

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

ГНАТЮК ІРИНА СЕРГІЇВНА

УДК 602.6:575.111:582.683.2

**ДИСЕРТАЦІЯ
ЗАСТОСУВАННЯ ПРИЙОМІВ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ ДЛЯ
ОТРИМАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН ТА РЕДАГУВАННЯ
ГЕНОМУ РІПАКУ ОЗИМОГО *BRASSICA NAPUS* L.**

Спеціальність 091 «Біологія»

Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ І. С. Гнатюк

Науковий керівник: Симоненко Юрій Вікторович
кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Гнатюк І. С. Застосування прийомів генетичної інженерії для отримання біотехнологічних рослин та редагування геному ріпаку озимого *Brassica napus* L. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2021.

Ріпак як харчова і технічна сільськогосподарська культура має міцні позиції на міжнародному ринку олії та жирів. Його насіння містить від 38% до 50% олії, 16–29% білка та цілий ряд інших важливих речовин. Ріпак – це цінний зелений корм, харчова олія і високобілкові корми, технічна олія, біодизель, мастильні матеріали, сировина для промисловості, фітосанітар ґрунту, кращий попередник зернових культур, економічно вигідна конкурентоспроможна ринкова культура. Передумовою збільшення виробництва насіння ріпаку є те, що із зростанням чисельності населення зростає і потреба у продуктах харчування, зокрема, оліях, які з медико-біологічних міркувань є набагато кориснішими і безпечнішими для людського організму, ніж жири тваринного походження. На сьогоднішній день більшість біотехнологічних досліджень були проведені на сортах ярого, а не озимого ріпаку, який являється основним культивованим видом. Беручи до уваги вищесказане, створення біотехнологічних рослин озимого ріпаку з новими ознаками залишається актуальною проблемою. Крім того, на сьогоднішній день у світі відсутні роботи по редагуванню геному озимого ріпаку української селекції з використанням системи CRISPR/Cas9.

Таким чином, метою дисертаційного дослідження було отримання біотехнологічних рослин комерційної лінії озимого ріпаку *B. napus* L. української селекції, а також створення платформи для редагування геному

озимого ріпаку з використанням системи CRISPR/Cas9 та прийомів генетичної інженерії.

У роботі використано такі методи досліджень: аналіз наукової літератури; лабораторні методи (культивування тканин рослин *in vitro*, *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, гістохімічний метод визначення активності гена β -глюкуронідази, метод молекулярного клонування Golden Gate); біоінформаційні (комп'ютерне моделювання *in silico* генетичних векторів), фізіологічні (вирощування та аналіз трансгенних рослин в умовах *in vivo*), статистичні (обробка отриманих результатів).

В роботі використовували насіння ріпаку озимого комерційної лінії *Bn1*, яка є батьківською формою при створенні гетерозисних гібридів української селекції.

Встановлено, що для регенерації пагонів із 3-добового калюсу, отриманого з гіпокотилів озимого ріпаку лінії *Bn1*, оптимальним є живильне середовище МС, доповнене 5 мг/л AgNO_3 , 3 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП) та 2 мг/л 2-ізопентиладеніну (2-іП). Частота регенерації озимого ріпаку лінії *Bn1* на цьому середовищі становила $48,45\% \pm 2,80\%$. В ході дослідження виявлено, що вкорінення рослин-регенерантів може відбуватися на безгормональному середовищі МС із половинним вмістом макро- та мікросолей, а умови яровизації забезпечили $83,93\% \pm 5,33\%$ бутонізацію та цвітіння рослин. За використання молекулярних маркерів типу ISSR соматоклональна варіабельність не спотрігала в культурі *in vitro* озимого ріпаку лінії *Bn1*.

При відпрацюванні методики генетичної трансформації озимого ріпаку, з'ясовано, що оптимальними умовами для генетичної трансформації експлантів озимого ріпаку є наступні: оптична щільність суспензії агробактерій $\text{OD}_{600} = 0,5$; тривалість інокуляції в суспензії *A. tumefaciens* –

10 хв. При цьому, частота трансформації за геном *gus*, який входить до складу Т-ДНК генетичної конструкції pCB203, становила $22,75\% \pm 2,28\%$. Також було показано, що додавання ацетосирингону в інокуляційне середовище є недоцільним, оскільки спричиняє некроз тканин та знижує частоту регенерації озимого ріпаку на 20%. На відміну від традиційної селекції, яка дозволяє отримати новий сорт ріпаку через 8–12 років, за допомогою оптимізованої нами методики регенерації та генетичної трансформації біотехнологічне насіння T_0 озимого ріпаку може бути отримане через один рік після початку експериментів.

В результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133 та pCB135, Т-ДНК яких містить ген CP4 *epsps*, котрий забезпечує стійкість рослин до гербіциду гліфосату, а також конструкцією pSPG2254, яка несе мутантний ген *Bn epsps*, було отримано трансгенні рослини озимого ріпаку. Встановлено, що в першому поколінні (T_1), отриманому в результаті самозапилення біотехнологічних рослин озимого ріпаку (T_0), спостерігається генетичне розщеплення 3:1 за ознакою стійкості до гербіциду гліфосату. Трансгенне насіння не відрізняється від інтактного за морфологічними ознаками. Наявність білка CP4 EPSPS в трансгенних рослинах ріпаку доведена за допомогою молекулярного аналізу експресії білків, використовуючи імуно-тест систему. Також показано, що мутантний ген *Bn epsps*, який входить до складу конструкції pSPG2254, забезпечує стійкість трансгенних рослин озимого ріпаку до гліфосату на такому ж рівні, як і ген CP4 *epsps* з *A. tumefaciens* CP4, що входить до складу конструкцій pCB133 та pCB135.

Було виявлено, що створена нами генетична конструкція pSPE2053, при стабільній трансформації нею рослин забезпечує накопичення бактеріальної ендонуклеази Cas9 в тканинах озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1*. В подальшому в такі рослини можуть бути перенесені

послідовності гідових РНК за використання стабільної або транзійної генетичної трансформації.

Також створено генетичну конструкцію pSPE2058, що містить: 1) ген бактеріальної ендонуклеази Cas9; 2) направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти; 3) селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*. Конструкцію надалі можна використовувати для редагування геному ріпаку.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у розробці платформи для редагування геному озимого ріпаку української селекції, а саме *уперше*:

- розроблено ефективну систему регенерації озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1* української селекції, яка дозволяє отримати насіння нульового покоління через рік після початку експериментів та при застосування якої не відбувається соматональна мінливість *in vitro*;
- оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* української селекції та створено біотехнологічні рослини, стійкі до гербіциду фосфінотрицину;
- створено трансгенні рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*, стійкі до гербіциду гліфосату, в результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133, pCB135 та pSPG2254;
- створено генетичний вектор pSPE2053, що несе ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9; за використання цього вектора отримано трансгенні лінії озимого ріпаку, які в подальшому будуть використовуватися в селекційних програмах для здійснення редагування геному;
- створено генетичну конструкцію pSPE2058, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9; направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти, а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*;

конструкція буде використана для створення високоолеїнових ліній озимого ріпаку української селекції.

Практичне значення отриманих результатів.

Біотехнологічні рослини ріпаку озимого лінії української селекції *Bn1*, стійкі до гербіциду гліфосату, можуть бути використані в подальших експериментальних дослідженнях та у селекційних програмах. Крім того, в якості платформи для редагування геному ріпаку, було створено генетичну конструкцію на основі системи CRISPR/Cas9, а також отримано біотехнологічні рослини, що несуть ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9.

Результати теоретичних та практичних досліджень:

- застосовуються в практичній діяльності ТОВ «БЕТА НК» при створенні біотехнологічних рослин ріпаку озимого із якісно новими ознаками (акт впровадження результатів науково-дослідної роботи подано у Додатку Б);
- можуть представляти інтерес для наукових та навчальних закладів, зокрема під час викладання біотехнології та генетики рослин.

Ключові слова: *Agrobacterium tumefaciens*, *Brassica napus* L., CRISPR/Cas9, *in vitro*, генетична трансформація, ріпак озимий, регенерація, редагування геному.

SUMMARY

I. S. Hnatiuk. Genetic engineering techniques application for biotechnological plants obtaining and genome editing of winter rape *Brassica napus* L. The qualified scientific work on manuscript copyright. The thesis for a Doctor of Philosophy Degree in Specialization 091 "Biology" (09 "Biology") – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

Rapeseed as a food and technical crop has a strong position in the international market of oils and fats. Its seeds contain from 38 to 50% of oil, 16–29% of protein and a number of other important substances. Rapeseed is a valuable green fodder; edible oil and high-protein feeds; technical oil, biodiesel, lubricants; raw materials for industry; soil orderly; the best precursor for cereals; economically profitable competitive market culture. A prerequisite for increasing the production of rapeseed is that as the population grows, so does the need for food, in particular oils, which are much more useful and safer for the human body than animal fats for medical and biological reasons. For today most studies have been conducted on spring cultivars of oilseed rape rather than winter, which is the main cultivated species. Considering the above, the creation of biotechnological plants of winter rape with new features remains an urgent problem. In addition, to date, there are no works in the world on the Ukrainian breeding winter rapeseed genome editing using the CRISPR/Cas9 system.

Thus, the aim of thesis research was to develop an effective genetic transformation method of Ukrainian breeding winter rapeseed and to create a genome editing platform in order to improve valuable economic characteristics.

The following research methods were used in work: analysis of scientific papers; laboratory methods (*in vitro* plant tissue culture, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, histochemical method for determining the β -glucuronidase activity, Golden Gate molecular cloning method); bioinformational (for *in silico* computer modeling of

genetic vectors), physiological (for *in vivo* growing and analyzing of transgenic plants), statistical (for processing the results).

Commercial *Bn1* line of winter rapeseed, which is the parent form in the Ukrainian breeding heterosis hybrids were used in the study.

It was found that for shoot regeneration from 3-days old calli obtained from hypocotyls of *Bn1* line Ukrainian breeding winter rape, the optimal nutrient medium is MS, supplemented with 5 mg/L AgNO₃, 3 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BAP) and 2 mg/L 2-isopenthyladenine (2-iP). The regeneration rate of *Bn1* line winter rapeseed was 48,45%±2,80% on this medium. The study revealed that the rooting of regenerated plants can occur on a hormon-free MS medium with half the content of macro- and microsalts, and the conditions of vernalization provided 83,93%±5,33% of budding and flowering. Somaclonal variability was not observed during *in vitro* culture of *Bn1* line winter rapeseed using the ISSR molecular markers.

When working out the winter oilseed rape genetic transformation method, it was found that the optimal conditions for genetic transformation of winter oilseed rape explants are the following: the optical density of the bacterial suspension at a wavelength of 600 nm OD₆₀₀ = 0.5; duration of inoculation with *A. tumefaciens* cells – 10 min. In this case, the transformation frequency for the *gus* gene, which is part of the T-DNA of the genetic construct pCB203, was 22,75%±2,28%. It has also been shown that the addition of acetosyringone to the inoculation medium is impractical as it causes tissue necrosis and reduces the regeneration rate of winter oilseed rape by 20%. In contrast to common breeding, which allows to obtain a new rapeseed cultivar in 8-12 years, T₀ biotechnological seeds of winter rape may be obtained in one year after beginning of experiments using our optimized regeneration and genetic transformation methods.

