацію *A. tumefaciens* методом електропорації;
- колонії *A. tumefaciens* на наявність конструкції перевірено за допомогою ПЦР аналізу;
- проведено агробактеріальну трансформацію *Arabidopsis thaliana* методом занурення квіток.

**Структура та обсяг дипломної роботи.** Дипломна робота складається зі вступу, 3-х розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає найменувань. Робота викладена на 52 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дипломної роботи подано у вигляді 17 рисунків.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## 2. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 2.1. Загальний опис виду *Brassica napus* L

Ріпак є представником сімейства Brassicaceae (сімейство гірчиць або капустяних), що культивується в основному для отримання олійного насіння, яке, природно, містить значні кількості ерукової кислоти. Рапс – це група сортів ріпаку, які були виведені з дуже низьким вмістом ерукової кислоти і особливо цінуються для використання в їжу для людей і тварин.

*Brassica napus* — однорічний або дворічний вид. Стебла прямостоячі, від простих до вільно розгалужених, голі або рідкovoлохаті, можуть вирости до 1,5 м/заввишки. Листя воскоподібні з голою нижньою стороною і часто мають збільшену основу, яка частково охоплює стебло. Суцвіття являють собою кисти, які утворюються на головних і пазушних гілках. Цвітіння починається біля основи суцвіття, а бутони утворюються над розкритими квітками. Блідо-жовті квітки мають 4 чашолистки і 4 протилежні по діагоналі оберненояйцевидні пелюстки, розташовані у вигляді хреста, якщо дивитися зверху. Тичинки чотиридинамічні з чотирма довгими і двома короткими тичинками в кожній квітці. Яечник верхній.

Плід являє собою лінійний циліндричний стручок із невеликими перетяжками через рівні проміжки та розгинаючими клапанами в нижній частині плоду 4–10 см (Рис. 2.1. А). Насіння розташовуються в один ряд. Середній розмір насіння складає 1,5-3 мм (Рис.2.1.Б). Верхній сегмент стручка товщиною 3,5–5,0 мм вузький і зазвичай не має насіння [12].



Рис. 2.1. А) Плід *Brassica napus* L. – стручок  
Б) Насіння ріпаку

Сім'ядолі з'єднані (тобто згорнуті поздовжньо навколо корінця в насінні).

Під час проростання з'являються сходи, точка росту розташована між сім'ядолі. На стадії розсади сім'ядолі мають ниркоподібну форму шириною 6–12 мм і мають глибоку широку заокруглену виїмку на кінчику (23).

Розсада виростає, утворюючи розетку з 5-6 листків, старше листя біля основи і менші молоді листки в центрі розетки. Прикореневі листки розетки короткочерешкові, зубчасті, сизисті, яйцевидні до подовжених і щільні до лопатевих з 1-5 парами малих бічних часток і великою кінцевою часткою. Болтування, подовження стебла, розгалуження та формування верхнього листя є наступним етапом росту рослини.

Диференціація між *Brassica napus* і близькими родичами може бути важкою, оскільки вони можуть мати схожі морфологічні ознаки. Незважаючи на це, між *B. napus* і *B. cara* є відмінності. Листя *B. napus* безволосі, гладкі, м'ясисті і блакитно-зеленого кольору, а у *B. cara* — жовтувато-зелені. Основа листя *B. napus* частково обхватує стебло, а у *B. cara* повністю. У *B. napus* бруньки розташовані над розкритими суцвіттями, тоді як у *B. cara* бруньки розташовані

нижче розкритих суцвіть у суцвітті. Квітки *B. para* менші та темніші, ніж квітки *B. napus* (23).

## 2.2. Вирощування та застосування як культури

Посів *B. napus* може бути осіннім або весняним. Слід висівати на глибину 12–25 мм у вологе тверде посівне ложе. Широкий посів, як правило, не рекомендується, але він все ще зазвичай використовується там, де умови ґрунту не дозволяють використовувати сівалки. Було встановлено, що міжряддя 23–30 см оптимізує врожай [34]. Густота насадження повинна становити 70–100 рослин на квадратний метр.

Розвиток ріпаку відбувається у декілька етапів:

1. Проростання (фаза сім'ядолей);
2. Поява сходів;
3. Формування листків та розетки;
4. Розвиток листя (опадання старого та поява нового);
5. Стеблуння (відбувається навесні, коли відновлюється вегетація);
6. Бутонізація — утворення бутонів на суцвіттях;
7. Цвітіння;
8. Утворення стручків;
9. Дозрівання (Рис 2.2).



Рис. 2.2. Етапи росту ріпаку *Brassica napus* L.

Н Щоб уникнути значного пошкодження насіння та загибелі розсади, добрива слід вносити під час висіву в бічній або середній рядках. Культура є сіркофільною, тому на її врожайність впливає забезпеченість ґрунту цим та іншими поживними елементами. Інтенсивна технологія вирощування ріпаку потребує проведення хімічних проб для визначення вмісту у землях сірки, магнію, NPK.

Н При виборі добрив слід враховувати, що для отримання оптимальної врожайності вносять не менш ніж 250 кг/га азотних добрив, 25% яких восени перед або під час посіву.

Н Для засвоєння азоту культурі необхідна сірка, а також сульфат магнію – у нормі 100 кг/га перед посадкою, та 2-3 рази впродовж вегетації у нормі 5 кг/га.

Н При внесенні добрив для підживлення рапсу безпосередньо під час сівби слід враховувати декілька факторів:

- НУ • Забезпечення швидкої розчинності та доступності поживних елементів кореневій системі рослин. Оптимальними вважаються рідкі, гранульовані та мікрогранульовані добрива.
- На початковому етапі розвитку окрім азоту та фосфору добрива повинні містити сірку та молібден (10г/га).
- НУ • Гранульовані та мікрогранульовані добрива в складі яких міститься необхідний набір макро та мікроелементів можуть вноситись у вдвічі меншій нормі, аніж важкорозчинні добрива.
- За умов дефіциту вологи у бакову суміш потрібно додатково включати мідь, марганець, цинк, бор та залізо.

НУ ВІП Українці Ріпак можна збирати як роздільним способом, так і прямим комбайнуванням. За роздільного способу збирання скошування проводять у фазі жовто-зеленої стиглості — потемніння насіння у стручку близько 50% за його вологості 30–35%. Висота зрізу рослин при цьому має бути не меншою 20–25 см.

НУ ВІП Українці Крім того, вирощування ріпаку має ряд переваг:

- НУ ВІП Українці 1. Стимулювання врожайності пшениці. Як попередник, він сприяє підвищенню аерації ґрунту та акумуляції вологи. Пшениця, висіяна на

ділянках після нього, збільшує свою врожайність на 10-30%. Цінний в якості сидерату, адже підвищує вміст органічної речовини у ґрунті так само, як перегній у кількості 10-15 т/га.

2. Раннє досягання. Вже в середині квітня — на початку травня озимі сорти формують велику кількість зеленої маси, яка може використовуватись тваринницькою галуззю для корму. Ця властивість дозволяє вирощувати їх як проміжну чи післязливну культуру.

3. Якісний біофумігант. У рослини розвинена коренева система, тому її культивування значно знижує засміченість полів бур'янами. Крім того, при дотриманні технології структура землі значно покращується. Схильність до ерозії зменшується.

4. Переривання циклу фіто захворювань. Короткі терміни сівозміни значно підвищується ризик появи таких захворювань як фузаріоз, фомоз, переноспороз, склеротиніоз. Використання ріпаку, та його решток (у якості мульчі), в яких містяться глюкозинолати, сприяє пригніченню формуванню у землі патогенних мікроорганізмів та знижує ризик захворювань наступної культури.

5. Нижча ціна виробництва. Потрібно менших витрат на фунгіцидний захист та внесення мінеральних добрив (фосфору, азоту). При використанні рослини як попередника, для пшениці знижуються витрати на гербіциди.

Ріпак вирощують для виробництва кормів для тварин, харчових рослинних олій, біодизельного палива. У 2000 році ріпак був третім джерелом рослинної олії у світі після сої та пальмової олії. Це друге у світі джерело білкового шроту після сої [25].

При переробці ріпаку для виробництва олії отримують ріпаковий шрот як побічний продукт. Побічним продуктом є корм для тварин з високим вмістом білка, конкурентоспроможний з соєвими бобами. Корм використовується в основному для годівлі великої рогатої худоби, але також використовується для свиней і птиці. Однак натуральне ріпакове масло містить 50% ерукової кислоти

і високий рівень глюкозинолатів, що значно знижує харчову цінність ріпакової макухи на корм тваринам [36].

Рапсова олія є однією з найстаріших відомих рослинних олій, але історично використовувалася в обмежених кількостях через високий вміст ерукової кислоти, яка пошкоджує серцевий м'яз тварин, і глюкозинолатів, що робило її менш поживною в кормах для тварин. Ріпакова олія може містити до 54% ерукової кислоти [38]. Харчова канолина олія, отримана з серців ріпаку, також відома як ріпакова олія 00, рапсова олія з низьким вмістом ерукової кислоти, олія

LEAR та олія, еквівалентна ріпаковій каноли, загалом визнана безпечною

Управлінням з контролю за продуктами і ліками США. Олія каноли обмежена державним регулюванням максимум 2% ерукової кислоти за вагою в США і 2% в ЄС зі спеціальними правилами для дитячого харчування. Вважається, що ці низькі рівні ерукової кислоти не завдають шкоди немовлятам [4].

Рапсова олія також використовується як дизельне паливо, як біодизельне паливо, безпосередньо в системах з підгрівом палива, або змішується з нафтовими дистилатами для приводу двигунів. Біодизель можна використовувати в чистому вигляді в нових двигунах без пошкодження двигуна

і часто поєднується з дизельним паливом на викопному паливі в співвідношенні, що варіюється від 2% до 20% біодизеля. Через витрати на вирощування, подрібнення та переробку біодизельного палива з ріпаку, біодизельне паливо, отримане з ріпакового насіння з нової олії, коштує більше, ніж стандартне дизельне паливо, тому дизельне паливо зазвичай виготовляють із

відпрацьованого масла. Рапсова олія є кращим запасом олії для виробництва біодизельного палива в більшості країн Європи, на яку припадає близько 80% вихідної сировини, частково тому, що ріпак виробляє більше олії на одиницю землі в порівнянні з іншими джерелами олії, такими як соєві боби, але насамперед тому, що канолина олія має значно нижчу точку гелеутворення, ніж більшість інших рослинних олій.

Ріпак також використовується як покривна культура в США взимку, оскільки він запобігає ерозії ґрунту, виробляє велику кількість біомаси, пригнічує бур'яни



та може покращити обробіток ґрунту за допомогою кореневої системи. Деякі сорти ріпаку також використовуються як одисичний корм і готові до висушування через 80-90 днів після посадки [6].

Ріпак має високий медоносний потенціал і є основною кормовою культурою для бджіл. Монофлорний ріпаківий мед має білуватий або молочно-жовтий колір, перцевий смак і, завдяки швидкому часу кристалізації, м'яко-тверду консистенцію. Він кристалізується протягом 3-4 тижнів і з часом може бродити при неправильному зберіганні. Низьке співвідношення фруктози та глюкози в монофлорному ріпаківому меді призводить до того, що він швидко гранулюється в сотах, змушуючи бджолярів витягувати мед протягом 24 годин після його закупорювання [11].

Ріпак був досліджений як засіб, що містить радіонукліди, які забруднили ґрунт після Чорнобильської катастрофи, оскільки він має швидкість поглинання в три рази більше, ніж інші зернові, і лише приблизно від 3 до 6% радіонуклідів. перейти до олійних культур [40].