As a result of rapeseed genetic transformation with pCB133 and pCB135 constructs, whose T-DNA contains the CP4 *epsps* gene, which provides plant resistance to the glyphosate herbicide, and the pSPG2254 construct, which carries the mutant *Bn epsps* gene, transgenic winter oilseed rape plants were obtained. It was

found that in the first generation (T_1), obtained after self-pollination of biotechnological plants of winter rape (T_0), a 3:1 genetic disjoining occurs on the basis of glyphosate resistance. Transgenic seeds do not morphologically differ from intact. The presence of CP4 EPSPS protein in transgenic rapeseed plants was proven by molecular analysis of protein expression using an immunoassay system. Also, it was shown that the mutant *Bn epsps* gene, which is part of the pSPG2254 construct, provides glyphosate resistance of transgenic winter rapeseed plants at the same level as the CP4 *epsps* gene from *A. tumefaciens* strain CP4, which is part of the pCB133 and pCB135 constructs.

It was found that created genetic construct pSPE2053, provides the accumulation of bacterial endonuclease Cas9 in the tissues of winter rape *B. napus* L. line *BnI* after plant transformation. Subsequently, guide RNA sequences can be transferred to such plants using stable or transient genetic transformation.

In addition, we created a genetic construct pSPE2058, which carries: 1) the bacterial endonuclease Cas9 synthesis gene; 2) Aa1 and Aa2 guide sequences for rapeseed genome editing in order to accumulate oleic acid; 3) selective phosphinothricin-N-acetyltransferase *bar* gene; the construct can be used to edit the rapeseed genome.

The scientific novelty of the obtained results consist in the development of genome editing platform of Ukrainian breeding winter rapeseed, namely for the first time:

- an effective regeneration system of *B. napus* L., which allows to obtain T_0 seeds in one year after the beginning of experiments and does not lead to the of somaclonal variability *in vitro*, was developed;

- the *BnI* line Ukrainian breeding winter rape *Agrobacterium*-mediated genetic transformation conditions were optimized and phosphinothricin resistant biotechnological plants were created;

- glyphosate resistant transgenic plants of *Bn1* line winter rapeseed were created as a result of genetic transformation by constructions pCB133, pCB135 and pSPG2254;

- a genetic vector pSPE2053, which carries the bacterial endonuclease Cas9 gene was created; transgenic lines of winter oilseed rape were obtained using this vector, these lines will be used in breeding programs for genome editing;

- a genetic construct pSPE2058, carrying the bacterial endonuclease Cas9 gene, Aa1 and Aa2 guide sequences for rapeseed genome editing in order to accumulate oleic acid, and the selective phosphinothricin-N-acetyltransferase *bar* gene was created; the construct will be used to create high oleic Ukrainian breeding winter rape lines.

The practical significance of the results.

Biotechnological plants of Ukrainian breeding *Bn1* line winter rapeseed, resistant to the glyphosate, may be used in further experimental studies and breeding programs. In addition, a genetic construct based on CRISPR/Cas9 system was created and biotechnological plants carrying the bacterial endonuclease synthesis Cas9 gene were obtained as a platform for the rapeseed genome editing.

The results of theoretical and practical research:

- are applied in practical activity of Ltd "BETA NK" during creation of winter rape biotechnological plants with qualitatively new traits (the research results implementation act is presented in Appendix B);

- may be of interest to research and educational institutions, in particular during the teaching of biotechnology and plant genetics.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Brassica napus* L., CRISPR/Cas9, *in vitro*, genetic transformation, winter rapeseed, regeneration, gene editing.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Гнатюк І. С., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко, Ю. В. Підбір селективних концентрацій гліфосату для ефективного відбору *in vitro* трансгенних тканин озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 197–201. doi:10.7124/FEEO.v25.1164.

Особистий внесок: здійснила літературний пошук, поставила експеримент з підбору селективних концентрацій гліфосату та статистично обробила отримані результати, оформила статтю.

2. Hnatyuk I. S., Varchenko O. I., Kuchuk M. V., Parii M. F., Symonenko Yu. V. Development of an effective *in vitro* regeneration system for Ukrainian breeding winter rape *Brassica napus* L. *Cytology and Genetics*. 2020. Vol. 54, No. 4. P. 341–346. doi:10.3103/S0095452720040039.

Особистий внесок: збрала літературні дані, спланувала та поставила експерименти з регенерації та яровизації озимого ріпаку, оформила статтю.

3. Hnatiuk I. S., Varchenko O. I., Bannikova M. O., Kuchuk M. V., Parii M. F., Symonenko Yu. V. Development of an effective technique for *in vitro* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of winter rape *Brassica napus* L. *AgroLife Scientific Journal*. 2020. Vol. 9, No. 1. P. 149–155.

Особистий внесок: збрала літературні дані, здійснила генетичну трансформацію озимого ріпаку української селекції при заданих умовах, провела аналіз трансгенних рослин-регенерантів, оформила статтю.

4. Гнатюк І. С., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. Створення генетичного вектору для редагування геному рослин, що несе ген синтезу бактеріального білка Cas9. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 176–182. doi:10.7124/FEEO.v26.1263.

Особистий внесок: методом молекулярного клонування Golden Gate створила вектор для трансформації агробактеріальних клітин pSPE2053, здійснила гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази, оформила статтю.

5. Hnatyuk I. S., Varchenko O. I., Kuchuk M. V., Parii M. F., Symonenko Yu. V. Creation of winter rapeseed *Brassica napus* L. commercial line of biotechnological plants, resistant to the glyphosate action. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36, No. 6. P. 423–432. doi:10.7124/bc.000A40.

Особистий внесок: поставила експерименти з генетичної трансформації озимого ріпаку, здійснила аналіз рослин за допомогою методів ПЛР та ІФА, статистично обробила результати, оформила статтю.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Гнатюк І. С., Варченко О. І., Парій Я. Ф., Кучук М. В., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Селекційно-генетична наука і освіта*: матеріали VII міжнародної наукової конференції, Парієві читання (м. Умань, 19-21 березня 2018). Умань: Видавець "Сочінський М.М.", 2018. С. 51.

Особистий внесок: спланувала та поставила експеримент, оформила тези.

7. Гнатюк І. С., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. Ефективна методика регенерації *in vitro* ріпаку озимого *Brassica napus* L. *Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин*: Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю Національної академії аграрних наук України та 110-річчю заснування Інституту рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААН (м. Харків, 4-5 липня 2018). Харків, 2018. С. 216–217.

Особистий внесок: поставила експеримент, оформила тези.

8. Шатоха Д. Г., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В., Гнатюк І. С. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L. лінії вітчизняної селекції. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (м. Київ, 20 травня 2020). Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во "Політехніка", 2020. С. 95.

Особистий внесок: спланувала експеримент, оформила висновки, редагувала тези.

9. Гнатюк І. С., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. Створення генетичної конструкції для редагування жирнокислотного складу ріпаку. *Біотехнологія: звершення та надії*: збірник тез IX Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції (м. Київ, 20-21 травня 2021). Київ, 2021. С. 85–86.

Особистий внесок: методом молекулярного клонування Golden Gate створила генетичну конструкцію для редагування жирнокислотного складу ріпаку, здійснила молекулярно-генетичний аналіз, написала тези.

10. Шатоха Д. Г., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В., Гнатюк І. С. Генетичний аналіз рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L., отриманих після редагування геному вектором, що несе ген синтезу ендонуклеази Cas9. *Селекційно-генетична наука і освіта*: матеріали X міжнародної наукової конференції, Парієві читання (м. Умань, 19 березня 2021). Умань, 2021. С. 249–252.

Особистий внесок: спланувала експеримент, оформила висновки, редагувала тези.

11. Гнатюк І. С., Шатоха Д. Г., Дзуг М. С., Варченко О. І., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин ріпаку озимого *B. napus* L., стійких до гербіциду гліфосату. *Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень*: матеріали науково-практичної

конференції (м. Полтава, 27-28 серпня 2021). Херсон: Видавництво "Молодий вчений", 2021. С. 16–20.

Особистий внесок: спланувала експеримент, виділила РНК та здійснила молекулярно-біологічний аналіз з використанням продуктів реакції 3T, оформила тези.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1.....	29
ОЗИМИЙ РІПАК <i>B. napus</i> L. ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	29
1.1. Біологічна характеристика виду та сучасний стан вирощування ріпаку озимого <i>B. napus</i> L.....	29
1.2. Особливості регенерації та генетичної трансформації <i>in vitro</i> ріпаку озимого <i>B. napus</i> L.....	34
1.2.1. Фактори, що впливають на морфогенез та генетичну трансформацію ріпаку <i>in vitro</i>	36
1.2.2. Напрямки генетичної інженерії у селекції ріпаку.....	42
1.3. Система редагування геному CRISPR/Cas9 як перспективний інструмент покращення характеристик ріпаку озимого <i>B. napus</i> L.....	46
Висновки до розділу 1.....	50
РОЗДІЛ 2	51
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	51
2.1. Рослинний матеріал та введення в культуру <i>in vitro</i>	51
2.2. Індукція калюсогенезу та регенерація пагонів ріпаку.....	52
2.3. Адаптація рослин-регенерантів ріпаку до умов <i>in vivo</i> та яровизація...53	
2.4. Бактеріальні штами та конструкції.....	53
2.5. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку	56
2.6. Транз'єнтна <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація рослин махорки <i>N. rustica</i> L.....	58
2.7. Молекулярно-генетичний аналіз рослин.....	58
2.8. Гістохімічний аналіз активності β-глюкуронідази.....	62

2.9. Аналіз експресії гена CP4 <i>epsps</i> в трансгенних рослинах ріпаку.....	62
2.10. Генетичний аналіз.....	62
2.11. Фізіологічний тест.....	63
2.12. Створення генетичних конструкцій.....	64
2.13. Статистичний аналіз результатів.....	68
Висновки до розділу 2.....	69
РОЗДІЛ 3.....	70
РОЗРОБКА ЕФЕКТИВНОЇ СИСТЕМИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ <i>IN VITRO</i> ОЗИМОГО РІПАКУ <i>B. NAPUS</i> L. ЛІНІЇ <i>Bn1</i>	70
3.1. Підбір умов регенерації <i>in vitro</i> озимого ріпаку лінії <i>Bn1</i>	70
3.2. Адаптація рослин-регенерантів ріпаку лінії <i>Bn1</i> до умов <i>in vivo</i> та отримання насіння T ₀	74
3.3. Визначення соматоклональної варіабельності в культурі <i>in vitro</i> озимого ріпаку лінії <i>Bn1</i>	76
3.4. Підбір умов генетичної трансформації озимого ріпаку лінії <i>Bn1</i> української селекції.....	79
Висновки до розділу 3.....	88
РОЗДІЛ 4	89
AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ <i>IN VITRO</i> ОЗИМОГО РІПАКУ <i>B. NAPUS</i> L. ЛІНІЇ <i>Bn1</i>	89
4.1. Створення трансгенних рослин озимого ріпаку, стійких до гербіциду гліфосату.....	89
4.2. Аналіз біотехнологічних рослин ріпаку озимого покоління T ₁	95
Висновки до розділу 4.....	100
РОЗДІЛ 5.....	101
РОЗРОБКА ПЛАТФОРМИ ДЛЯ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ ОЗИМОГО РІПАКУ <i>B. NAPUS</i> L.....	101
5.1. Створення генетичної конструкції, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9	101

5.2. Створення вектора, спрямованого на редагування жирнокислотного складу ріпаку <i>B. napus</i> L.....	106
5.3. Отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку, що несуть ген бактеріальної ендонуклеази Cas9 як платформа для редагування геному <i>B. napus</i> L.....	112
Висновки до розділу 5.....	116
ВИСНОВКИ.....	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120
Додаток А.....	139
Додаток Б.....	140
Додаток В.....	141

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота

2-іП – 2-ізопентиладенін

Amp – ампіцилін

AtWIND1 – раневий транскрипційний фактор, який індукує дедиференціацію *A. thaliana*

B5 – живильне середовище за Гамборгом [1]

BSA – альбумін бичачої сироватки

CaMV – вірус мозаїки цвітної капусти

crRNA – CRISPR-РНК

Ct – цефтріаксон

CRISPR – короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами, clustered regulatory interspaced short palindromic repeats

dNTPs – дезоксирибонуклеозидтрифосфати

EPSPS – еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтетаза

FAOSTAT – Корпоративна статистична база даних продовольчої та сільськогосподарської організації, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

Gm – гентаміцин

HDR – гомологічна репарація

ISSR – інвертовані повтори (inter simple sequence repeat)

Km – канаміцин

LB – живильне середовище, lysogeny broth [2]

NGG – консенсусна послідовність (N – будь-який нуклеотид, G – гуанін)

NHEJ – негомологічне з'єднання кінців

P – промотор

PAM – суміжний протоспейсерний мотив

PPT – фосфінотрицин

Rf – рифампіцин

RR – стійкий до Раундап[®], Roundup Ready

sgRNA – гідова або направляюча РНК

T – термінатор

TRV – вірус погримковості тютюну

USDA – Міністерство сільського господарства США, United States Department of Agriculture

Ω – 5'-послідовність, що не трансліюється (5'-UTR)

arl – ген ARGOS-LIKE *A. thaliana*

bar – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *Streptomyces hygroscopicus*

barnase – ген чоловічої стерильності *Bacillus amyloliquefaciens*

barstar – ген відновлення фертильності *B. amyloliquefaciens*

BcFLA1 – ген, що відіграє роль в архітектурі коренів *B. carinata*

BnACS6 – синтаза 1-аміно-циклопропан-1-карбонової кислоти *B. napus*

BnaEOD3 – ген, що кодує елемент цитохрому P450/CYP78A6 *B. napus*

BnALC, *BnIND* – гени, залучені у розвиток стулок стручків *B. napus*

BnCLV – ген, що сприяє ініціації органоутворення *B. napus*

BnFAD2 – ген десатурази жирних кислот 2 *B. napus*

BnFAE1 – ген елонгази жирних кислот 1 *B. napus*

BnHSP22 – ген білка теплового шоку 22 *B. napus*

BnKCS – ген β-кетואцил-КоА-синтетази *B. napus*

BnLACS4 – ген довгого ланцюга ацил-коензим А синтази 4 *B. napus*

BnLEC1 – ген сім'ядольних листків 1 *B. napus*

BnIncRNA – ген довгої некодуючої РНК *B. napus*

BnMKS1 – ген субстрату 1 мітоген-активованої протеїнкінази 4 *B. napus*

BnPLD – ген фосфоліпази D *B. napus*

BnWRKY – ген, залучений у стійкості до патогенів *B. napus*

BolC.GA4a – ген, що кодує останній фермент біосинтезу біоактивних гіберелінів *B. oleracea*

BoMS1 – ген, асоційований з чоловічою стерильністю *B. oleracea*

BoPDS – ген фітоєн десатурази *B. oleracea*

BoSRK – ген S-рецептора кінрази *B. oleracea*

Bra003491, *Bra007665*, *Bra014410* – гени пектин метилестерази *B. campestris*

BraFLC2, *BraFLC3* – гени, залучені в регуляції цвітіння *B. rapa*

CP4 *epsps* – ген еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтетази *A. tumefaciens* CP4

Bn epsps – ген еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтетази *B. napus*

cry1Ab – ген пестицидного кристалічного білка *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*

desC – ген $\Delta 9$ -десатурази жирних кислот *Anabaena variabilis*

dhfr – ген дигідрофолатредуктази людини

gfp – ген зеленого флуоресцентного білка *Aequorea victoria*

gox – ген гліфосат оксидоредуктази *Ochrobactrum anthropi*

gus – ген β -глюкуронідази *A. thaliana*

uidA – ген β -глюкуронідази *E. coli*

hpt – ген гігроміцинофосфотрансферази *E. coli*

inf- $\alpha 2b$ – ген інтерферону $\alpha 2b$ людини

licBM3 – ген термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum*

luc – ген люциферази *Pyrophorus mellifluus*

neo – ген, що кодує синтез неоміцину *Klebsiella pneumoniae*

nptII – ген неоміцинофосфотрансферази II *E. coli*

ocs – ген октопінсинтази *A. tumefaciens* Ach5

pat – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *S. viridochromogenes*

pgNa – ген, що кодує синтез напіну *B. napus*

psl – ген лектину *Pisum sativum*

АБК – абсцизова кислота

БА – 6-бензиладенін

БАП – 6-бензиламінопурин

ГК₃ – гіберелова кислота

Зеа – зеатин

ІМК – індол-3-масляна кислота

Кін – кінетин

МС – живильне середовище Мурасіге-Скуга [3]

НОК – α -нафтилоцтова кислота

нт – нуклеотид

ПЕГ – поліетиленгліколь

пн – пари нуклеотидів

по – пари основ

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Ріпак, як харчова і технічна сільськогосподарська культура, має міцні позиції на міжнародному ринку олії та жирів. Озимий ріпак *B. napus* L. серед родини капустяних займає перше місце за вмістом олії, якої в його насінні міститься 48–52%, а також 16–29% білка, 6–7% клітковини, 17% вуглеводів. Олію ріпаку споживають у чистому вигляді; вона є найкращою сировиною для виробництва різноманітних харчових продуктів та промислової переробки. За даними звіту USDA лідерами з виробництва ріпаку у 2019 році стали: ЄС – 22 млн т, Канада – 21,1 млн т та Китай – 12,85 млн т. Україна в цьому списку займає 7 місце із показником 2,2 млн т. Озимий ріпак має високий рівень рентабельності, його вирощування є економічно вигідним, а обсяги виробництва в Україні щороку зростають. Зі збільшенням попиту на насіння ріпаку, а також продукти його переробки, пропорційно росте необхідність отримання нових сортів рослин цього виду, – високопродуктивних, стійких до біотичних та абіотичних умов середовища, із якісно новими і корисними ознаками.

Одним із найефективніших методів підвищення врожайності, стійкості проти абіотичних і біотичних факторів середовища та енергоекономічності сільськогосподарських культур, у тому числі й ріпаку, є генетично-селекційне поліпшення сортів. За допомогою поєднання генетичної інженерії та традиційної селекції у світі було створено багато сортів та гібридів важливих сільськогосподарських культур з рядом господарсько-цінних ознак, таких як стійкість до гербіцидів, шкідників, посухи тощо. Так, наприклад, компанією Monsanto було створено Roundup Ready (RR)-ріпак, що містить ген гліфосат-оксидази (*gox*), яка руйнує діючу речовину гербіциду Roundup. Не зважаючи на те, що в Україні вже були створені трансгенні рослини ярого ріпаку з генами стійкості до гліфосату [4–6], на сьогоднішній день залишається актуальним питання

розробки підходів до генетичної модифікації комерційних ліній саме озимого ріпаку.

На сьогоднішній день в арсеналі вчених з'явилося кілька нових інструментів, які дозволяють вирішувати задачі високоточного редагування геному рослин, тварин і людини. Один із них – це система CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9, яка з'явилась відносно недавно і вже зарекомендувала себе як ефективний та надійний інструмент генної інженерії [7]. Таким чином, завдяки системі CRISPR/Cas9 можна цілеспрямовано викликати мутації у певних ділянках геному. Цей підхід є доволі цікавим, оскільки дозволяє спрямовано здійснити точкову мутацію у гені, який кодує певний ензим, із яким взаємодіють молекули гліфосату, імазомоксу чи іншого гербіциду, тим самим змінивши просторову конформацію білку та заблокувавши його взаємодію з хімічним агентом. Важливим моментом при роботі з системою CRISPR/Cas9 являється ретельний підбір сайтів для специфічного внесення дволанцюгового розриву. Необхідність попереднього біоінформаційного аналізу пояснюється можливістю нецільових ефектів – внесення неспецифічних дволанцюгових розривів у геном в незапланованому місці. При виборі потрібних сайтів слід уникати ділянок повторюваних послідовностей, а також ділянок, що мають високу гомологію з іншими районами геному.

Враховуючи вищесказане, створення біотехнологічних рослин комерційних ліній озимого ріпаку *B. napus* L. української селекції залишається актуальним завданням. Крім того, на сьогоднішній день в Україні відсутні роботи по редагуванню геному ріпаку з використанням системи CRISPR/Cas9.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконувалась з 2017 по 2021 роки у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної

інженерії НАН України під керівництвом кандидата біологічних наук Ю. В. Симоненка в рамках бюджетних тем: «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (0115U000025, 2015–2019) та «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (0120U100849, 2020–2024).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження було отримання біотехнологічних рослин комерційної лінії озимого ріпаку *B. napus* L. української селекції, а також створення платформи для редагування геному озимого ріпаку з використанням системи CRISPR/Cas9 та прийомів генетичної інженерії.

Для досягнення мети було поставлено та вирішено наступні завдання:

1) розробити ефективну методику регенерації та яровизації озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1* української селекції, при застосуванні якої не відбувається соматоклональна мінливість;

2) оптимізувати методику генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* з використанням репортерного гена *gus* та селективного гена *bar*;

3) створити трансгенні рослини озимого ріпаку, стійкі до дії гербіциду гліфосату, підтвердити їх трансгенну природу та провести генетичний аналіз їх нащадків;

4) створити генетичну конструкцію з геном бактеріальної ендонуклеази Cas9 та підтвердити її активність на модельному об'єкті *N. rustica* L.;

5) створити генетичну конструкцію на основі системи CRISPR/Cas9 для редагування жирно-кислотного складу насіння ріпаку;

6) отримати трансгенні рослини озимого ріпаку, що несуть ген Cas9 та підтвердити експресію бактеріальної ендонуклеази Cas9 в тканинах біотехнологічних рослин ріпаку.

Об'єкт дослідження: озимий ріпак *B. napus* L., система редагування геному на основі CRISPR/Cas9. **Предмет дослідження:** *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку, редагування геному озимого ріпаку за допомогою системи CRISPR/Cas9.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань в роботі були використані теоретичні та експериментальні методи. Серед *теоретичних* методів був використаний метод аналізу наукової літератури для узагальнення даних та визначення актуальних напрямків дослідження. Серед *експериментальних* методів були використані наступні: метод культури тканин рослин *in vitro* – для отримання асептичної культури озимого ріпаку лінії *Bn1*; *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація – для отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку та транз'єнтної трансформації махорки *N. rustica* L.; молекулярно-генетичні методи – для виявлення соматоклональної мінливості та трансгенів на рівні ДНК і РНК; імуноферментний аналіз – для підтвердження експресії трансгена на рівні білка; гістохімічний метод визначення активності гена β -глюкуронідази; мікробіологічні методи вирощування бактеріальних культур; метод молекулярного клонування Golden Gate – для створення генетичних конструкцій; біоінформаційні – для комп'ютерного моделювання *in silico* генетичних векторів; фізіологічні – для аналізу трансгенних рослин в умовах *in vivo*. Для обробки отриманих результатів були використані методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у розробці платформи для редагування геному озимого ріпаку української селекції, а саме *уперше*:

- розроблено ефективну систему регенерації озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1* української селекції, яка дозволяє отримати насіння нульового покоління через рік після початку експериментів та не призводить до появи соматоклональної мінливості в культурі *in vitro*;

- оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* української селекції та створено трансгенні лінії на основі цього сорту, стійкі до гербіциду фосфінотрицину;
- створено трансгенні рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*, стійкі до гербіциду гліфосату, в результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133, pCB135 та pSPG2254;
- створено генетичний вектор pSPE2053, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9; за використання цього вектора отримано трансгенні лінії озимого ріпаку, які в подальшому будуть використовуватися в селекційних програмах для здійснення редагування геному;
- створено генетичну конструкцію pSPE2058, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти, а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*; конструкція буде використана для створення високоолеїнових ліній озимого ріпаку української селекції.