### 2.3. Сучасні досягнення в генетичній інженерії виду *Brassica napus* L.

Культури, що містять генетично модифіковані (ГМ) ознаки, широко вирощуються вже більше двадцяти років, і станом на 2018 рік загальна площа, засіяна цими культурами, становила близько 184 мільйонів гектарів.

Боротьба з комахами-шкідниками є однією з найбільших проблем при вирощуванні *Brassica napus*. Комах-шкідників зазвичай контролюють за допомогою інсектицидів, але все більша кількість популяцій, стійких до інсектицидів, соціально-економічний контекст заперечують проти використання лише цих речовин. Стійкість рослин – це класична і перевірена альтернативна стратегія захисту рослин, яка є основним інструментом комплексної боротьби зі шкідниками.

Щоб зменшити шкоду, завдану проросткам ріпаку від комах, які ранньо атакують, [7] збільшили щільність трихом на черешках і перших листках трансгенних рослин у 1000 разів порівняно із звичайним сортом. Це було

НУБІП УКРАЇНИ

досягнуто шляхом перенесення регуляторного гена трихом *AtGL3* з *Arabidopsis thaliana* в генوم *B. napus* з подальшим знищенням гена *BnTTG1*, щоб забезпечити ріст рослин, подібний до початкового сорту. Під час лабораторних аналізів, а також у польових випробуваннях отриманий «волохатий рапс» був явно більш стійким до бліх і до ромбовидної молі [30].

НУБІП УКРАЇНИ

Також методи генної інженерії були успішно використані для модифікації профілю жирних кислот *B. napus* і *B. juncea*. Ко-супресійні плазмиди, що несуть гени олеатдесатурази FAD2 (1-acyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Delta12-desaturase) від кожного виду, були сконструйовані та передані в австралійські елітні/селекційні лінії *B. napus* та *B. juncea* за допомогою методів трансформації рослин *Agrobacterium tumefaciens*. Модифікації існуючих прогеклів трансформації *Brassica* та використання гена стійкості до гігроміцину, перерваного інтроном, як селекційного маркера привели до підвищення ефективності трансформації. Приглушення генів ендогенної олеатдесатурази призвело до значного підвищення рівня олеїнової кислоти до 89% у *B. napus* і 73% у *B. juncea*.

НУБІП УКРАЇНИ

Канада є однією з провідних країн світу з вирощування ріпаку. Основним фактором, що впливає на виробництво ріпаку *Brassica napus* в Канаді, є знищення заморозів під час розвитку сходів навесні та дозрівання насіння восени.

НУБІП УКРАЇНИ

У 2008 році канадськими вченими було проведено дослідження по виробництву мутантів з високою холодостійкістю ріпаку *Brassica napus*. Метою цього дослідження було дослідити можливість виробництва ліній ріпаку з мутаціями, які змінили біохімічні шляхи, що підвищують холодостійкість.

НУБІП УКРАЇНИ

Підхід полягав у створенні ультрафіолетових точкових мутацій у культивованих мікроспорах з подальшим хімічним відбором *in vitro* скремних мутантних мікроспор або ембріонів, що призвело до вимірних змін у різних біохімічних шляхах із підвищеним рівнем ключових захисних сигнальних молекул, таких як салицилова кислота (SA), *p*-Фтор-D,L-фенілаланін (FPA) і жасмонсва кислота (JA).

НУБІП УКРАЇНИ

Крім того, оскільки відомо, що пролін (Pro) захищає тканини рослин у шляху осмотичного стресу, викликаного холодом, мутанти, які надлишково виробляють Pro, були відібрані *in vitro* за допомогою трьох аналогів Pro: гідроксипроліну (HP), азетидин-2-карбоксилату (A2C), і 3,4-дегідро-D,L-пролін (DP).

З 329 відібраних мутантних ембріонів *in vitro*, отриманих у 74, було виявлено значну стійкість до холоду порівняно з їхніми батьками-донорами за допомогою тестів у морозильній камері в приміщенні при  $-6^{\circ}\text{C}$ , а 19 мали кращу виживаність у зимовому полі, ніж зимові перевірки ріпаку. Усі хімічно відібрані мутантні подвійні гаплоїди з підвищеною холодостійкістю добре порівняно з батьківськими лініями за всіма якістю насіння та агрономічними параметрами. Розвиток підвищеної морозостійкості сортів має дозволити виробляти ярий ріпак у західній Канаді без шкоди для якості насіння [39].

#### 2.4. Гени стійкості до гербіцидів

На сьогодні існує два основних підходи для отримання рослин зі стійкістю до гербіцидів:

1. Модифікація ферменту або іншої мішені для дії гербіциду у рослині, що робить її нечутливою до гербіциду або стимулювання надвиробництва немодифікованого білка-мішені, тим самим забезпечуючи нормальний обіг метаболізму, незважаючи на наявність певної концентрації гербіциду;
2. Експресія білка або білкової системи для деградації та / або детоксикації активної речовини гербіциду в рослині до того, як він почне діяти. Такі рослини можна отримати методом селекції рослин за стійкістю до гербіциду, або за допомогою методів генної інженерії.

Гліфосат - це гербіцид широкого спектру дії та осушувач рослин. Це фосфорорганічна сполука, зокрема фосфонат, який діє, пригнічуючи рослинний фермент 5- енолпіруваткімат-3-фосфатсинтазу (Рис.2.3). Застосовується для знищення бур'янів, особливо однорічних широколистяних бур'янів та трав, які

конкурують із культурами. Дія гліфосату зумовлена тим, що він інгібує рослинний фермент 5-енолпірувильшікімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS).

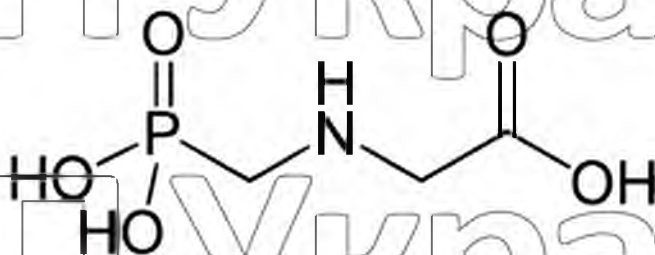


Рис.2.3. Розгалужена хімічна формула гліфосату

Фермент EPSPS каталізує перенесення енолпірувильної порції фосфоенолпірувату до 5-гідроксильної групи шикімат-3-фосфату з утворенням 5-енолпірувильшікімат-3-фосфату на передостанній стадії шикімат шляху. У рослинах, грибах та бактеріях Шікіматний шлях є критичним для біосинтезу ароматичних амінокислот, таких як тирозин, триптофан та фенілаланін. EPSPS є мішень для N-фосфонометил-гліцину (гліфосат) [35].

Гліфосат нагадує тимчасовий фосфоенолпіруват і утворює тупик комплекс з ферментом, зв'язаним з хлоропластом EPSPS, що призводить до повного гальмування шикіматного шляху. Тому, коли гліфосат потрапляє в рослину, він проникає в клітини, блокує синтез ряду амінокислоти, і рослина гине. Компанія Monsanto запатентувала гліфосат як речовину-компонент гербіцидів проти бур'янів в 1970-х роках, а перший гербіцид «Roundup» (Раундап) отримав дозвіл у США у 1974 році і незабаром після цього в усіх європейських країнах. Сьогодні гліфосат залишається активним інгредієнтом у більшості таких несистемних гербіцидів як Roundup®, Tomado®, Uragan Forte®, «Тріумф», «Агрокілер» тощо, які використовуються для боротьби з однорічними та багаторічними бур'янами протягом вегетації [41]. На сьогодні 85% вирощуваних в усьому світі ГМ-культур є стійкими до гербіцидів і майже половина (65 млн га) сільськогосподарських угідь США була засаджена у 2012 році культурами від Monsanto з стійкістю до гліфосату. В Європейському Союзі на розгляді Європейської комісії знаходиться 14 заявок на затвердження ГМ-культур стійких до гербіцидів та зокрема до гліфосату які дозволені для комерційного

виробництва. Це кукурудза, бавовна, соя і цукрові буряки. При цьому, неможливо не звернути увагу на те, що ріпак *Brassica napus* L. також входить до числа комерційно важливих культур, тому запитання створення ліній ріпаку, стійких до гліфосату є досить актуальним [46].

Один з перших видів ГМ ріпаку було створено американською компанією Monsanto. Для виробництва ріпаку, стійкого до гербіциду Roundup Ready в геном рослини було введено два гени. Один є геном, стриманим від прунтової бактерії *Agrobacterium* штаму CP4, який кодує фермент EPSPS. Інший — ген із штаму *Ochrobactrum anthropi* LBAA, який кодує фермент гліфосатоксидазу (GOX).

Фермент CP4 EPSPS надає високу толерантність до гліфосату, тому рослини все ще можуть створювати ароматичні амінокислоти навіть після застосування гліфосату [32].

## 2.2. Безпечність застосування гену *cp4epsps*

Безперечно, перш за все постає запитання безпечності використання гену CP4 EPSPS для комерційних культур. Безпека харчових продуктів та кормів білків, що виробляються на посівах ГМ, оцінюється за допомогою дворівневого підходу, що обґрунтовує достовірність [13]. Перший рівень містить масу доказів, що підтверджують безпеку білка шляхом оцінки: історії безпечного використання, біоінформатичного аналізу, способу дії, засвоєваності in vivo, стійкості до тепла, рівня експресії та споживання їжі [13]. На основі оцінки першого рівня не було виявлено небезпеки для CP4 EPSPS [24]). Ці дані першого рівня включали: (1) біоінформаційний аналіз, який не виявляє суттєвих структурних подібностей між CP4 EPSPS та білками, пов'язаними з 98 алергією або токсичністю, та (2) сприйнятливість CP4 EPSPS до швидкої деградації як пепсином, так і панкреатином, підтверджуючи висновок, що це білок навряд чи може бути алергічним або токсичним, і внаслідок потрапляння їжі або кормів із культур, що експресують цей білок, не відбудеться значущого впливу інтактного CP4 EPSPS (24). У кожному конкретному випадку підтверджувальний другий рівень тестування може бути використаний для подальшої оцінки потенціалу

токсичності для ссавців за допомогою відповідної моделі на тваринах (наприклад, дослідження токсикології *in vivo*). Незважаючи на те, що при оцінці першого рівня не було виявлено жодної небезпеки, для подальшого забезпечення безпеки було проведено дослідження гострої токсичності на мишах із CP4 EPSPS. Жодних побічних ефектів не спостерігалось, коли миші отримували гостру дозу 572 мг / кг маси тіла перорально, що набагато перевищувало очікуваний вплив людини на продукти хачування, що потенційно містять *cp4epsps* [33].

### 2.3. Метод клонування ДНК/Golden Gate

Синтетична біологія – це нова міждисциплінарна галузь, яка має на меті зробити проектування, конструювання та оптимізацію біологічних систем простішими та надійнішими. Досягнення в синтетичній біології поглиблюють наше розуміння того, як працюють біологічні системи, і повинні дозволити швидше і дешевше розробляти корисні ліки, хімічні речовини та матеріали, нові засоби для обробки інформації та зберігання даних, а також джерела їжі та енергії, які можуть допомогти зміцнити здоров'я людини. і зберегти навколишнє середовище [29].

Синтетична біологія обіцяє революціонізувати біотехнологію шляхом створення інженерних організмів з новими фенотипами, яких немає в природі. Застосування включають мікробне виробництво хімічних попередників, нових антибіотиків та біопалива, створення синтетичних аттенуєваних вірусів для використання в якості вакцин [47] та створення мінімальної вільної живої клітини [20].

Важливим елементом синтетичної біології є здатність фізично збирати складні молекули ДНК, що містять велику кількість природних або штучних генетичних елементів. За останні кілька років було досягнуто вражаючого прогресу з розробкою методів, які дозволяють зібрати великі фрагменти ДНК розміром до розміру штих геномів бактерій [14]. Більшість цих методів засновані на використанні гомологічної рекомбінації (як *in vivo*, так і *in vitro*), що

забезпечує незалежність від наявності будь-яких сайтів рестрикції у фрагментах, які збираються. Однак для створення організмів з новими фенотипами буде потрібно не тільки здатність збирати великі шматки ДНК, але й методи, які дозволяють генерувати багато варіантів конструкцій для оптимізації бажаного фенотипу. Справді, оскільки бажаний фенотип неможливо передбачити безпосередньо лише з генних послідовностей, розвиток штамів та оптимізація фенотипу вимагатимуть здатності генерувати численні комбінації різних кодуєчих послідовностей, а також безліч варіантів їх регуляторних послідовностей. Така оптимізація не обов'язково повинна працювати в масштабі геному, і насправді робота, яка зараз виконується для метаболічної інженерії, вже належить до цього типу зусиль. У цьому контексті потрібні методи, які дозволяють генерувати конструкції або бібліотеки конструкцій, що містять достатньо генів для інженерії шляхів, тобто в діапазоні розмірів від 10 до 100 кб. Незважаючи на значну роботу, зроблену в галузі метаболічної інженерії за останні кілька років, методи, які зараз використовуються для складання конструкцій, все ще є обмеженими, оскільки більшість роботи все ще виконується за допомогою стандартних методів конструювання ДНК, які вимагають детального планування та кількох етапів клонування [45.].

Метод клонування Golden Gate – це метод збирання фрагментів ДНК, що базується на використанні ферментів рестрикції IIS типу [8]. Він має багато особливостей, які є оптимальними для розробки стандарту збірки. Цей метод збирання ДНК дозволяє уникнути деяких неефективних, тимчасових і дорогих стадій молекулярного клонування, зокрема таких, як ампліфікація (ПЛР) фрагментів ДНК, виділення та очищення фрагментів ДНК з гелю, а також розробка нестандартних праймерів (Рис. 2.4). На відміну від інших методів збірки ДНК, він не вимагає перекриття фланкуючих послідовностей або сайтів рекомбінації, але вимагає лише відносно невеликих чотирьох пар нуклеотидів, які називаються ф'южн-сайтами, щоб приєднатися до сусідніх модулів, і навіть вони можуть бути спроектовані таким чином, щоб дозволити збір, де це необхідно [44]. Транскрипційні одиниці можуть бути зібрані зі стандартних

модульних частин із використанням одностадійної реакції клонування Golden Gate, і збірка вищих порядків в мультигенних конструкціях може бути виконана з використанням аналогічної процедури [14]. Обмеження методу клонування Golden Gate полягає в тому, що внутрішні сайти послідовностей розпізнавання для ферментів типу ІІs, що використовуються для збірки, повинні бути вилучені з усіх стартових модулів.

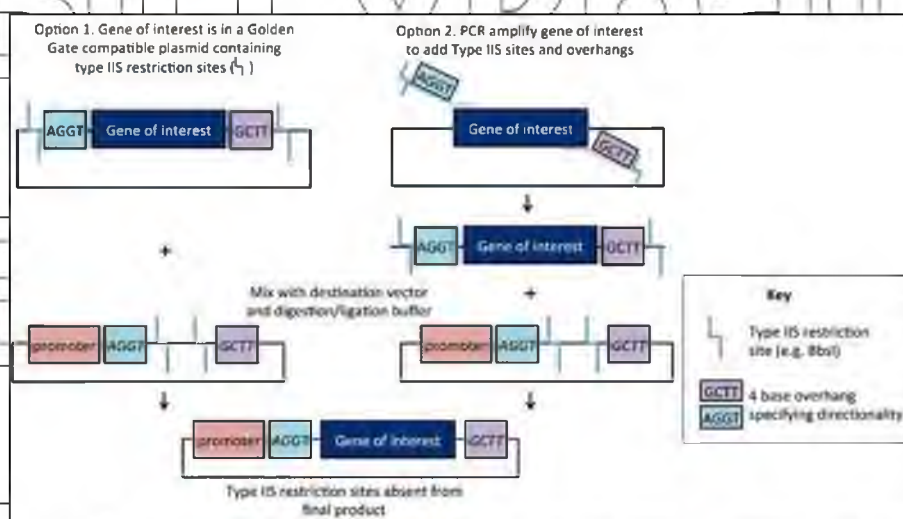


Рис.2.4. Схема проведення клонування ДНК методом Golden Gate

Як зазначалося вище, метод клонування Golden Gate – це проста стратегія швидкого субклонування, яка використовується для перенесення будь-якого необхідного фрагмента ДНК з проміжного вектору у вектор експресії, і не залишає послідовностей сайтів рекомбінації в ДНК. Це спосіб збирання багатокomпонентної ДНК, який дозволяє паралельно збирати декілька фрагментів ДНК. Він ґрунтується на ідеях традиційного методу рестрикційного розрізання та лігування ДНК, проте клонування Golden Gate проводиться в одній пробірці з майже 100 % ефективністю і використовує ендонуклеази рестрикції ІІs типу, при цьому під час клонування використовується тільки одна ендонуклеаза рестрикції ІІs типу. Цей метод був запропонований у 2008 році Dr. Marillonnet зі спів. [44]. Вони розробили цю систему на противагу більш традиційним сайт-специфічним системам рекомбінації, зокрема таким, як система Gateway від компанії Invitrogen і система Creator Cloning від компанії Clontech. Хоча ці технології є ефективними, простими у використанні і



гнучкими, вони обмежені, оскільки послідовності сайтів рекомбінації довжиною 8–13 амінокислот залишаються в кінцевій конструкції. Можна усунути ці сайти рекомбінації з кінцевих векторів для експресії за допомогою інтронів. Однак цей спосіб може бути застосований тільки в еукаріотичних системах і не може бути жодних небажаних сайтів сплайсингу в послідовностях білка [1].

Клонування Golden Gate має багато переваг, оскільки воно дозволяє уникати деяких неефективних, трудомістких і дорогих етапів традиційного молекулярного клонування, наприклад, ПЦР ампліфікація, гель-очищення та замовлення звичайних праймерів. Вона не вимагає перекривання фланкуючих послідовностей або послідовностей сайтів рекомбінації всередині ДНК, що підлягають клонуванню.

#### **2.4. Сучасний спектр використання трансгенного ріпаку у світі**

Генетично модифіковані культури піддаються значному регулюванню в усьому світі.

Для того щоб ГМ-культура була схвалена для вилуску в США, вона повинна бути оцінена Службою інспекції з охорони здоров'я тварин і рослин (APHIS) при Міністерстві сільського господарства США (USDA), а також може бути оцінена Управлінням з контролю за продуктами і ліками (FDA) та Агентства з охорони навколишнього середовища (EPA), залежно від передбачуваного використання. USDA оцінює потенціал рослини стати бур'яном. FDA регулює сільськогосподарські культури, які використовуються як їжа або корм для тварин [4].

У Канаді, найбільшому виробнику ГМ ріпаку, ГМ-культури регулюються Міністерством охорони здоров'я Канади відповідно до Закону про харчові продукти та ліки, а Канадське агентство з інспекції харчових продуктів [6] відповідає за оцінку безпеки та харчової цінності генетично модифікованих харчових продуктів. Екологічна оцінка рослин, отриманих за допомогою біотехнологій, проводиться Управлінням з біобезпеки рослин (PBO) CFIA. Ріпак,

стійкий до гліфосату та гліфосінату, був першими двома ГМ рослинами, які отримали схвалення в Канаді.

В Австралії Roundup Ready Canola була схвалена для комерційного виробництва в 2003 році регулятором генних технологій після проходження приблизно 400 тестів і досліджень, щоб визначити, що вона безпечна. Харчові стандарти Австралії Нової Зеландії також схвалили цей продукт як безпечний для споживання людиною в тому ж році.

Культивування генетично модифікованих рослин зростає у всьому світі. За даними організації ISAAA, площі зросли в минулому році на 3 % до близько 190 мільйонів гектарів. У минулому році в 24 країнах, у тому числі 19 тих, що розвиваються, і 5 промислово розвинених, вирощували ГМ-культури. 53% усього вирощування припадає на країни, що розвиваються, а 47% у промислово розвинених країнах.

Найбільш важливими ГМ рослинами є соєві боби, кукурудза, бавовна та ріпак. У випадку сої частка ГМО у загальному обсязі врожаю становить 77%, бавовна — 80%, кукурудза — 32%, а ріпак — 30%. Асортимент ГМ-культур розширився такими культурами як генетично модифікована картопля, яблука, цукрові буряки та гарбуз [18].

У всьому світі ріпак є однією з найпоширеніших олійних культур. Вирощування ріпаку залишається стійким, і основні країни-виробники вважають його стратегічною культурою. Багато в чому це зумовлено важливістю ріпакової олії: як харчовий продукт вона цілком може конкурувати з оливковою, знижувати рівень холестерину в крові та запобігати інфарктам та інсультам. Він широко використовується в промисловості як біопаливо. Зелений рослинний матеріал, сіно та борошно є кормом для худоби. Ця культура є чудовим сидератом і чудовим медоносом, оскільки з одного гектара посівів бджоли дають 60-90 кг меду.

За даними Kleffmann Group, загальна площа посіву ГМ ріпаку у світі у 2019 році становила 35 млн га. П'ять лідерів за посівними площами засіли ріпаком 29,8 млн га, що становить 85% усіх посівних площ у світі.

Канада: 8,4 млн га

Індія: 7,3 млн га

Китай: 6,6 млн га

ЄС: 5,6 млн га

Австралія: 1,9 млн га

З незначними площами під цією культурою перше місце зайняли Чилі (4,1 т/га), Туреччина (3,5 т/га) та Швейцарія (3,1 т/га), за ними – країни ЄС із середньою врожайністю 3,0 т/га.

## 2.5. Питання використання трансгенних рослин в Україні

Генетично модифіковані (ГМ) рослини – рослини, генетичний матеріал яких (послідовність ДНК) був штучно змінений методами генної інженерії. Такі рослини також часто називають трансгенними, тобто мається на увазі, що фрагменти ДНК з певного організму були перенесені в геном рослини.

Незважаючи на те, що закон «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів [2]. був прийнятий ще в 2007 році, Україна поки знаходиться лише на порозі впровадження ГМО. Жодного сорту до Державного реєстру ГМО поки не включено, тобто в Україні досі немає жодної офіційно зареєстрованої ГМ-рослини.

ГМО, в тому числі і ГМ-сорти рослин, повинні відповідати вимогам біологічної та генетичної безпеки. Біологічна безпека, згідно з законом, полягає у відсутності негативного впливу на людину (в тому числі і на майбутні покоління), сільськогосподарські рослини і тварини, а також на інші живі організми. Генетична безпека передбачає відсутність неприродного та неконтрольованого впливу на геном людини, сільськогосподарських тварин та рослин, інші біологічні об'єкти.

Згідно з законом, використання ГМ-рослин у «відкритій системі» (тобто при контакті з навколишнім середовищем, наприклад, при вирощуванні у відкритому ґрунті) можливе лише після державної реєстрації. До реєстрації вивільнення з

навколишнє середовище ГМО можливе тільки з метою випробовувань і на основі спеціального дозволу.

Державну реєстрацію ГМО здійснюють центральні органи виконавчої влади.