Практичне значення отриманих результатів.

Біотехнологічні рослини ріпаку озимого лінії української селекції *Bn1*, стійкі до гербіциду гліфосату, можуть бути використані в подальших експериментальних дослідженнях та у селекційних програмах. Крім того, в якості платформи для редагування геному ріпаку, було створено генетичну конструкцію на основі системи CRISPR/Cas9, а також отримано біотехнологічні рослини, що несуть ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9.

Результати теоретичних та практичних досліджень:

- застосовуються в практичній діяльності ТОВ "БЕТА НК" при створенні біотехнологічних рослин ріпаку озимого із якісно новими

ознаками (акт впровадження результатів науково-дослідної роботи подано у Додатку Б);

- можуть представляти інтерес для наукових та навчальних закладів, зокрема під час викладання біотехнології та генетики рослин.

Особистий внесок здобувача. Аналіз наукової літератури, інформаційний пошук за темою дослідження, планування та проведення експериментальної роботи, обробка отриманих даних, формулювання висновків, написання наукових публікацій та розділів дисертації проведено особисто здобувачем. Формування мети, наукових завдань дослідження, обговорення висновків дисертації проводилось спільно з науковим керівником – кандидатом біологічних наук Юрієм Вікторовичем Симоненком. У роботах, які написані у співавторстві, здобувачу належить (Додаток В): у роботах [1–7, 9, 11] – здійснила літературний пошук за темою та оформила публікацію; у роботах [1–3, 5–8, 10–11] – спланувала експеримент; у роботі [1] – підбрала селективні концентрації гліфосату, поставила дослід; у роботах [2, 7] – підбирала умови регенерації *in vitro* озимого ріпаку української селекції, умови адаптації і яровизації рослин-регенерантів, здійснила статистичну обробку отриманих результатів; у роботах [3, 5, 6, 11] – за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації створила біотехнологічні рослини озимого ріпаку, здійснила перевірку молекулярно-генетичними, біохімічними, імуноферментним та фізіологічним методами; у роботах [4, 9] – методом молекулярного клонування створила генетичні конструкції та перевірила їх; у роботах [8, 10] – редагувала тези, оформила висновки.

Апробація матеріалів дисертації. Окремі положення дисертаційної роботи доповідались на засіданнях Вченої ради Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, а також були представлені на 9 наукових конференціях різних рівнів та опубліковані у матеріалах конференцій, серед яких: Селекційно-генетична наука і освіта: VII

міжнародна наукова конференція, Парієві читання, (Умань, 2018), Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 100-річчю Національної академії аграрних наук України та 110-річчю заснування Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН (Харків, 2018), Селекційно-генетична наука і освіта: VIII Міжнародна наукова конференція, Парієві читання (Умань, 2019), "Біотехнологія XXI століття": XIV Всеукраїнська науково-практична конференція (Київ, 2020), The International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture" (Bucharest, 2020), Біотехнологія: звершення та надії: IX Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція (Київ, 2021), Селекційно-генетична наука і освіта: X Міжнародна наукова конференція, Парієві читання (Умань, 2021), Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень (Полтава, 2021).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження викладено в 11 наукових працях: 5 статей (в т.ч. три статті, які індексуються у наукометричних базах даних "Scopus" та "Web of science"), серед яких: одна стаття у періодичному науковому виданні іншої держави, яка входить до країн Європейського Союзу, чотири статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 6 тез у матеріалах міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з переліку умовних позначень і скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох експериментальних розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 143 сторінках машинописного тексту, враховуючи 37 рисунків і 6 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 151 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОЗИМИЙ РІПАК *B. NAPUS* L. ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1. Біологічна характеристика виду та сучасний стан вирощування ріпаку озимого *B. napus* L.

Ріпак *B. napus* L. – одно- або дворічна рослина заввишки 30–120 см з родини Капустяних (*Brassicaceae*) [8]. Ріпак виник внаслідок природної гібридизації між ріпою *B. rapa* (AA, $2n = 2x = 20$) та капустою городньою *B. oleracea* (CC, $2n = 2x = 18$) з утворенням алотетраплоїдного геному (AACC, $2n = 4x = 38$) (рис. 1.1). Почав широко культивуватися в Європі з XIV по XVIII століття для виробництва лампової олії та мила [9].

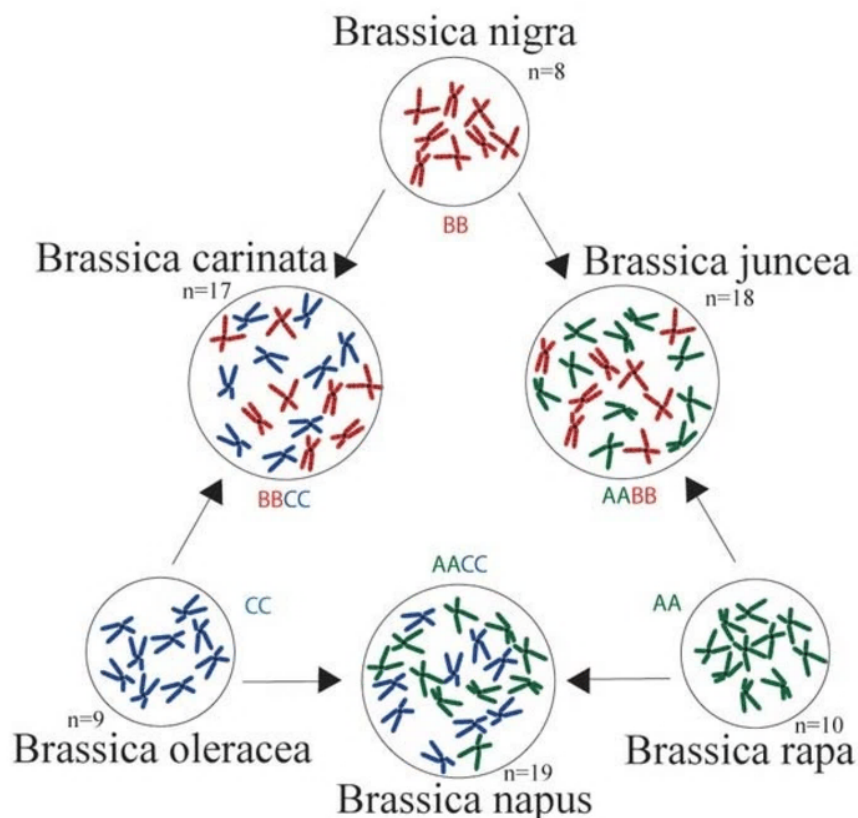


Рис. 1.1 Еволюційний шлях ріпаку *B. napus* L. [10]

Озимий і ярий ріпак культивують як олійну культуру у помірних широтах Європи, Північної Америки, Азії. Олійні різновиди: ріпак озимий (*B. napus* var. *oleifera biennis*) і ріпак ярий (*B. napus* var. *oleifera annua*) морфологічно не розрізняються [11]. Їстівний різновид з товстим коренем (*B. napus* var. *rapifera*) відомий як бруква. Ріпак розмножується тільки насінням, яке зберігає схожість протягом 5–6 років. Плід – стручок довжиною 6–14 см розтріскується двома стулками. На одній рослині звичайно буває 300–500 стручків, у яких розміщується по 25–36 чорних насінин кулястої форми діаметром 1,7–4,4 мм. Насінний рубчик круглий, з чорною крапкою в центрі. Маса 1000 насінин 2,6–4,5 г, рідше – 5–7 г. Насіння олійних сортів ріпаку багате на жир і білок.

Коренева система ріпаку володіє властивістю розпушувача підґрунтя, що має важливе значення для зниження ефекту ущільнення, зумовленого дією сільськогосподарських машин. Стебло циліндричне і розгалужене, при входженні в зиму озимий ріпак утворює вкорочене стебло-розетку з 6–10 листків, серед яких нижні листки – черешкові, верхні – видовжено-ланцетні, сизо-зеленого забарвлення. Ріпак вважається факультативним самозапильником, проте може мати різні співвідношення типів запилення, що залежить від сортових особливостей.

Озимий ріпак проходить у своєму розвитку чотири основні періоди (1 – утворення листків, 2 – утворення генеративних органів; 3 – цвітіння; 4 – досягання) та 20 фенологічних фаз і 12 етапів органогенезу [12].

Ріпакова олія містить понад 30 вищих жирних кислот, основні з яких – пальмітинова (2,5–6,0%), стеаринова (не більше 3,0%), олеїнова (50–67%), лінолева (16–30%), ліноленова (6–14%), ейкозенова (не більше 5,0%) та ерукова (не більше 5,0%), а також арахісову і бегенову кислоти. Вміст білка у насінні залежить від сорту та становить 21–33%. У білку переважають глобуліни; він є повноцінним за вмістом незамінних амінокислот. Вміст глюकोзинолатів (тіоглікозидів) у насінні старих сортів

становить 6–8%, у нових – 0,1–0,3%. Виділено 6 глюкозидів, які надають шроту гіркого смаку: глюконапін, глюкобрасиконапін, глюкоіберин, глюконастуртин, прогоїтрин (глюкораліферин), синальбін. Ферментативний гідроліз веде до утворення глюкози, алілізотіоціанату і мінорних кількостей інших летких метаболітів: метил-, ізопропіл-, секбутил-, бутил-, 3-бутеніл-, 4-пентил-, феніл-, 3-метилтіопропіл-, бензил- і β -фенілетил-ізотіоціанати. Ріпакову олію тривалий час використовували як дешеву альтернативу оливкової олії. Великий вміст сполук сірки та токсичних для людини і тварини ерукової кислоти і глюкозинолатів гальмували поширення рослини. Однак, за допомогою методів генної інженерії були створені сорти ріпаку із низьким вмістом у насінні глюкозинолатів та ерукової кислоти (так звані "00" сорти) [9].

На сьогоднішній день в Україні є такі типи сортів і гібридів ріпаку [13]:

- традиційні сорти (++) – високий вміст ерукової кислоти і глюкозинолатів; використовують як зелене добриво (сидерати);
- звичайна якість (0+) – низький вміст ерукової кислоти і високий рівень глюкозинолатів; використовуються для одержання високоякісної олії, але з обмеженим застосуванням шроту для корму тварин;
- подвійна якість (00) – низький рівень ерукової кислоти і глюкозинолатів; використовуються для виробництва якісної олії та білкових кормів;
- з високим вмістом ерукової кислоти і низьким вмістом глюкозинолатів (+0); використовується для виробництва технічних олив і біологічного дизельного пального, а шрот – як білковий корм.

Шляхом механічного пресування або екстракції олії d-гексаном із насіння *B. napus* (*B. campestris*) var. *oleifera* та інших різновидів отримують макуху. Вживання ріпакової олії в їжу й у медичній практиці було обмежено вмістом токсичних речовин: у насінні – ерукової кислоти, у

траві й макусі – глюкозинолатів. Стандартизована олія належить до антифрикційних речовин (лубрикантів) та розчинників ліпофільних речовин; застосовується в технології м'яких мил та рідких мазей, а також у косметичі; значна маса йде на виготовлення маргарину. Технічна жирна ріпакова олія використовується як пальне, у миловарінні, лакофарбовій, текстильній промисловості, для гартування сталей; після спеціальної обробки олія добре вулканізується, утворюючи каучукоподібну масу (фактис) [11]. Ріпакова олія – багате джерело жиророзчинних вітамінів, таких як: Е, К та провітамін А. Вітамін Е вважається одним з найсильніших антиоксидантів. Він заспокоює запальні процеси в організмі, знижує ризик розвитку атеросклерозу та раку. За вмістом вітаміну К ріпакова олія посідає друге місце після виноградної. Також ріпак є хорошим зеленим кормом для сільськогосподарських тварин, тому що зелена маса при весняній сівбі містить до 31 % білка на абсолютно суху речовину, клітковину, а також багато вітамінів і мінеральних речовин (Са, Р, S та ін.). На силос використовують також пергу – гібрид ріпаку та кормової капусти. Із соломи ріпаку у Великій Британії, Угорщині, Іспанії, Португалії виготовляють папір, целюлозу та картон [11, 12].

В Україні близько 95% від загальної посівної площі ріпаку займає озимий ріпак. Кліматичні умови України сприятливі для вирощування саме цього різновиду. У зв'язку з довшим вегетаційним періодом озимого ріпаку у порівнянні з ярим, його розвиток дещо сильніший, врожайність вища, а вміст олії в насінні на 2–4% більший. Озимий ріпак переносить морози до -15°C без снігового покриву. При поступовому зниженні температури відбувається поступове загартування рослин і ріпаківі не спричиняє шкоди навіть -20°C . Озимий ріпак – холодостійка, але вибаглива до умов вирощування культура, особливо до умов перезимівлі. Кліматичні й ґрунтові умови впливають на розвиток рослин та їх продуктивність. Це рослина довгого дня, ясна погода під час загартування

сприяє підвищенню морозостійкості. Загартування ріпаку добре проходить у фазі розетки та за умов 5°C впродовж 10 діб і наступних 5 діб з температурою -3°C. Такі рослини добре реагують на зниження температур на глибині 1,5–2 см до -12...-14°C, а при хорошому сніговому покриві витримує морози до -23...-25°C, незагартовані рослини гинуть за температури -6...-8°C. Найкращою температурою у період цвітіння і досягання вважається від +18°C до +20°C [12]. При температурах вище +30°C пригнічується ріст і розвиток, а при температурі вище +35°C він зовсім зупиняється. Хороші врожаї ріпак дає на помірно засолених ґрунтах з кислотністю, близькою до оптимальної, – рН 6,5–6,8. Ріпак має високу потребу у воді. Транспіраційний коефіцієнт складає 400–500 мм. Для високого врожаю озимого ріпаку оптимальним є 600–800 мм опадів на рік. Найбільш критичні періоди це стеблуння, бутонізація та цвітіння. Від початку цвітіння до дозрівання ріпак потребує 300 мм води – за цей час при оптимальних умовах ріпак утворює близько 65 кг насіння на 1 га.

Озимий ріпак активно використовують для сидерації ґрунту. Завдяки розвиненій кореневій системі ріпак видобуває з нижніх шарів ґрунту поживні речовини, мінерали й мікроелементи та позитивно впливає на насичення ґрунту киснем. Густа рослинна маса швидко росте, повністю покриває землю та закриває будь-який доступ для бур'янів. Озимий ріпак впродовж 11 місяців забезпечує надґрунтовий покрив, що обмежує шкідливий вплив вітрової та водної ерозії на ґрунти протягом суворих зимових місяців без потреби у додаткових витратах [14].

У 2019 році в Україні зібрали рекордний урожай ріпаку – на 22% більше, ніж у 2018 р. Площі під ріпаком вирости до 1,3 млн га і є рекордним показником за останні 9 років. Крім того, у 2019 році Україна посіла друге місце за експортом ріпаку у світі – \$1,3 млрд, за рік приріст склав 29%. Вирощування ріпаку в Україні орієнтоване на ринок ЄС, більшість врожаю експортується в перші місяці після збирання. Обсяг

експорту перевищує імпорт у 355 разів. ЄС імпортує ріпак в основному з України, Австралії та Канади. Найбільшими виробниками насіння ріпаку у світі є ЄС, Канада та Китай. Разом його виробництво в цих країнах, за даними FAOSTAT у 2018 р., становило близько 62 млн т або 83% від загальносвітового рівня. При цьому 70% світової торгівлі забезпечує Канада [15].

Таким чином, зі зростанням попиту на насіння ріпаку та продукти його переробки, росте і необхідність отримання нових сортів рослин цього виду – високопродуктивних, стійких до біотичних та абіотичних умов середовища, із якісно новими і корисними ознаками.

1.2. Особливості регенерації та генетичної трансформації *in vitro* ріпаку озимого *B. napus* L.

Генетична трансформація та мутагенез ріпаку базується на застосуванні культури тканин *in vitro* та молекулярно-генетичних підходах. Так, на сьогоднішній день основним методом генетичної трансформації залишається *Agrobacterium*-опосередкований перенос генів, оснований на природній здатності агробактерій передавати рослинній клітині генетичну інформацію. З метою покращення генетичних характеристик ріпаку, починаючи з кінця 80-х років минулого століття, були розроблені протоколи для його *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [16–18]. Вже було здійснено успішну генетичну трансформацію модельних [19–21] та деяких комерційних [22–25] сортів ріпаку. Генетична трансформація за допомогою агробактерій має ряд переваг і залишається одним з найпоширеніших методів модифікації рослинного геному. Ефективність генетичної трансформації залежить від багатьох факторів, зокрема: генотипу вихідної рослини, її сприйнятливості до трансформації, типу експланту, умов проведення трансформації та умов культивування.

Здатність регенерувати повноцінні рослини із трансформованих клітин також є важливою для успішної трансформації [22].

Поширеним способом регенерації рослин як в природі, так і в культурі *in vitro* є органогенез *de novo*, при якому рослинні експланти спочатку формують адвентивні бруньки, а згодом розвивають пагони та корені [26].

Зазвичай, в якості експлантів для регенерації та трансформації ріпаку використовують сім'ядолі [22; 25; 27], гіпокотилі [21; 28; 29] або фрагменти листя [20, 30]. Однак, при введенні в культуру *in vitro* рослин будь-якого генотипу потрібно враховувати їх індивідуальні особливості та підбирати оптимальний тип експланта для регенерації, склад живильного середовища та умови культивування (температура, вологість, освітлення). Для індукції калюсогенезу та органогенезу використовують такі регулятори росту, як 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д), кінетин (Кін), бензиладенін (БА), 6-бензиламінопурин (БАП), α -нафтилоцтова кислота (НОК) [31]. Більшість методик регенерації *in vitro* були розроблені для ярих сортів ріпаку, оскільки озимі виявляють низький регенераційний потенціал та нездатність (*англ.* – recalcitrance) до трансформації. Крім того, процес отримання фертильних рослин та насіння у озимого ріпаку ускладнений необхідністю проведення яровизації.

Незважаючи на те, що вже було здійснено успішну трансформацію деяких комерційних ліній ріпаку [22–25], для максимального виходу трансгенних рослин необхідно підбирати оптимальні умови *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації для кожного індивідуального генотипу ріпаку.

1.2.1. Фактори, що впливають на морфогенез та генетичну трансформацію ріпаку *in vitro*

Для генетичної інженерії регенерація ріпаку *in vitro* є необхідною умовою для успішного розвитку трансгенних рослин. Здатність рослин до регенерації *in vitro* можна підсилити за рахунок екзогенних регуляторів росту, а розвиток тих чи інших органів залежить від балансу ауксинів та цитокінінів. Експериментальні дані вказують на те, що регенерація рослин відбувається або в результаті перепрограмування диференційованих соматичних клітин, або шляхом активації відносно недиференційованих клітин [26]. Таким чином, значний вплив на частоту регенерації ріпаку в культурі *in vitro* чинить тип експланта та склад живильного середовища.

Ще у 1985 році була показана висока регенераційна здатність ріпаку *B. napus* сорту Westar в культурі *in vitro* при використанні тонкого шару клітин (епідерміс та 4–9 шарів субепідермальних клітин) в якості експлантів. Найбільша кількість пагонів утворювалась на живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС), доповненому 0,5 мг/л НОК та 10–15 мг/л БА [32]. В роботі [33] для максимальної регенерації ембріогенного калюсу, отриманого із гіпокотилів ріпаку сорту Rainbow, використовували живильне середовище В5, доповнене 5 мг/л БАП та 1 мг/л НОК.

У більш пізніх дослідженнях морфогенезу ріпаку *in vitro* [34] виявлено, що максимальна частота регенерації сорту Quantum (68,8%) спостерігається із сім'ядоль на живильному середовищі, доповненому 8 мг/л БАП, 1 мг/л НОК та 3 мг/л абсцизової кислоти (АБК). Однак, такі високі концентрації регуляторів росту часто призводять до вітрифікації рослин-регенерантів, а згодом і до їх загибелі [34; 35].

Співробітниками ІКБГІ НАНУ було показано, що для регенерації трансформованих листових експлантів ріпаку *B. napus* комерційного сорту ВНІС-100 оптимальним є живильне середовище МС, що містить 2 мг/л БА,

1 мг/л Зеа, 1 мг/л НОК, 1 мг/л гіберелової кислоти (ГК₃) та 1 мг/л АБК [36].

Gerszberg зі співавт. [37] показали, що оптимальним типом експлантів для регенерації восьми сортів капусти городньої *B. oleracea* var. *capitata* є гіпокотилі, отримані з 10-денних проростків. При цьому, серед п'яти типів живильних середовищ, що аналізували, найбільш ефективним було те, що містило 1,8 мг/л БАП та 0,01 мг/л НОК. Для індукції ризогенезу у рослин-регенерантів оптимальним було живильне середовище, доповнене 0,1 мг/л НОК. Крім того, у роботі [38] виявлено, що для регенерації калюсу, отриманого з 2-тижневих гіпокотилів капусти білоголової *B. oleracea*, доцільно використовувати НОК у концентрації 0,1–0,3 мг/л та БАП – 1–2 мг/л.

В роботі [39] досліджували частоту регенерації (співвідношення кількості експлантів, що утворили пагони, до загального числа експлантів) трьох комерційних сортів ріпаку *B. napus* (Faisal canola, Punjab canola, Nifa Gold), одного сорту гірчиці *B. juncea* (Aari canola) та модельного сорту ріпаку Westar. Найвищі показники ефективності регенерації, а також регенераційної відповіді (кількість пагонів, утворених на один експлант) були зафіксовані у гірчиці Aari canola і досягали 73,3% при використанні в якості експлантів сім'ядоль. Максимальна частота регенерації для ріпаку сорту Faisal становила 40% при використанні сім'ядоль як експлантів на регенераційному живильному середовищі, доповненому 1 мг/л БАП. Найвища регенерація з гіпокотилів спостерігалась для сорту Nifa Gold на живильному середовищі, доповненому 3 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 5 мг/л AgNO₃ і 0,01 мг/л ГК₃, та становила 32,6%. На цьому ж середовищі спостерігалась максимальна частота регенерації сорту Westar – 30% та 37,3% (для сім'ядоль і гіпокотилів відповідно). Для вкорінення рослин-регенерантів використовували як безгормональне середовище, так і доповнене 0,01 мг/л НОК або 1 мг/л індол-3-масляної кислоти (ІМК) [39].