Реєстрація здійснюється строком на п'ять років на безоплатній основі, перереєстрація здійснюється у тому ж порядку, що і реєстрація. Термін розгляду документів не може перевищувати 120 днів з дня їх подачі. Підставою для державної реєстрації ГМ-сортів є експертиза, тарифи якої затверджені постановою Кабінету Міністрів України від 18 листопада 2009 р. № 1223 «Про затвердження розмірів тарифів на проведення експертизи, яка є підставою для державної реєстрації генетично модифікованих організмів сортів сільськогосподарських рослин у відкритій системі» [3].

Суб'єкти господарювання, які вперше вводять в обіг продукцію, що містить ГМО або отримана з їх використанням, складають у довільній формі письмову декларацію, в якій в обов'язковому порядку зазначаються:

- відомості про суб'єкта господарювання;
- інформація, що така продукція містить ГМО або отримана з їх використанням;
- номер у Державному реєстрі ГМО.

Суб'єкти господарювання під час проведення всіх операцій з передачі продукції, що містить ГМО або отримана з їх використанням, забезпечують надання копії декларації суб'єктам, яким вони передають таку продукцію.

Декларація або її копія повинна зберігатися протягом п'яти років з дня передачі продукції. Також такі суб'єкти зобов'язані зберігати документацію, яка дає змогу ідентифікувати суб'єкта господарювання, який передав їм відповідну продукцію, та суб'єкта, якому здійснили передачу вони. Транспортування та зберігання ГМО повинно передбачати здійснення комплексу заходів, що попереджують неконтрольоване його вивільнення у навколишнє природне середовище.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

### 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Основною метою нашого дослідження є створення генетичних конструкцій для отримання біотехнологічних ліній ріпаку. Для досягнення поставленої мети дослідження було розділено на наступні етапи:

1. Визначення генетичних послідовностей, які надають стійкість до гербіциду гліфосат;
2. Розробка проміжних векторів (модулів) першого рівня, кожен з яких містить окрему транскрипційну одиницю;
3. Трансформація *Escherichia coli* отриманими генетичними конструкціями;
4. Аналіз проміжних плазмідних векторів—рестрикційний та ПЛР аналіз;

5. Збірка конструкцій першого рівня у кінцевий вектор;
6. Трансформація *Escherichia coli* кінцевими генетичними конструкціями;
7. Аналіз генетичних конструкцій— рестрикційний та ПЛР аналіз;
8. Трансформація *Agrobacterium tumefaciens* перевіреними плазмідами;
9. Агробактеріальна трансформація *Arabidopsis thaliana* за допомогою методу занурення квіток
10. Відбір трансформованих рослин, шляхом культивування на середовищі з селективним агентом.

### 3.1. Реактиви і розчини, використані у дослідженні

1. Розчини та реактиви для виділення плазмідної ДНК Zymo Research Miniprep Plasmid Extraction KIT: P1 Buffer (Red); P2 Buffer1 (Green); P3 Buffer2 (Yellow); Endo-Wash Buffer; Plasmid Wash Buffer; DNA Elution Buffer; Zymo-Spin™ IIN Columns; Collection Tubes; Milli-Q water.

2. Розчини та реактиви для конструювання векторів методом Golden Gate: рестриктази Bbs I та Bsa I («Thermo Scientific™», США); T4-лігаза («Thermo Scientific™», США); T4-буфер («Thermo Scientific™», США); розчин альбуміну бичачої сироватки (BSA) (10 мг/мл); плазмідні ДНК із синтезованими кодуючими послідовностями генів (100 нг/мкл); плазмідні ДНК, що містять модульні елементи системи (регуляторні елементи, вектори) (100 нг/мкл) [Юшбік! **Источник ссылки не найден.**]; H<sub>2</sub>O (до загального об'єму 20 мкл).

3. Розчини та реактиви для живильних середовищ:

- Середовище LB: пептон (10 г/л), дріжджовий екстракт (5 г/л), NaCl (10 г/л), агар (15 г/л), рН = 7,0, H<sub>2</sub>O (до загального об'єму 1 л); антибіотики: Kanamycin (100 мг/мл), Ampicillin (100 мг/мл), Rifampicin (50 мг/мл), Gentamycin (40 мг/мл);
- Середовище MS для вирощування рослин арабідопсису: макросолі MS (25 мл/л), мікросолі MS (1 мл/л), хелат заліза (5 мл/л), CaCl<sub>2</sub> 20% (3,3 мл), піридоксин (1 мг/л), тіамін (1 мг/л), сахароза (20 г/л), агар (0,7%);

Селективне середовище МС для рослин арабідопсису: макросолі МС (25 мл/л), мікросолі МС (1 мл/л), хелат заліза (5 мл/л),  $\text{CaCl}_2$  20% (3,3 мл), піридоксин (1 мг/л), тіамін (1 мг/л), сахароза (20 г/л), агар (0,7%), фосфіностріцину (8 мг/л);

- Склад макросолей МС (готують в 20-кратній концентрації):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (33 г/л);  $\text{KNO}_3$  (38 г/л);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7,4 г/л);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,4 г/л);

- Склад мікросолей (готують в 1000-кратній концентрації):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (620 мг/л);  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2230 мг/л);  $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,5 мг/л);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2,5 мг/л);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (860 мг/л);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (25 мг/л); KI (83 мг/л);

- Склад хелата заліза: EDTA (747 мг/л),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (557 мг/л).

4. Розчини та реактиви для ПЦР: 1x Taq-буфер (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; («SibEnzim», Новосибірськ, Росія), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 мкмоль dNTPs («SibEnzim», Новосибірськ, Росія), 0,5 мкмоль кожного праймера («Eurofins Genomics», Німеччина), 5од/мкл Taq ДНК – полімераза («SibEnzim», Новосибірськ, Росія), 100 нг/мкл ДНК,  $\text{H}_2\text{O}$  (до загального об'єму 20 мкл).

5. Розчини та реактиви для рестрикційного аналізу: FastDigest буфер (ThermoFisher™), ферменти рестрикції BamHI, EcoRI; PvuII, (ThermoFisher™),  $\text{H}_2\text{O}$  (до загального об'єму 20мкл);

6. Розчини та реактиви для агарозного гел-електрофорезу: 5x TBE буфер: 54 г Tris Base, 27,5 г  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9,3 г  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (до загального об'єму 0,5 л). Агаризований гель: 1% агароза («Sigma», Німеччина) в буфері 1x TBE. Етидій бромід (Carlroth, Польща) (10 мг/мл), 10 мкл на 100 мл гелю.

7. Розчини та реактиви для трансформації *Escherichia coli*:  $\text{CaCl}_2$  (0,1mM),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mM) + 15% гліцерол, рідке живильне середовище LB.

8. Розчини та реактиви для трансформації *A. tumefaciens*: деіонізована вода (mQ  $\text{H}_2\text{O}$ ), 10% гліцерол, розведений у mQ  $\text{H}_2\text{O}$ , рідке живильне середовище LB, 40% глюкоза,  $\text{MgSO}_4$  (250мг/мл).

9. Розчини та реактиви для трансформації рослин: 10mM  $\text{MgSO}_4$ .

### 3.2. Протоколи проведення досліджень

#### А. Приготування компетентних клітин та трансформація методом heat-shock *E. Coli*

У дослідженні було використано *E.coli* штам штаму DH10b (Top10).

1. Підготували нічну культуру для приготування хімічно компетентних клітин: до 5 мл рідкого середовища LB додали 100 мкл розмороженого бактеріального стоку та Streptomycin 100 mg/L. Інкубували на термо-шейкері при 37 °C.
2. Додали 1 мл нічної культури до 50 мл свіжого середовища LB, нарощували в термо-шейкері при 37 °C до оптичної щільності OD600 = 0,4-0,6.
3. Помістили бактеріальну суспензію в фалькон 50 мл, відцентрифугували при температурі 4 °C 3,5 тис об/хв протягом 10 хвилин.
4. Злили супернатант та ресуспендували осад у 20 мл охолодженого до 4 °C 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, залишили на льоду на 1 год (проц повторили 2 рази).
5. Центрифугували за тих самих умов. Злили супернатант та ресуспендували осад в 1 мл охолодженого до 4 °C CaCl<sub>2</sub> + 15% гліцерол, розлили у пробірки по 70 мкл.
6. Готові компетентні клітини використовували одразу або зберігали при -80 °C.

Трансформацію було проведено за допомогою методу heat shock:

1. Компетентні клітини розморозили на льоду.
2. Додали 1-5 мкл (100-250 нг) плазмідної ДНК.
3. Інкубували на льоду на 30 хв.
4. Для створення теплового шоку інкубували пробірки з клітинами на твердотільному термостаті 42 °C 90 секунд.
5. Залишили на льоду протягом 2 хв.



6. Додали 1 мл попередньо підігрітого рідкого живильного середовища LB.

7. Інкубували термо-шейкері при 37 °C протягом 1 год.

8. Осадили клітини при 3 тис об/хв протягом 3 хв, злили супернатант.

Клітинний осад висіяли в чашки Петрі на тверде живильне середовище LB

з селективним антибіотиком та культивували 12-16 год при 37 °C [8].

## **В. Приготування компетентних клітин та трансформація**

### **A. *Tumefaciens***

У дослідженні було використано *A. tumefaciens* штам DV.

1. Підготували нічну культуру для приготування

електрокомпетентних компетентних клітин: до 5 мл рідкого середовища LB додали 100мкл розмороженого бактеріального стоку.

Інкубували на термо-шейкері при 28 °C 48 год.

2. Додали 1 мл нічної культури до 50 мл свіжого середовища LB,

нарощували в термо-шейкері при 37 °C до оптичної щільності OD600 = 0,4-0,6.

3. Помістили бактеріальну суспензію в фалькон 50 мл,

відцентрифугували при температурі 4 °C 3,5тис об/хв протягом 10 хвилин.

4. Злили супернатант та ресуспендували осад у 50 мл охолодженої до 4 °C mQ H<sub>2</sub>O.

5. Повторно провели центрифугування та ресуспендування у 20 мл охолодженої mQ H<sub>2</sub>O.

6. Центрифугували за тих самих умов, осад ресуспендували у 400 мкл 10% гліцерол, розведеному у mQ H<sub>2</sub>O. Розлили у пробірки по 40 мкл.

7. Готові компетентні клітини використовували одразу або зберігали при -80 °C.

Трансформацію було проведено за допомогою методу електропорації:

1. Для кожної плазмиди для трансформації підготували 5 мл рідкого середовища, що містить 40% глюкози та 250мг/мл магній сульфату.
2. Компетентні клітини розморозили на льоду.
3. Додали 200 нг ДНК, перенесли вміст пробірки в кювету для електропорації.
4. Помістили кювету в електропоратор і провели струм.
5. Перенесли клітини з кювети до пробірки із середовищем та нарощували протягом 2 год в термо-шейкері при 28°C.
6. Клітини осадили при 3 тис об/хв протягом 3 хв, злили супернатант.
7. Висіяли осад клітин в чашки Петрі на тверде живильне середовище LB з селективним антибіотиком та культивували чашки 48 год при 28 °C.