Крім того, експериментально було з'ясовано, що активація раневого транскрипційного фактора арабідопсису, який індукує дедиференціацію, AtWIND1 (wound induced dedifferentiation1) у гіпокотиліх ріпаку *B. napus* сорту Westar посилює формування калюсу та подальшу регенерацію органів [40].

Перші експерименти з генетичної трансформації ріпаку *B. napus* були успішно здійснені ще наприкінці 80-х – на початку 90-х рр. [16–18; 41–43] (табл. 1.1). З часом в якості експлантів почали в основному використовувати гіпокотилі 4–7-денних проростків, оскільки вони були визнані максимально ефективними для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ріпаку [31]. В експериментах із генетичної трансформації озимих сортів ріпаку [17; 21] та сортів-дворучок [44] також використовували гіпокотилі (табл. 1.1).

Зазвичай для генетичної трансформації ріпаку використовують штами *A. tumefaciens* GV3101, LBA4404, ЕНА та AGL [31], (табл. 1.1). При цьому оптична щільність агробактеріальної суспензії для інокуляції експлантів при довжині хвилі світла 600 нм (OD_{600}) варіює – від 0,1 [45], 0,2 [19], 0,4 [21], 0,5 [29; 46] до 0,8 [23; 44; 47; 48] та 1 [49].

Також на частоту та ефективність трансформації впливає тривалість прекультивування, інокуляції та ко-культивування експлантів ріпаку. В різних джерелах час експозиції експлантів у суспензії *A. tumefaciens* становив від 5 [23; 29; 43] до 30 хвилин [44; 50], а ко-культивування – від 48 [23] до 72 год [19; 25; 44].

В деяких експериментах для підвищення ефективності *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ріпаку в інокуляційне середовище додавали ацетосирингон (50–200 мкМ) – синтетичну фенольну сполуку, що активує гени вірулентності *A. tumefaciens* [19; 21; 23–24; 29; 43; 46–47; 49; 51].

Таблиця 1.1. Узагальнені дані *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ріпаку *B. napus*

Сорт	Тип експлантів	Штам <i>A. tumefaciens</i>	Гени, які переносили	Частота (або в деяких джерелах – ефективність) трансформації	Посилання
Westar	фрагменти стебла	A208 GV3111	<i>neo</i> <i>nptII</i>	21%	Fry et al., 1987
Westar	фрагменти стебла	A208-E	<i>dhfr</i>	10%	Pua et al, 1987
Westar	гіпокотилі	ЕНА101 A281	<i>nptII</i> <i>pgNa</i>	0,4–2,5%	Radke et al., 1987
Westar R8494 (озимий)	гіпокотилі	C58C1Rif	<i>neo</i> <i>bar</i>	30%	De Block et al., 1989
Westar	сім'ядолі	ЕНА101	<i>nptII</i>	55%	Moloney et al., 1989
Cobra (озимий) Optima	фрагменти пагонів	LBA4404 C58/3	<i>nptII</i> <i>gus</i>	6,4%	Boulter et al., 1990
Westar	гіпокотилі	GV3850	<i>gfp</i> <i>nptII</i>	25%	Cardoza V. & Stewart C.N., 2003
Kalinovskiy VNIS 100	фрагменти листя	GV3101	<i>bar</i> <i>nptII</i>	8–9%	Sakhno et al., 2007
Westar	сім'ядолі	LBA4404	<i>nptII</i>	33,1%	Bhalla P.L. & Singh M.B., 2008
Oscar				68,1%	
Taparoo				67,6%	
Charlton				7,7%	
Rainbow				11,9%	
Licord SLM046 RGS003 Zarfam Okapi Sarigol Modena Opera	сім'ядолі, гіпокотилі	AGL0	<i>uidA</i> <i>bar</i>	0,2% – 15,26%	Mashayekhi et al., 2008

Продовження таблиці 1.1

Сорт	Тип експлантів	Штам <i>A. tumefaciens</i>	Гени, які переносили	Частота (або в деяких джерелах – ефективність) трансформації	Посилання
Ningyou 16	сім'ядолі	LBA4404	<i>nptII</i> <i>gus</i> - <i>mgfp-is6</i>	18,93%	Kong et al., 2009
Westar	гіпокотилі	GV3101	<i>gfp</i> <i>bar</i>	13,16%	Hao et al., 2010
Hyola 401				12,35%	
4414RR				6,5%	
Hanna	сім'ядолі	AGL0	<i>psl</i> <i>gus</i> <i>nptII</i>	1,8%	Князев и др., 2010
Invigor 5020	гіпокотилі	GV3101	<i>hpt</i> <i>luc</i>	54,2%	Maheshwari et al., 2011
Westar				53,7%	
Topas				16,0%	
Line 4079				13,4%	
Magnat	фрагменти листя	GV3101	<i>bar</i> <i>inf-α2b</i>	не вказано	Sakhno et al., 2012
Obreey	фрагменти листя	GV3101	<i>desC</i> <i>licBM3</i> <i>nptII</i> <i>bar</i> CP4 <i>epsps</i>	17,6%	Sakhno et al., 2012
Wester (озимий)	гіпокотилі	LBA4404	<i>nptII</i> <i>hptII</i> <i>gus</i>	45%	Hussain et al., 2014
Con-1 (озимий)				45%	
Racola (озимий)				75%	
Westar AG DH1012	сім'ядолі	AGL1 LBA4404 EHA101	не вказано	не вказано	Hundleby P. & Irwin J.A., 2015
Precocity	гіпокотилі	GV3101	<i>hygr</i> <i>nptII</i> <i>gus</i> <i>BnHSP22</i>	24%	Liu et al., 2015

Продовження таблиці 1.1

Сорт	Тип експлантів	Штам <i>A. tumefaciens</i>	Гени, які переносили	Частота (або в деяких джерелах – ефективність) трансформації	Посилання
Hanna, Ратник	занурення квітів (floral dip, <i>in vivo</i>)	AGL	<i>arl</i>	10%	Михайлова и др., 2015
Westar DH12075 BGRV4	сім'ядолі	AGL1 LBA4404 C58pMP 90	<i>nptII</i>	20%	Bates et al., 2016
Topas Polo	гіпокотилі	LBA4404	<i>BnLEC1</i>	не вказано	Elahi et al., 2016
SLM046	гіпокотилі	AGL01	<i>bar</i> <i>cry1Ab</i>	18,4%	Rahnama et al., 2016
Zhongshuang 6	гіпокотилі	GV3101	<i>nptII</i> <i>bar</i>	17,38%	Fang et al., 2017
Westar Zhongshuang 9 (дворучка) Zhongshuang 11 (дворучка) GY284 (дворучка) WH3417 (дворучка)	гіпокотилі	GV3101 C58C1 EHA105	<i>hptII</i>	3,7–4,8%	Dai et al., 2020
			<i>nptII</i>	2,2–22,5%	
			<i>pat</i>	1,6–5,9%	
			<i>BnPLDα1</i>	6,7–7,1%	
			<i>BnPLDδ</i>	5,1–22,5%	
			<i>BnKCS</i>	3,8–15,0%	
			<i>BnIncRNA</i>	3,7–4,0%	
			<i>BnFAE1</i>	2,7–4,1%	
			<i>BnFAD2</i>	1,1–5,6%	
Westar	сім'ядолі	C58	<i>gus</i> <i>luc</i>	не вказано	Mooney B.C. & Graciet E., 2020
Westar, Podmoskovny	сім'ядолі, фрагменти листя	AGL0	<i>gfp</i> <i>nptII</i>	не вказано	Raldugina et al., 2021

Таким чином, актуальною проблемою залишається оптимізація умов проведення генетичної трансформації комерційних сортів озимого ріпаку *B. napus*, для максимального відбору біотехнологічних рослин із новими якісними ознаками.

1.2.2. Напрямки генетичної інженерії у селекції ріпаку

За допомогою поєднання генетичної інженерії та традиційної селекції у світі було створено багато сортів та гібридів важливих сільськогосподарських культур з рядом господарсько-цінних ознак, таких як: стійкість до гербіцидів, шкідників, посухи та інших. Зокрема, селекція та біотехнологія ріпаку *B. napus* продовжує розвиватись за наступними напрямками:

- підвищення врожайності (збільшення зеленої маси та ваги насіння);
- стійкість до гербіцидів (гени *epsps*, *bar*, *gox*, *als* тощо);
- стійкість до хвороб та шкідників (гени *cry* та ін.);
- зміна жирнокислотного складу (ген *BnaFAD* та ін.);
- регуляція дозрівання (гени *ind*, *alc*, *clv* тощо);
- отримання білків, антитіл, вакцин (гени *ifn*, *col* тощо).

Так, наприклад, компанією Monsanto було створено Roundup Ready (RR)-ріпак, що містить ген гліфосат-оксидази (*gox*), яка руйнує діючу речовину гербіциду Roundup. В більшості випадків RR-рослини містять повну копію гена еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтетази (EPSPS або EPSP synthase) з ґрунтової бактерії *Agrobacterium* sp. штам CP4. Цей фермент стійкий до дії гліфосату, або N-фосфометил-гліцину (діюча речовина Roundup і дженериків).

Також варто зазначити, що співробітниками відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН

України створені трансгенні рослини ріпаку, стійкі до фосфінотрицину (глюфосинату амонію) і фосфометилгліцину (діючі речовини гербіцидів) шляхом ведення генів *bar* (ген фосфінотрицин ацетил трансферази) та CP4 *epsps* [52–53] (табл. 1.1).

У реєстрі ГМ-культур Європейського союзу наразі нараховується 13 генетичних подій для ріпаку *B. napus* (EU Register of authorised GMOs, Database for the regulatory and market status of certain agricultural biotechnology products). Детальний опис цих подій представлено у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2. Трансформаційні події ріпаку *B. napus*, затверджені у Європейському Союзі [54]

Назва події	Гени, що вносили	Спосіб модифікації	Комерційна назва	Компанія-розробник
GT73 (RT73)	CP4 <i>epsps</i> <i>goxv247</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	Roundup Ready™ Canola	Monsanto Company
HCN28 (T45)	<i>pat (syn)</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
HCN92 (Topas 19/2)	<i>bar nptII</i>	Перехресна гібридизація та селекція із залученням трансгенних донорів	Liberty Link™ Innovator™	Bayer CropScience
MON88302	CP4 <i>epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	TruFlex™ Roundup Ready™ Canola	Monsanto Company
MON88302 x MS8 x RF3	CP4 <i>epsps</i> <i>bar barnase barstar</i>	Перехресна гібридизація та селекція із залученням трансгенних донорів	InVigor™ x TruFlex™ Roundup Ready™ Canola	Monsanto Company

Продовження таблиці 1.2

Назва події	Гени, що вносили	Спосіб модифікації	Комерційна назва	Компанія-розробник
MS1 (B91-4)	<i>bar</i> <i>barnase</i> <i>nptII</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
MS1 x RF1 (PGS1)	<i>bar</i> <i>barnase</i> <i>barstar</i> <i>nptII</i>	Перехресна гібридизація та селекція із залученням трансгенних донорів	InVigor™ Canola	BASF
MS1 x RF2 (PGS2)	<i>bar</i> <i>barnase</i> <i>barstar</i> <i>nptII</i>	Перехресна гібридизація та селекція із залученням трансгенних донорів	InVigor™ Canola	BASF
MS8	<i>bar</i> <i>barnase</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
MS8 x RF3	<i>bar</i> <i>barnase</i> <i>barstar</i>	Перехресна гібридизація та селекція із залученням трансгенних донорів	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
RF1 (B93-101)	<i>bar</i> <i>barstar</i> <i>nptII</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
RF2 (B94-2)	<i>bar</i> <i>barstar</i> <i>nptII</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	Bayer CropScience
RF3	<i>bar</i> <i>barstar</i>	<i>Agrobacterium</i> -опосередкована генетична трансформація	InVigor™ Canola	BASF

Ріпак з трансформаційними подіями T45, Ms8, Rf3 та зчепленою подією Ms8xRf3 експресуює гени ферментів, які забезпечують стійкість до глюфосинату амонію (ген *bar*). Крім того, Ms8 містить ген *barnase* («чоловіча стерильність»), Rf3 – ген *barstar* («відновлювач фертильності»), а Ms8xRf3 – обидва гени. GT73 (RT73) експресує гени толерантності та стійкості до гліфосату (CP4 *epsps* і *goxv247* відповідно) (табл. 1.2).

На сьогоднішній день гліфосат залишається діючою речовиною більшості несистемних гербіцидів, таких як Раундап®, Торнадо®, Ураган-Форте (Syngenta), «Тріумф», «Агрокіллер» та ін., що застосовуються для боротьби з однорічними та багаторічними бур'янами в період вегетації. Дія гліфосату обумовлена тим, що він інгібує фермент рослин 5-еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS). Фермент EPSPS каталізує перенесення еноїлпірувільної частини фосфоенолпірувату у 5-гідроксильну групу шикимат-3-фосфату для утворення 5-еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфату на передостанньому етапі шикиматного шляху. У рослинах, грибах та бактеріях шикиматний шлях є критичним для біосинтезу ароматичних амінокислот, таких як тирозин, триптофан і фенілаланін. EPSPS є мішенню для N-фосфонометил-гліцину (гліфосату). Гліфосат нагадує фосфоенолпіруват у перехідному стані та утворює тупиковий комплекс із ферментом EPSPS, зв'язаним із хлоропластами, що призводить до повного інгібування шикиматного шляху. Тому, при потраплянні гліфосату на рослину, він проникає в клітини, блокує синтез ряду амінокислот, і рослина гине [55]. Оскільки шикиматний шлях відсутній у тварин, гліфосат не є шкідливим для комах, птахів, людини та інших тварин.

Іншим неселективним гербіцидом є глюфосинат амонію (фосфінотрицин), який повністю інгібує фермент глутамінсинтазу. Цей фермент відіграє важливу роль під час перетворення глутамату та амонію в глутамін. Пригнічення глутамінсинтази призводить до накопичення амонію, що інгібує реакції фотосистеми I та II. Для створення стійких до

глюфосинату рослин використовуються бактеріальні гени *bar* та *pat*, отримані з виду *Streptomyces* [56].

Хоча в Україні вже були створені трансгенні рослини ярого ріпаку з генами стійкості до гліфосату та глюфосинату [4–6], на сьогоднішній день залишається актуальним питання оптимізації методик генетичної трансформації саме озимого ріпаку.

1.3. Система редагування геному CRISPR/Cas9 як перспективний інструмент покращення характеристик ріпаку озимого *B. napus* L.

На сьогоднішній день в арсеналі вчених з'явився новий інструмент, який дозволяє вирішувати задачі високоточного редагування геному рослин, тварин і людини – система CRISPR/Cas9.

Система CRISPR/Cas9 здійснює впізнавання послідовності-мішені за рахунок комплементарної взаємодії між некодуючою РНК і ДНК цільових сайтів. Білок Cas9 – ендонуклеаза, яка здійснює розрізання ланцюга ДНК, вносячи в нього як окремі точкові мутації, так і більші за розміром делеції. Внаслідок цього процесу ген може бути інактивований, продукт його експресії може виявитись нефункціональним або набувати нових властивостей [7].

Ендонуклеаза Cas9 може бути отримана із різних мікроорганізмів, таких як *Brevibacillus laterosporus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. thermophilus*. Найчастіше для виділення Cas9 використовують *S. pyogenes* [57; 58]. Cas9 містить два домени – HNH та RuvC-подібний домен (рис. 1.3). Домен HNH розрізає комплементарний crRNA ланцюг (CRISPR-РНК), в той час як RuvC-подібний домен розрізає протилежний ланцюг дволанцюгової ДНК. Одинична гідова (керуюча) РНК (sgRNA) – це синтетична РНК, довжиною близько 100 нт. Її 5'-кінець має 20-нуклеотидну послідовність, що виконує роль направляючої для

розпізнавання цільової послідовності, та супроводжується суміжним протоспейсерним мотивом – PAM (protospacer adjacent motif), що часто є консенсусною послідовністю NGG (N – будь-який нуклеотид, G – гуанін) [58]. Петлеподібна структура на 3'-кінці sgRNA (рис. 1.3) може закріплювати цільову послідовність та формувати комплекс із Cas9, який здійснює дволанцюговий розрив ДНК у присутності йонів Mg^{2+} [59]. Після цього запускається процес редагування ДНК – негомологічне з'єднання кінців (nonhomologous end-joining, NHEJ) або гомологічна репарація (homology-directed repair, HDR). Зазвичай дволанцюгові розриви репаруються шляхом NHEJ, що призводить до утворення місметчів (некомплементарних основ) або інсерцій/делецій з подальшою інактивацією гена. Якщо присутня оліго-матриця, гомологічна репарація індукує специфічну заміну гена або вставку чужорідної ДНК. Всі ці процеси можуть застосовуватись для редагування геному різних організмів, включаючи рослини, тварини та людину [57; 58; 60].

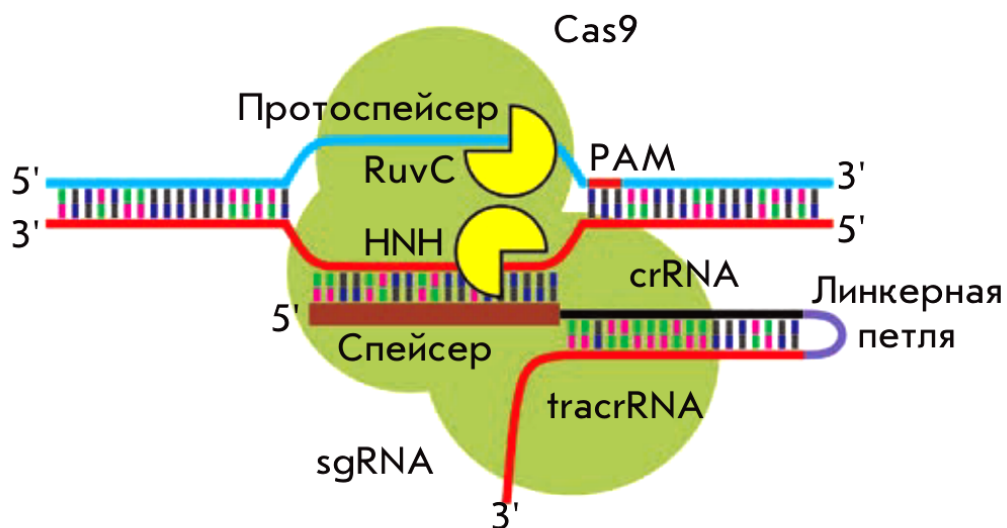


Рис. 1.2. Єдина химерна sgRNA для внесення дволанцюгових розривів у цільових локусах [61]

Загальна стратегія генної інженерії за допомогою CRISPR/Cas9 включає чотири основні етапи [61; 62]:

- вибір цільової нуклеотидної послідовності в геномі;
- створення нуклеазної конструкції, направленої на обрану мішень;
- доставка конструкції в клітинне ядро;
- аналіз отриманих мутацій.

На сьогоднішній день існує багато доступних векторів та он-лайн інструментів для дизайну sgRNA [62]. Плазмідні вектори на основі CRISPR/Cas9 обов'язково мають у своєму складі сайт початку реплікації, селективний маркер, сайти для розрізання рестриктазами, ген білку Cas9, а також ділянку CRISPR, у яку відбувається вставка цільової послідовності, що в подальшому буде слугувати у якості sgRNA. Розмір вставки складає близько 20 по. Ця ділянка є комплементарною до відповідного фрагменту певного гену – того, у якому необхідно здійснити редагування [7; 63].

Використання системи CRISPR/Cas9 має ряд переваг: її значно простіше використовувати, вона має більш високу ефективність і підходить для високопродуктивного і мультиплексного редагування геному в найрізноманітніших клітинних лініях і живих організмах. Для переорієнтації на нову мішень потрібно тільки змінити 20-нуклеотидну направляючу послідовність некодуючої РНК [7].

Для доставки системи редагування геному в рослини, клітини яких мають щільну оболонку, використовують методи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, ПЕГ-опосередкованої трансформації протопластів, доставки за допомогою вірусних векторів та бомбардування наночастинками [60; 64].

Важливим моментом при роботі з системою CRISPR/Cas9 являється ретельний підбір сайтів для специфічного внесення дволанцюгового розриву. Необхідність попереднього біоінформаційного аналізу пояснюється

можливістю нецільових ефектів – внесення неспецифічних дволанцюгових розривів в геном. При виборі потрібних сайтів слід уникати ділянок повторених послідовностей, а також ділянок, що мають високу гомологію з іншими районами геному.

Таким чином, система редагування геному CRISPR/Cas9 може використовуватись для покращення таких ознак рослин, як стійкість до біотичних (вірусів, бактерій, комах) та абіотичних стресів (посухи, високих і низьких температур), а також для підвищення врожайності (наприклад, збільшення маси зерен). Крім того, система CRISPR/Cas9 може значно прискорити фундаментальні дослідження в галузі біології рослин [65].

Окрім генетичної трансформації із перенесенням генів стійкості до гербіцидів одним організмам від інших, можна піти шляхом редагування таких ознак – отримувати стійкі до гербіцидів рослини за допомогою системи CRISPR/Cas9.

Гени стійкості до гербіцидів поділяють на дві групи: гербіцид-деградуючі/інактивуючі ферменти бактеріального походження (AAD-1, DMO, PAT/BAR, BXN, GAT4601) та мутантні форми ферментів важливих біосинтетичних шляхів, які нечутливі до відповідних гербіцидів (CP4 EPSPS, 2MEPSPS, MEPSPS, HPPDPF W336, AvHPPD-03, ALS/SURB). Гени другої групи можуть бути мішенями для редагування геному [66].

На сьогоднішній день вже було здійснено успішне редагування ріпаку *B. napus*, де цільовими генами були: *BnaALC* – залучений у розвиток стулок та сприяє висипанню насіння після дозрівання [67]; *BnCLV* – сприяє ініціації органів [68]; *BnIND* – залучений у розвиток стулок стручків [69]; *BnaFAD2* – відповідає за синтез десатурази жирних кислот 2, яка перетворює олеїнову кислоту в лінолеву [44; 70; 71]; *BnWRKY11* та *BnWRKY70* – залучені у жасмонат- та саліцил-індуковану стійкість до патогенів [72]; *BnaEOD3* – стимулює ріст насіння [73]. У всіх вищезазначених роботах доставка системи CRISPR/Cas9 була здійснена за

допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гіпокотилів ріпаку. При цьому частота мутацій варіювала від 0–48,65% [68] до 76,6–80,5% [69].