### **C. Виділення плазмідної ДНК Product Contents ZR Plasmid**

#### **Miniprep™:**

1. 5 мл бактеріальної суспензії осадили при 12 тис об/хв протягом 1 хв.  
Злили супернатант
2. До бактеріального осаду додали 200 мкл P1 Buffer (Red), ресуспендували за допомогою вортексу.
3. Додали 200 мкл P2 Buffer (Green). Обережно перемішали вміст пробірки шляхом перевертання.
4. Додали 400 мкл P3 Buffer (Yellow). Ретельно перемішали шляхом перевертання. Залишили при кімнатній темпеатурі на 2 хв.
5. Центрифугували зразки 8 тис об/хв 2 хв.
6. Розмістили Zymo-Spin™ IIN column в Collection Tube. Перенесли супернатант з кроку 5 в колонку Zymo-Spin™ IIN column.
7. Центрифугували зразки при 12 тис об/хв 30 сек.
8. Злили вміст Collection Tube. Помістили Zymo-Spin™ IIN column в Collection Tube. Додали 200 мкл Endo-Wash Buffer. Повторили крок 7.
9. Додали 400 мкл Plasmid Wash Buffer. Центрифугували 2 хв.

10. Перенесли колонку Zymo-Spin™ IIN в чисту пробірку. Додали 30 мкл DNA Elution Buffer. Інкубували 2 хв. Повторили крок 7.

#### D. Аналіз генетичних конструкцій методом ПЛР

Полімеразну Ланцюгову Реакцію (ПЛР) проводили для підтвердження наявності послідовностей генів *gox*, *cr4* в генетичних векторах окремих колоніях *E. coli* та *A. tumefaciens* після трансформації.

Реакційну суміш замішували на 20 мкл: 2 мкл 10X Taq-буферу, 2 мкл dNTP, 2 мкл Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, по 0,5 мкл праймерів, 0,5 мкл Taq полімерази, та 10,5 мкл dH<sub>2</sub>O.

Для визначення наявності гену *gox* відібрали наступні праймери: F: ATGGCTGAGAACCACAAGAA; R: TTAGGATGCSAGGACCAGTCTT. Розмір продукту ампліфікації фрагменту гена *gox* має дорівнювати 1296 п.н.

ПЛР аналіз для виявлення гена *gox* проводили за такою схемою:

I – первинна денатурація (94 °C 5 хв)

II – 36 повторів

а) денатурація (94 °C 30 сек)

б) відпал праймерів (52 °C 30 сек)

в) елонгація (72 °C 1хв 20 сек)

III – кінцева елонгація (72 °C 5хв)

Розмір продуктів ампліфікації для гена *cr4* дорівнював 358 п.н.; для цього використовували такі праймери: F: ATG CTT CAC GGT GCA AGC; R: GCG TCA CCA ATG AAA GTG C.

ПЛР аналіз для виявлення гена *cr4* проводили за такою схемою:

I – первинна денатурація (94 °C 5 хв)

II – 36 повторів

а) денатурація (94 °C 30 секунд)

б) відпал праймерів (55 °C 30 секунд)

в) елонгація (72 °C 30 сек)

III – кінцева елонгація (72 °C 5 хв)

Розмір продуктів ампліфікації для гена *zmpscs* дорівнював 1338 п.н.; для цього використовували такі праймери: F: ATGGCCGCGCCCAAGGAGAT; R: TTAATTCTTGACGAAAGTGCTCACC.

ПЛР аналіз для виявлення гена *gox* проводили за такою схемою:

I – первинна денатурація (94 °C 5 хв)

II – 30 повторів

а) денатурація (94 °C 30 сек)

б) відпал праймерів (58 °C 30 сек)

в) елонгація (72 °C 1 хв 30 сек)

III – кінцева елонгація (72 °C 5 хв)

Розмір продуктів ампліфікації для гена *bar* дорівнював 238 п.н.; для цього використовували такі праймери: F: AATCTC GGT GAC CGG CAG GA; R:

TAC ACC SAC CTG CTG AAG T.

ПЛР аналіз для виявлення гена *bar* проводили за такою схемою:

I – первинна денатурація (94 °C 5 хв)

II – 30 повторів

а) денатурація (94 °C 30 сек)

б) відпал праймерів (58 °C 30 сек)

в) елонгація (72 °C 30 сек)

III – кінцева елонгація (72 °C 5 хв)

## Е. Рестрикційний аналіз плазмідних ДНК

Для рестрикційного аналізу використовували рестриктази FastDigest™: BamHI, EcoRI, PvuII, EcoRV (ThermoFisher™). Реакційна суміш замішувалась на 15 мкл, з використанням 2-5 нг ДНК матриці за протоколом виробника.

## Ф. Гель-електрофорез

Для розділення продуктів полімеразної ланцюгової реакції та рестрикційного аналізу було проведено горизонтальний гель-електрофорез в 1% агарозному гелі, для візуалізації використовувався етидйї бромід, як

флуоресцентний інтеркалюючий барвник. Для визначення розмірів фрагментів використовували маркер молекулярних мас M11 DNA Ladder та M25 DNA Ladder («SibEnzim», Новосибірськ, Росія). Параметри джерела напруги електрофорезу встановлювали на рівні 100 V. Електрофорез проводили протягом 25 хвилин. Візуалізація продуктів відбувається за допомогою УФ трансільюмінатора.

### **G. Агробактеріально-опосередкована трансформація *Arabidopsis thaliana* за методом занурення квіток**

1. Підготували бактеріальну суспензію штаму *A.tumefaciens*, трансформованого плазмідними конструкціями шляхом культивування у 5 мл живильного середовища LB з додаванням селективного антибіотика при 28 °C 48 год.
2. Додали 5 мл нічної культури до 500 мл свіжого середовища LB, нарощували в термо-шейкері при 28 °C 16-24 год до оптичної щільності OD600 = 1,5-2.
3. Центрифугували бактеріальну суспензію 10 хвилин за кімнатної температури при 4 тис об/хв. Злили супернатант.
4. Ресуспендували осад в 500 мл свіжоприготованого 5% розчину сахарози за допомогою перемішувача.
5. Занурювали рослини наземні частини рослин *Arabidopsis thaliana* у бактеріальну суспензію. Обережно перемішували.
6. Накривали оброблені рослини плівкою.
7. Через 24 год знімали плівку з рослин. Зберігали ізоляцію рослин, трансформованих різними конструкціями.
8. Дочекались дозрівання плодів. Зібрали насіння. Проводили селекцію для визначення трансформованих рослин [48].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

#### 4.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

НУБІП України

##### 4.1. Створення конструкцій методом Golden Gate клонування

Визначення та підборі генетичних послідовностей, які надають стійкість до гербіциду гліфосат було першим етапом здійснення дослідження.

Наступним етапом нашої роботи було створення проміжних векторів (модулів) першого рівня, кожен з яких містить окрему транскрипційну одиницю.

Для цього був використаний метод клонування ДНК Golden Gate. Реакція клонування проводиться в присутності рестрикційного ферменту та ДНК лігази

з застосуванням плазмід, що несуть кодуєчу послідовність, регуляторні елементи та вектора призначення.

НУБІП України

Усі елементи клонували в вектор для збірки, що містить ген *lacZ*, який кодує фермент  $\beta$ -галактозидазу, що розщеплює дисахарид лактозу на глюкозу та галактозу, для біло-блакитного скринінгу бактерій (Рис 4.1). [27].

Клонування проводили за такою схемою: Реакційна суміш включала 100 нг кожної плазмідної ДНК, 1,5 мкл буфера T4 ДНК лігази, 0,5 мкл T4 ДНК лігази, 0,2 мкл рестриктази Bsa I, 0,15 мкл BSA. Реакційну суміш замішували на 15 мкл та інкубували 3 години при 37 °С. Для інактивації ферментів суміш інкубували 5 хв при 50 °С та 5хв при 80 °С.



Рис 4.1. Біло-блакитна селекція колоній *Escherichia coli*,

у результаті проведення даного етапу дослідження було озроблено 5 проміжних векторів (модулів) першого рівня – *plAgoCP4*, *plGox*, *plBar*, *plZmEPSPS*, *plBnEPSPS*, кожен з яких містив окрему транскрипційну одиницю (Рис. 4.2) Гени *cp4*, *gox*, *zmepps*, *bnepps* забезпечують трансформованим рослинам стійкість до гербіцидів гліфосатної групи, ген *bar* нами було використано у якості селективного маркера, який дозволить проводити відбір трансформованих рослин [37].

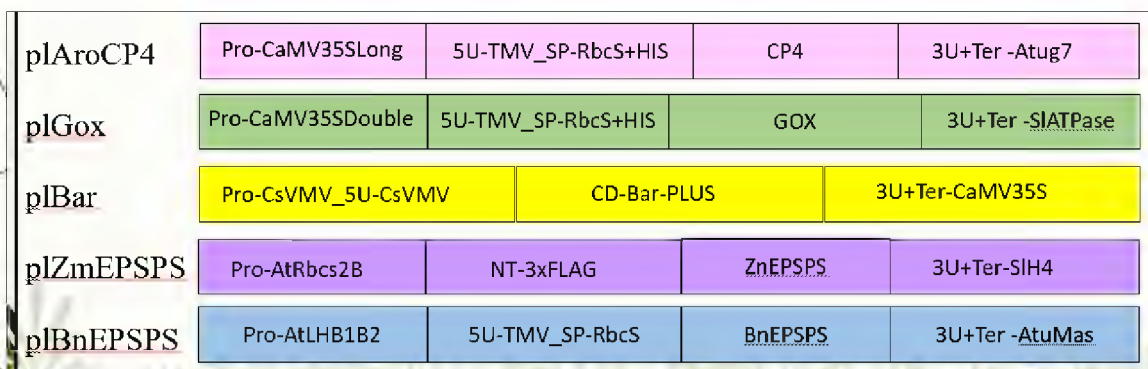


Рис. 4.2. Схематичне зображення будови проміжних модулів

Кожен вектор містить наступні елементи:

1. pICP4 – 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*); 5'- послідовність  $\Omega$ , що не транлюється (untranslated region, UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (*Tobacco Mosaic Virus*); ген, що кодує хлоропласний транзитний пептид RuBisCo; послідовність полігестидинового хвоста [21]; *cp4epsps* ген; термінатор Atug7 разом з сигналом поліаденюлювання та 3' - UTR, виділений з *A. tumefaciens*.
2. pIGox – подвійний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*) [15]; 5'- послідовність  $\Omega$ , що не транлюється (untranslated region, UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (*Tobacco Mosaic Virus*); ген, що кодує хлоропласний транзитний пептид RuBisCo; послідовність полігестидинового хвоста [21]; ген *gox*; термінатор гену *ATPase* разом з сигналом поліаденюлювання та 3' - UTR, виділений з *S. lycopersicum*.
3. pIBar – 35S промотор вірусу мозаїки жилок маніока (*Cassava Vein Mosaic Virus*) разом із 5'-послідовністю, що не транлюється; ген *bar* фосфінотрицин ацетил трансферази бактерії *Streptomyces viridochromogenes* з інтроном гена ACT2 *A. thaliana* [42], термінатор гену *35s* з сигналом поліаденілування та 3' – UTR, виділений з вірусу цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*) з
4. pIZmEPSPS – промотор гену *RbcS2B*, що кодує малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксилази (RuBisCo), виділений з *Arabidopsis thaliana* [15]; N-кінцева поліпептидка білкова мітка FLAG; ген *zmepsps*;



термінатор гістона H4 разом з сигналом поліаденюлювання та 3' - UTR, віділений з *Solanum tuberosum*.

5. pBnEPSPS - промотор гену *LHB1B1*, що кодує хлорофіл a-b зв'язуючі білки, також віділений з *A. thaliana* [31]; 5'- послідовність  $\Omega$ , що не транлюється (untranslated region, UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (*Tobacco Mosaic Virus*); ген, що кодує хлоропласний транзитний пептид RuBisCo[21]; термінатор гену *mas* разом з сигналом поліаденюлювання та 3' - UTR, віділений з *A. Tumefaciens*

Слідуючим етапом проведення дослідження була трансформація компетентних клітин *Escherichia coli* штаму DH10b (Top10) продуктами клонування з попереднього етапу. У роботі використовували біло-блакитний скринінг для відбору колоній із ймовірно правильно сконструйованими векторами [26], колонії відбирали за додавання 100 mg/L ampicillin та 100 mg/L streptomycin. Відібрані колонії після скринінгу шарошували, виділяли плазмідну ДНК за допомогою Product Contents ZR Plasmid Miniprep™, проводили рестрикційний аналіз. Продукти рестрикції розділяли в агарозному гелі. Комп'ютерне моделювання in silico проводили в програмі SerialCloner.

Для перевірки вектора pLagoCP4 використовували рестриктазу Pvu II (очікуваний розмір фрагментів – 4721, 2419, 270, 186 bp). Для перевірки вектора pLZmEPSPS та pLBar використовували суміш рестриктаз Pvu II та EcoR I. Для pLZmEPSPS очікуваний розмір фрагментів – 5650, 1038, 295 bp. Для pLBar очікуваний розмір фрагментів – 4628, 806, 622 bp. Рестикцію pLGoх проводили рестриктазою PvuII, pBnEPSPS – сумішшю PvuII+BamHI. Очікуваний розмір фрагментів відповідно: 6560, 629, 12 та 5833, 931, 252, 22 (Рис. 4.3).

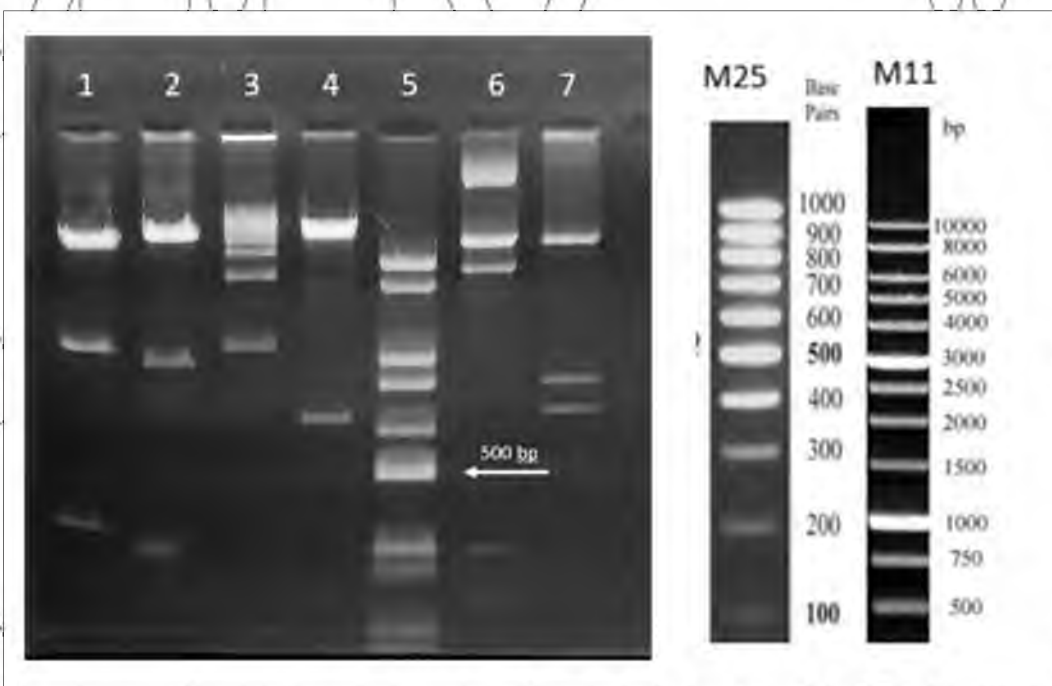


Рис. 4.3. Електрофореграма продуктів рестрикції проміжних векторів з окремими транскрипційними одиницями:

1) pIZmEPSPS 3 колонія; 2) pIBnEPSPS 1 колонія; 3) маркер M11 4) pIGox 1 колонія 5) маркер M25; 6) pICp4 1 колонія 7) pIBar 1

#### 4.2. Отримання та перевірка кінцевих векторів конструкцій

На другому етапі виконання дослідження, із застосуванням результатів попереднього кроку, було створено два генетичні конструкції для ріпаку *Brassica napus L.* - BnCP4min та BnCP4max (Рис 4.3.).

Після проведення перевірки, виділені плазмиди були використані для збірки конструкцій другого рівня за аналогічним до першого етапу методом клонування. Проте, рестриктаза Bsa I була замінена на рестриктазу BpiI, а в якості ДНК модулів використовувались виділені за допомогою Zymo Research Miniprep Plasmid Extraction KIT плазмідні вектори першого рівня. Продукти клонування трансформували в компетентні клітини *E.coli*. Колонії відбирали на середовищі LB при додаванні 100 mg/L Kanamycin. З суспензії клітин виділяли плазмідну ДНК з використанням Product Contents ZR Plasmid Miniprep™.

Перевіренними плазмідами трансформували компетентні клітини *A. Tumefaciens* штаму GV.

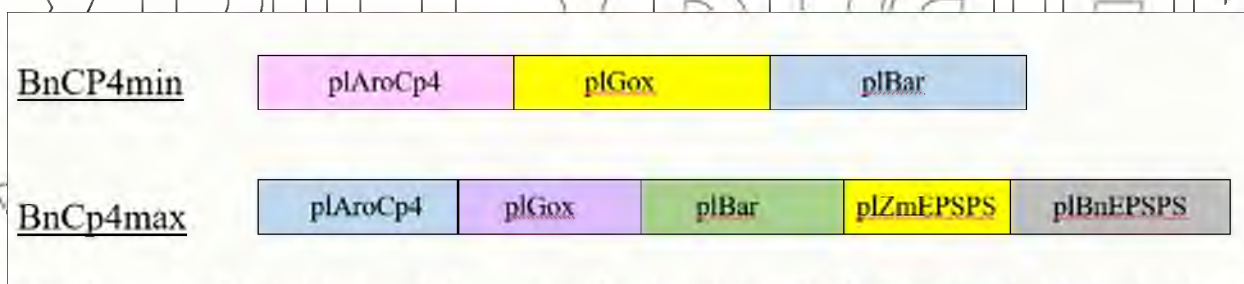


Рис. 4.4. Схематичне зображення будови кінцевих модулів конструкції

Конструкція BnCP4min містить ген гліфосат оксидоредуктази (*gox*), ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат-синтази, виділений з бактерії *Agrobacterium* штаму CP4 (*cp4epsps*) та селективний ген (*bar*).

Експресійний вектор BnCr4max містить ген гліфосат оксидоредуктази (*gox*), ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат-синтази, виділений з бактерії *Agrobacterium* штаму CP4 (*cp4epsps*), ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат-синтази, виділений з кукурудзи (*zmeepsps*), ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат-синтази, виділений з ріпаку (*bneepsps*) та селективний ген (*bar*).

Для перевірки кінцевих генетичних конструкцій використовували рестрикційний аналіз. Рестрикцію обох конструкцій проводили рестриктазою EcoR I. Для BnCP4min очікуваний розмір фрагментів має бути 5221; 3228; 2490; 806; 359 bp. Для BnCr4max розмір фрагментів складає 6969; 3228; 2490; 2336; 938; 806; 395 п.н. (Рис. 4.5).

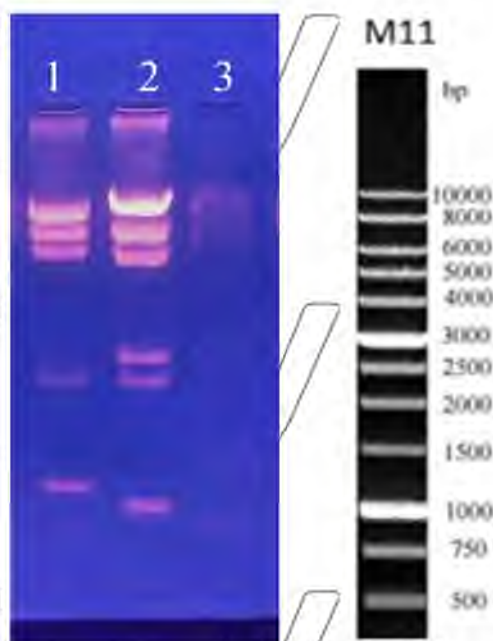


Рис. 4.5. Електрофореграма продуктів рестрикції генетичних конструкцій:

1) BnCP4min; 2) BnCP4max; 3) маркер M11

Для проведення ПЛР аналізу було застосовано пари граймерів для виявлення генів *cp4epsps* та *gox*. У якості матриці використовували плазмідні ДНК що мали позитивний результат при проведенні рестрикційного аналізу та колонії *E.Coli* з підтвердженим вмістом гену *cp4epsps*. У результаті проведення перевірки конструкцій шляхом ПЛР аналізу із застосуванням праймерів підібраних для гена *cp4epsps* розмір продуктів ампліфікації становив 368 п.н., що відповідає довжині продукту отриманого в ході комп'ютерного моделювання (Рис. 4.6).



Рис 4.6. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу гена *cp4epsps*:

1) негативний контроль; 2) позитивний контроль – плазміда; 3) позитивний контроль – колонія; 4-8) BnCP4max колонії 1-5 відповідно; 9) BnCP4min 1,5 колонія; 11) маркер; 12-19) BnCP4min колонії 6-13 відповідно

У результаті перевірки конструкцій при ПЛР аналізі з використанням праймерів підібраних для гена *gox* були наспрацьований фрагмент 1269 п.н., що відповідає довжині продукту отриманого в ході комп'ютерного моделювання (Рис. 4.7).



Рис 4.7. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу гена *gox*:

3) маркер; 2) негативний контроль; 3) позитивний контроль – плазміда; 4) позитивний контроль – колонія; 5-6) BnCP4max 1-3 колонії; 7) BnCP4min 13 колонія

#### 4.4. Трансформація штаму *A. tumefaciens* GV створеними конструкціями

У результаті проведення трансформації *A. tumefaciens* штаму GV методом електропорації було отримано більше 10 колоній з конструкціями BnCP4min та BnCP4max (Рис. 4.8). Колонії, які мали позитивний результат відбору на селективному середовищі (Rifampicin 50 mg/L, Gentamycin 25 mg/L, Kanamycin 100 mg/L), були використані в якості матиці для проведення ПЛР аналізу для перевірки наявності цільових генів.

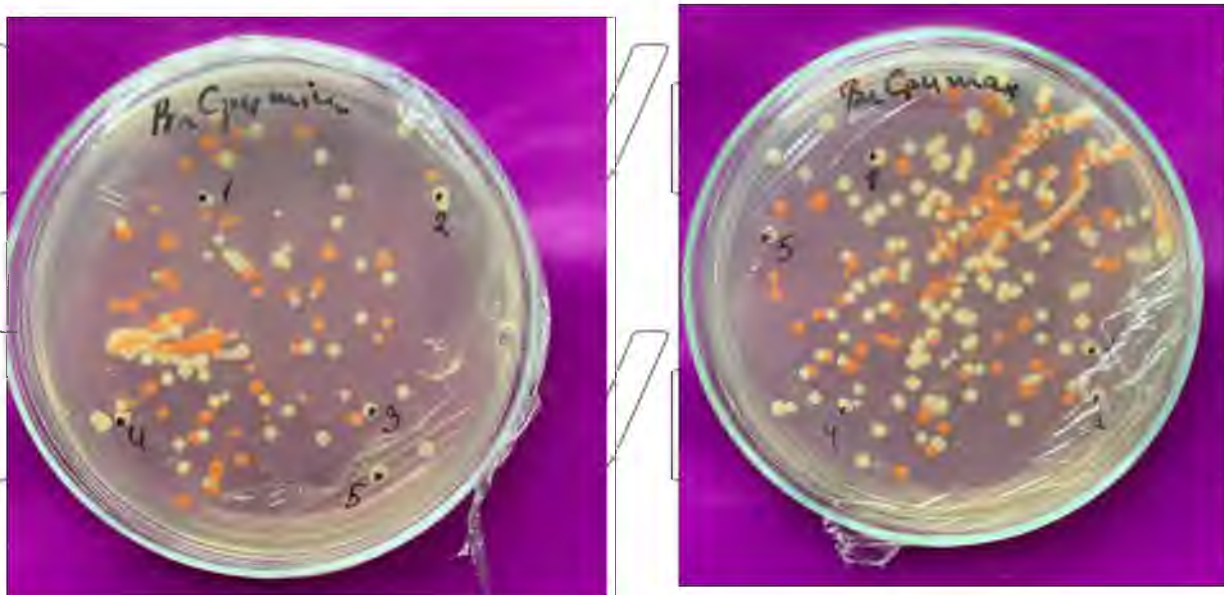


Рис. 4.8. Колонії *A. tumefaciens*, трансформованих конструкціями BnCP4min та BnCP4max відповідно

Для проведення перевірки ефективності трансформації та підтвердження наявності експресійних векторів провели ПЛР аналіз. Для аналізу обрали по 5 колоній з кожної конструкції. Для перевірки застосували праймери для гену *cp4*, *zmpsp5*.

У результаті ПЛР аналізу 1-5 колоній BnCP4min та 1-5 колоній BnCP4max для гену *cp4* фрагмент, що відповідає очікуваній довжині продукту 368 п.н., напрацьований на усіх колоніях, що перевірялись (Рис 4.9).

У результаті ПЛР аналізу 1-5 колоній VnCP4min та 1-5 колоній VnCP4max для гену *zterpsps*, фрагмент, що відповідає очікуваній довжині продукту 1296 п.н., напрацьований на 1, 2 та 4 колонії VnCP4min та на всіх колоніях VnCP4max (Рис. 4.10).



Рис 4.9. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу гену *cp4*:

1) маркер; 2) негативний контроль; 3) позитивний контроль; 4-8) VnCP4min 1-5 колонія відповідно; 9-13) VnCP4max 1-5 колонія відповідно



Рис 4.10. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу гену *zterpsps*:

1) негативний контроль; 3) позитивний контроль; 4-6) VnCP4min 1-4 колонія відповідно; 7) маркер; 8) VnCP4min 5 колонія; 9-13) VnCP4max 1-5 колонія відповідно

Для проведення подальших досліджень, на основі проведених аналізів та позитивних результатів, обрали 1 та 2 колонії VnCP4min та 2 і 3 колонії

VnCP4max. Для додаткової перевірки було проведено ПЛР аналіз на відібраних колоніях на наявність гену *bar* (Рис. 4.11).

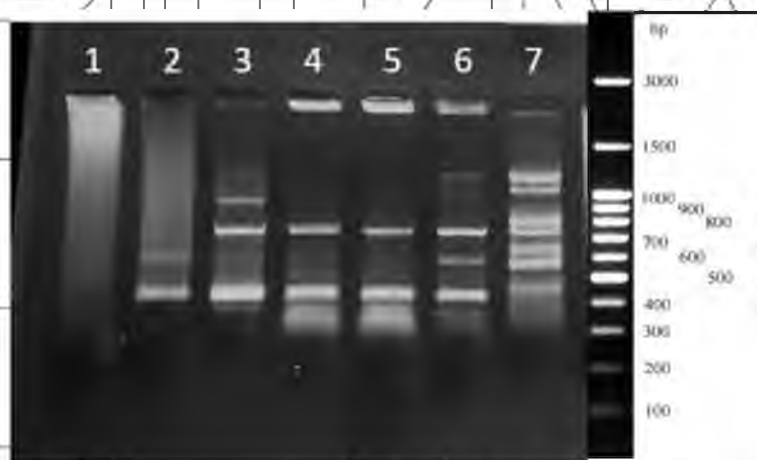


Рис 4.11. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу гену *bar*:

1) негативний контроль; 2) позитивний контроль; 3-4) VnCP4min 1 та 2 колонія відповідно; 5-6) VnCP4max 2 та 3 колонія відповідно; 7) маркер

У результаті ПЛР аналізу, фрагмент, що відповідає очкуваній довжині продукту 268 п.н., напрацьований на усіх колоніях, що перевірялись.

#### 4.5. Експресія створених генетичних конструкцій

Останнім етапом дослідження була перевірка функціональності створених конструкцій за допомогою агробактеріальної трансформації *Arabidopsis thaliana* L. Для перевірки нами було використано 2 лінії рослин - Columbia (Col) and Landsberg (Ler). Селекція трансформованих рослин базується на присутності в обох конструкціях гену *bar* - гену стійкості до фосфінотрицину.

Через 2 тижні після агробактеріальної трансформації, зібрали насіння з дослідних рослин. Загалом, розчином бактеріальної суспензії було оброблено 5 рослин *A. thaliana* L. Col та 5 рослин *A. thaliana* L. Ler.

Насіння стерилізували розчином 70% спирту – 1 хв, стерилізуючому розчині (Білизна) 10хв та промивали стерильної дистильованою водою 5 хвилин (3 повторності). Стерильне насіння висівали на живильне середовище ½ МС з



додаванням 5 мг\л гербіциду фосфінотріцин. Культивували насіння 7 днів за температури 24-26°C без доступу світла. Через 7 днів після посіву перенесли до світлової культуральної кімнати та культивували 14 днів (Рис. 4.12).

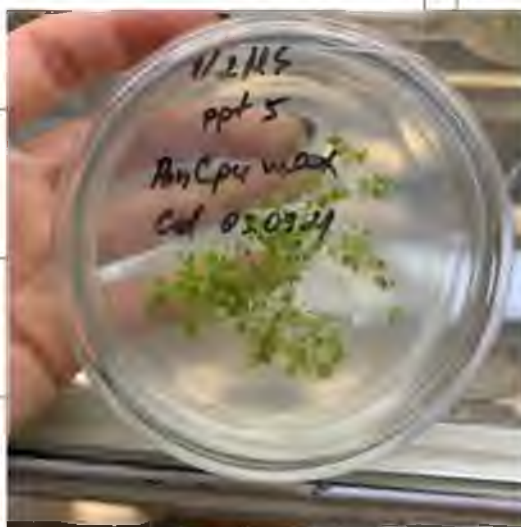


Рис 4.12. Проростки *A. thaliana* L. Col на селективному середовищі з гербіцидом фосфінотріцин

На 15 день культивування, після появи справжніх листків, проростки *A. thaliana* провели пересадку на свіже живильне середовище з підвищеним вмістом селективного агенту 8 мг\л.

Після пересадки трансформанти культивували в умовах світлової культуральної кімнати 1 місяць до загибелі нетрансформованих рослин (Рис. 4.13).





Рис 4.13 . Трансформовані рослини *A. thaliana* L.

Наявність рослин, які не загинули при застосуванні селективного агенту фосфінотріцин при культивуванні дає можливість припустити функціональність отриманих векторів. При цьому, експеримент можна продовжити для перевірки шляхом висадки в ґрунт та стійкістю до гліфасату. Крім того аналіз експресії генів необхідно перевірити на рівні ДНК, РНК та білків, що також потребує подальших експериментів.

1. Ріпак *Brassica napus L.* є однією з найбільш вирощуваних культур у світі. Створення трансгенного ріпаку з ознаками стійкості до гліфосату дасть можливість значно ширше вирощувати та застосовувати дану культуру. Крім того, наявність стійкості до гербіцидів гліфосатної групи позитивно впливатиме на навколишнє середовище: зменшиться об'єм використання пестицидів та їх негативний вплив на оточення.
2. Досліджено вплив гербіциду гліфосат на рослинний фермент 5-енолпірувільшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) та гени, що надають стійкості до його впливу: *gox*, *cp4epsps*, *zmeepsps*, *bnepsps*.
3. Створено генетичну конструкцію VnCP4min, яка містить ген гліфосат оксидоредуктази (*gox*), ген 5-енолпірувільшикімат-3-фосфат-синтази, виділений з бактерії *Agrobacterium* штаму CP4 (*cp4epsps*) та селективний ген (*bar*).
4. Створено експресійний вектор VnCP4max містить ген гліфосат оксидоредуктази (*gox*), ген 5-енолпірувільшикімат-3-фосфат-синтази, виділений з бактерії *Agrobacterium* штаму CP4 (*cp4epsps*), ген 5-енолпірувільшикімат-3-фосфат-синтази, виділений з кукурудзи (*zmeepsps*), ген 5-енолпірувільшикімат-3-фосфат-синтази, виділений з ріпаку (*bnepsps*) та селективний ген (*bar*).
5. Наявність рослин *Arabidopsis thaliana L.*, які пройшли агробактеріальну трансформацію конструкціями VnCP4min та VnCP4max та не загинули при застосуванні селективного агента фосфінотріцин при культивуванні дає можливість припустити функціональність отриманих векторів.

#### 4. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Варченко О. І. Створення генетичних конструкцій за допомогою методу клонування Golden Gate / О. І. Варченко, Б. М. Красюк, О. О. Федчунов, О. В. Зіміна, М. Ф. Парій, Ю. В. Симоненко // Фактори експериментальної еволюції організмів. - 2019. - Т. 25. - С. 190-196.
2. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» // Відомості Верховної Ради України (ВВР), 2007, № 35
3. Постанова Кабінету Міністрів «Про затвердження розмірів тарифів на проведення експертизи, яка є підставою для державної реєстрації генетично модифікованих організмів сортів сільськогосподарських рослин у відкритій системі» 18 листопада 2009 р. № 1223
4. "Commission Directive 80/891/EEC of 25 July 1980 relating to the Community method of analysis for determining the erucic acid content in oils and fats intended to be used as such for human consumption and foodstuffs containing added oils or fats". Official Journal of the European Communities
5. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert T-M, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, and Marillonnet S. ACS Synthetic Biology. 2014 Feb 20. doi: 10.1021/sb4001504. PubMed PMID 24933124
6. AgMRC (2018). "Rapeseed". Agricultural Marketing Resource Center. Retrieved 20 March 2019.
7. Alahakoon, U., Adamson, J., Grenkow, L., Soroka, J., Bonham-Smith, P., & Gruber, M. (2016). Field growth traits and insect-host plant interactions of two transgenic canola (Brassicaceae) lines with elevated trichome numbers. The Canadian Entomologist, 148(05), 603–615
8. Angela Chang. PREPARATION OF CALCIUM COMPETENT ESCHERICHIA COLI AND HEAT-SHOCK TRANSFORMATION / Angela Chang, Vivian Chau // The Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology (UJEM). - 2017. - №1. - С. 22-25

9. Barry, G. I., Kishore, G. M., Padgett, S. R. & Stallings, W. C. (1997) U.S. Patent 5633435
10. Barry, Gerard Francis; KISHORE, Ganesh Murthy. Glyphosate tolerant plants. U.S. Patent No 5,776,760, 1998.
11. Bertazzini, Michele; Forlani, Giuseppe (16 March 2016). "Intraspecific Variability of Floral Nectar Volume and Composition in Rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*)". *Frontiers in Plant Science*.
12. Callihan, B., Brennan, J., Miller, T., Brown, J. and Moore, M. 2000. Mustards in Mustards: Guide to Identification of Canola, Mustard, Rapeseed and Related Weeds. University of Idaho.
13. Codex Alimentarius (2009) Foods derived from modern biotechnology, 2nd edn. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations
14. Czar MJ, Anderson JC, Bader JS, Peccoud J (2009) Gene synthesis demystified. *Trends Biotechnol* 27: 63–72
15. Dedonder, A., Rethy, R., Fredericq, H., Van Montagu, M., and Krebbers, E. (1993) Arabidopsis rbcS genes are differentially regulated by light. *Plant Physiol.* 101, 801–808
16. Dedonder, A., Rethy, R., Fredericq, H., Van Montagu, M., and Krebbers, E. (1993) Arabidopsis rbcS genes are differentially regulated by light. *Plant Physiol.* 101, 801–808
17. Delaney B, Astwood JD, Cunny H, Conn RE, Herouet-Guicheney C, MacIntosh S, Meyer LS, Privalle L, Gao Y, Mattsson J, Levine M (2008) Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food Chem Toxicol* 46:S71–S97
18. Demont, M., et al. GM crops in Europe: How much value and for whom? *EuroChoices* 6, 46–53 (20014)
19. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. 2008. Vol. 3. P. 3647

20. Forster AC, Church GM (2006) Towards synthesis of a minimal cell. *Mol Syst Biol* 2: 45

21. Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C., and Wilson, T. M. (1987)

The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 15, 3257-73

22. Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C., and Wilson, T. M. (1987)

The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 15, 3257-73

23. **Gulden, R. H., Warwick, S. I. and Thomas, A. G. 2008.** The biology of Canadian weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Can J Plant Sci* 88:951-996.

24. Harrison LA, Bailey MR, Naylor MW, Ream JE, Hammond BG, Nida DL,

Burnette BL, Nickson TE, Mitsky TA, Taylor ML, Fuchs RL, Padgett SR

(1996) The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain

CF4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr*

126(3):728-740

25. Heuzé, V.; Tran, G.; Sauvant, D.; Lessire, M.; Lebas, F. (31 January

2020). "Rapeseed meal". *Feedipedia*. Retrieved 18 April 2020

26. ISAAA. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017:

Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years.

ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.

27. Juers, D. H., Matthews, B. W. and Huber, R. E. (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase:

Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance *Protein Science*, 21(12), 1792-1807.

28. Lebrun, M., Freyssinet, M., Sailland, A., Rolland, A., Freyssinet, G. 1991.

*Molecular basis of resistance to shikimic herbicides in adapted maize cell*

*cultures. Genbank Accession X63874*

29. Linda J Kahl. *A survey of enabling technologies in synthetic biology / Linda J*

*Kahl, Drew Endy. // Journal of Biological Engineering. 2013. №7.*

30. Maxime R. Hervé. Breeding for insect resistance in oilseed rape: Challenges, current knowledge and perspectives / Maxime R. Hervé. // *Plant Breeding*. – 2017. – №137. – С. 27–34

31. McGrath, J., Terzaghi, W., Sridhar, P., Cashmore, A., and Pichersky, E. (1992) Sequence of the fourth and fifth Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant Mol. Biol.* 19, 725–33.;

32. Monsanto. "What is Roundup Ready canola?" (PDF). Retrieved 8 November 2013.

33. Parimala Chinnadurai. Variability of CP4 EPSPS expression in genetically engineered soybean (*Glycine max* L. Merrill) / Parimala Chinnadurai, Duška Stojšin, Kang Liu. // *Transgenic Research*. – 2018. – №27. – С. 511–524)

34. Paul McCrory MBBS. Consensus Statement on Concussion in Sport—The 4th International Conference on Concussion in Sport Held in Zurich, November 2012 / Paul McCrory MBBS, Willem H. Meuwisse MD, 2013.

35. Pollegioni L, Schonbrunn E, Siehl D (August 2011). "Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering". *The FEBS Journal*. 278 (16): 2753–66.

36. Potts, Derek A.; Rakow, Gerhard W.; Males, Daryl R. (1999). "Canola Quality *Brassica juncea*, A New Oilseed Crop for the Canadian Prairies". Global Council for Innovation in Rapeseed and Canola. Retrieved 18 April 2020

37. Rui L. Cloning of EPSPS gene and Bar gene and functional verification in *rapeseed*. 2015. Inner Mongolia University for Nationalities

38. Sahasrabudhe, M. R. (1977). "Cismer values and erucic acid contents of rapeseed oils". *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 54(8) 323–324. doi:10.1007/BF02672436. S2CID 84400266

39. Scott L. McClinchey. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*) / Scott L. McClinchey, Laima S. Kott. // *Euphytica*. – 2017. – №162. – С. 51–67

40. Smith, Marilyn (29 January 2004). "Ecological reservation in Belarus fosters new approaches to soil remediation". IAEA. Retrieved 20 October 2012.
41. Steinrücken HC, Amrhein. "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94 (4): 1207–12
42. Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6, 2519–2523
43. Weber E. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs [Weber E, Engler C, Gruetzner R. // *PLoS ONE* 2011. – №6
44. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet, S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* 2011. Vol. 6. P. 16765
45. Werner S., Engler C., Weber E., Gruetzner R., Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Biceng. Bugs*. 2012. Vol. 3. P. 38–43
46. Williams GM, Kroes R, Munro IC (April 2000). "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31 (2 Pt 1): 117–65.
47. Wimmer E, Mueller S, Tumpey TM, Taubenberger JK (2009) Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat Biotechnol* 27: 1163–1172
48. Zhang, X., Henriques, R., Lin, SS. et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1, 641–646 (2006)



НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

**ДОДАТКИ**

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Додаток А

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

НА



**ІНСТИТУТ ФІТОМЕДИЦИНИ, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ**

**ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН,  
БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ**

**КАФЕДРА ФІЗІОЛОГІЇ, БІОХІМІЇ РОСЛИН ТА  
БІОЕНЕРГЕТИКИ**



НА



НА

НА

**ІХ ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА ОНЛАЙН -  
КОНФЕРЕНЦІЯ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ  
ВЧЕНИХ**

НА

**«БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ»**

**20 - 21 травня 2021**

**м. Київ**

НУБІП України

**Шень К.В.<sup>1</sup>, Григчук К.В.<sup>1</sup>, Парій М.Ф.<sup>2</sup>, Сімшченко Ю.В.<sup>2,3</sup>**  
**БЕЗПЕЧНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНУ CP4 EPSPS ДЛЯ ОТРИМАННЯ**  
**БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЛІНІЙ РІПАКУ *BRASSICA NAPUS L.*, СТІЙКХ ДО ГЛІФОСАТУ**

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України

вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

<sup>2</sup>Всеукраїнський науковий інститут селекції,

вул. Васильківська, 30, м. Київ, 03022

<sup>3</sup>Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143

e-mail: [katvushal7shen@gmail.com](mailto:katvushal7shen@gmail.com)

Гліфосат - це гербіцид широкого спектру дії та осушувач рослин. Це фосфорорганічна сполука, зокрема фосфонат, який діє, пригнічуючи рослинний фермент 5-снолпірувильшікімат-3-фосфатсинтазу. Застосовується для знищення бур'янів, особливо однорічних широколистяних бур'янів та трав, які конкурують із культурами.

Дія гліфосату зумовлена тим, що він інгібує рослинний фермент 5-снолпірувильшікімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS). Фермент EPSPS каталізує перенесення снолпірувильної порції фосфоснолпірувату до 5-гідроксильної групи шикімат-3-фосфату з утворенням 5-снолпірувильшікімат-3-фосфату на передостанній стадії шикімат шляху. У рослинах, грибах та бактеріях Шикіматний шлях є критичним для біосинтезу ароматичних амінокислот, таких як тирозин, триптофан та фенілаланін. EPSPS є мішень для N-фосфонометил-гліцину (гліфосат). Гліфосат надає тимчасовий фосфоснолпіруват і утворює тупик комплекс з ферментом, зв'язаним з хлоропластом EPSPS, що призводить до повного гальмування шикіматного шляху. Тому, коли гліфосат потрапляє в рослину, він проникає в клітини, блокує синтез ряду амінокислоти, і рослина гине (Гнатюк І.С., та ін., 2020).

Компанія Monsanto запатентувала гліфосат як речовину-компонент гербіцидів проти бур'янів в 1970-х роках, а перший гербіцид «Roundup» (Раундап) отримав дозвіл у США у 1974 році і незабаром після цього в усіх європейських країнах. Сьогодні гліфосат залишається активним інгредієнтом у більшості таких несистемних гербіцидів як Roundup®, Tomado®, Uragan Forte®, «Тріумф», «Агрокілер» тощо, які використовуються для боротьби з однорічними та багаторічними бур'янами протягом вегетації. На сьогодні 85% вирощуваних в усьому світі ГМ-культур є стійкими до гербіцидів і майже половина (65 мли га) сільськогосподарських угідь США була засаджена у 2012 році культурами від Monsanto з стійкістю до гліфосату.

В Європейському Союзі на розгляді Європейської комісії знаходиться 14 заявок на затвердження ГМ-культур стійких до гербіцидів та зокрема до гліфосату які дозволені для комерційного виробництва. Це кукурудза, бавовна, соя і цукрові буряки. При цьому, неможливо не звернути увагу на те, що ріпак *Brassica napus L.* також входить до числа комерційно важливих культур, тому запитання створення ліній ріпаку, стійких до гліфосату є досить актуальним.

Стійкість до гліфосату отримується шляхом використання нечутливого до гліфосату *crp4* гену, виділеного з *Agrobacterium sp.* штаму CP4.

Безперечно, перш за все постає запитання безпечності використання даного гену для комерційних культур. Безпека харчових продуктів та кормів білків, що виробляються на посівах ГМ, оцінюється за допомогою дворівневого підходу, що обґрунтовує достовірність (Delaney, та ін. 2008; Codex Alimentarius 2009; Hammond та ін. 2013).

Перший рівень містить масу доказів, що підтверджують безпеку білка шляхом оцінки: історії безпечного використання, біоінформатичного аналізу, способу дії, засвоюваності *in vitro*, стійкості до тепла, рівня експресії та споживання їжі (Delaney B., та ін., 2008). На основі оцінки першого рівня не було виявлено небезпеки для CP4 EPSPS (Harrison L.A., та ін. 1996; Nair R.S., та ін. 2002). Ці дані першого рівня включали: (1) біоінформаційний аналіз, який не виявляє суттєвих структурних подібностей між CP4 EPSPS та білками, пов'язаними з



алергією або токсичністю, та (2) сприйнятливість CP4 EPSPS до швидкої деградації як пепсином, так і панкреатином, підтверджуючи висновок, що це білок навряд чи може бути алергічним або токсичним. і внаслідок потрапляння їжі або кормів із культур, що експресують цей білок, не відбудеться значущого впливу інтактного CP4 EPSPS (Harrison LA., та ін. 1996).



У кожному конкретному випадку підтверджувальний другий рівень тестування може бути використаний для подальшої оцінки потенціалу токсичності для ссавців за допомогою відповідної моделі на тваринах (наприклад, дослідження токсикології *in vivo*). Незважаючи на те, що при оцінці першого рівня не було виявлено жодної небезпеки, для подальшого забезпечення безпеки було проведено дослідження гострої токсичності на мишах із CP4 EPSPS. Жодних побічних ефектів не спостерігалось, коли миші отримували гостру дозу 572 мг / кг маси тіла перорально, що набагато перевищувало очікуваний вплив людини на продукти хачування, що потенційно містять CP4 EPSPS ( Chinnadurai P. та ін., 2018).