Крім того, було проведено редагування геному інших комерційно важливих рослин роду *Brassica*, таких як: капуста *B. oleracea* – гени *BolC.GA4a* [74], *BoPDS*, *BoSRK*, *BoMSI* [75]; ефіопська гірчиця *B. carinata* – *BcFLA1* [76]; ріпа *B. campestris* – *Bra003491*, *Bra007665*, *Bra014410* [77] та *B. rapa* – *BraFLC2*, *BraFLC3* [78].

Одним із завдань нашої роботи було отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку, що несуть ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9 шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації *in vitro*, а також створення генетичної конструкції на основі системи редагування геному CRISPR/Cas9 для зміни жирнокислотного складу насіння ріпаку *B. napus* L. – підвищення вмісту олеїнової кислоти.

Висновки до розділу 1

Проведений аналіз літератури стосовно стану вирощування озимого ріпаку в Україні та світі, а також дані попередніх експериментальних досліджень дозволяють зробити висновок, що генетична трансформація та редагування геному ріпаку, зокрема озимого, залишаються актуальними завданнями.

На основі проведеного аналізу нами були поставлені завдання та сплановані досліді по оптимізації методик регенерації та генетичної трансформації озимого ріпаку української селекції, створенню трансгенних рослин озимого ріпаку із цінними сільськогосподарськими ознаками, а також конструюванню векторів на основі системи CRISPR/Cas9 для редагування геному ріпаку.

Основні положення цього розділу викладено в публікаціях автора: [79], [80], [81], [82], [83].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал та введення в культуру *in vitro*

В роботі використовували насіння комерційної лінії *Bn1* озимого ріпаку, яке було надане ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції». Лінія *Bn1* характеризується високим вмістом олії, ранньостиглістю та високою врожайністю і є батьківською формою при створенні гетерозисних гібридів української селекції.

Насіння вводили в культуру *in vitro* методом поверхневої стерилізації за наступною методикою: обробка 70% етанолом – 5 хв, 1,5% розчином гіпохлориту натрію – 20 хв із наступним триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді протягом 5 хв. Після стерилізації насіння висаджували на безгормональне живильне середовище МС [3], доповнене 400 мг/л антибіотику цефтріаксону (Ст) для запобігання контамінації мікроорганізмами та витримували протягом 24 год у темряві при температурі 24°C. Далі чашки з насінням культивували ще 5 діб в умовах культиваційної кімнати при температурі 24°C та 16-ти годинному фотоперіоді.

Рослини махорки *N. rustica* L. вирощували в умовах теплиці при 25/18°C та 16/8 годинному фотоперіоді (день/ніч відповідно). Для інфільтрації використовували листки середнього ярусу 4-х тижневих рослин. Насіння махорки було люб'язно надано к.б.н. Белокуровою В. Б. з Колекції зародкової плазми рослин флори України та світової флори (ІКБГІ НАН України).

2.2. Індукція калюсогенезу та регенерація пагонів ріпаку

Для індукції калюсогенезу та регенерації пагонів ріпаку використовували модифіковану методику [24]. Експлантами слугували сегменти гіпокотилів (0,5–1 см) 6-денних проростків ріпаку. Калюсні тканини ріпаку отримували на живильному середовищі МСК (МС, доповнене 1 мг/л 2,4-Д, табл. 2.1).

Для оптимізації методики регенерації із калюсу озимого ріпаку лінії *Bn1* індукцію утворення морфогенетичних осередків проводили на живильному середовищі МС, доповненому 4 мг/л БАП, 5 мг/л AgNO₃ та 2 мг/л одного з наступних регуляторів росту: зеатин (Зеа) – середовище МСО1, кінетин (Кін) – МСО2, або 2-ізопентиладенін (2-іП) – МСО3. 2-іП – це природний цитокінін, що регулює поділ клітин, розвиток органів і метаболізм в рослинах; він слугує попередником синтезу зеатину і в 5 разів дешевший за нього. Через 2-3 тижні культивування, після того, як були сформовані адвентивні бруньки, експланти переносили на середовище МС для регенерації пагонів, яке містило 3 мг/л БАП та 2 мг/л Зеа (МСР1), Кін (МСР2) або 2-іП (МСР3). Після формування ювенільних регенерантів, розміром 15–20 мм, проводили їх елонгацію на середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л БАП (МСЕ). Вкорінення рослин проводили на безгормональному середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей (МСВ). Склад середовищ наведено у таблиці 2.1.

Частоту морфогенезу ріпаку озимого лінії *Bn1* обчислювали як співвідношення кількості експлантів, які утворили морфогенетичні осередки, до загальної кількості експлантів. Частоту ризогенезу – як співвідношення кількості експлантів, які утворили корені, до загальної кількості експлантів. Частоту регенерації пагонів – як співвідношення числа експлантів, які утворили пагони, до загальної кількості експлантів, використаних в досліді.

2.3. Адаптація рослин-регенерантів ріпаку до умов *in vivo* та яровизація

Рослини-регенеранти озимого ріпаку висаджували в торф'яну суміш та вирощували в умовах теплиці (16-ти годинний фотоперіод, 24°C) протягом 6–8 тижнів. Для яровизації рослини поміщали в клімат-камеру з температурою 4°C та 8-годинним фотоперіодом на 8 тижнів. Після закінчення яровизації рослини вирощували в умовах теплиці (24°C, 16-ти годинний фотоперіод); утворення бутонів спостерігали через 4–5 тижнів. Для отримання насіння всі бутони накривали поліетиленовими ізоляторами та здійснювали примусове запилення; після висихання стручки зрізали та проводили морфологічний і кількісний аналіз отриманого насіння.

2.4. Бактеріальні штами та конструкції

Для *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів використовували штам ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Для оптимізації умов агробактеріальної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* використовували вектор pCB203. Конструкція містить репортерний ген β -глюкуронідази (*gus*), а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що надає стійкість клітинам рослин до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Продуктом активності гена *bar* є фосфінотрицин ацетилтрансфераза – фермент, що нейтралізує фосфінотрицин – здатна забезпечити ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі. Для високого рівня експресії цих генів у векторі були використані поліубіквітин-1 (*Ubi1*) промотор та інтрони кукурудзи [84] (рис. 2.1).

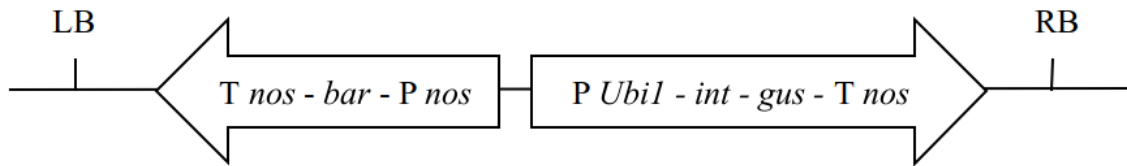


Рис. 2.1. Схематичне зображення Т-ДНК вектора pCB203:

RB, LB – межі Т-ДНК; *T nos* – термінатор гена нопалінсинтази;
P nos – промотор гена нопалінсинтази; *bar* – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *S. hygroscopicus*; *P Ubi1* – промотор гена поліубіквітин-1 *Zea mays*; *gus* – ген β-глюкуронідази *E. coli*.

Для створення біотехнологічних рослин озимого ріпаку лінії *Bn1*, стійких до гербіциду гліфосату, використовували вектори pCB133, pCB135 та pSPG2254.

Конструкція pCB133 містить цільовий ген толерантності до гліфосату CP4 *epsps*, а також селективний ген *bar*. Конструкція pCB135, крім цільового гена CP4 *epsps*, містить селективний ген неоміцин-фосфотрансферази (*nptII*), що надає трансгенним тканинам рослин стійкості до антибіотиків неоміцину та канаміцину (рис. 2.2).

Вектор pSPG2254 несе мутантний ген *epsps* *B. napus* під контролем подвійного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти та 35S термінатора цього вірусу (CaMV). Крім того, конструкція містить селективний ген *bar*, репортерний ген *gus* та репортерний ген зеленого флуоресцентного білка (*gfp*). Схематичний вигляд конструкції pSPG2254 зображено на рисунку 2.3.

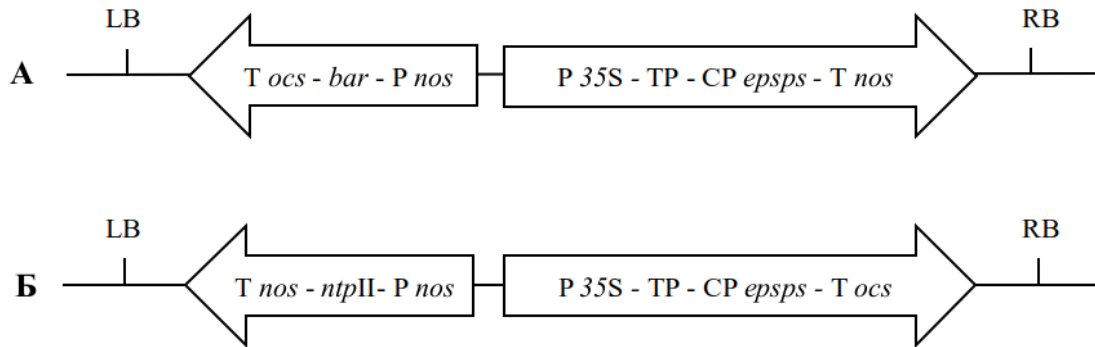


Рис. 2.2. Схематичне зображення векторів pCB133 (А) та pCB135 (Б): RB, LB – межі Т-ДНК; *T_{nos}* – термінатор гена нопалінсинтази; *P_{nos}* – промотор гена нопалінсинтази; *P_{35S}* – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV; *T_{ocs}* – термінатор гена октопінсинтази; TP – транзитний пептид; CP4 *epsps* – ген еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтази *A. tumefaciens* CP4; *bar* – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *S. hygroscopicus*; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази *E. coli*.

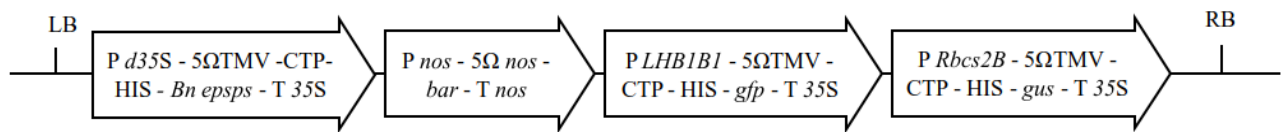


Рис. 2.3. Схематичне зображення вектора pSPG2254: RB, LB – межі Т-ДНК; *P_{d35S}* – подвійний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV; 5'ΩTMV – 5'-UTR послідовність, що не трансклюється, вірусу мозаїки тютюну; CTP – хлоропластний транзитний пептид; HIS – N-кінцевий HIS-тег (6х полігістидин); *Bn_{epsps}* – мутантний ген еноїлпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтетази *B. napus*; *T_{35S}* – 35S термінатор CaMV; *P_{nos}* – промотор гена нопалінсинтази; 5'Ω_{nos} – 5'-UTR послідовність нопалінсинтази; *bar* – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *S. hygroscopicus*; *T_{nos}* – термінатор гена нопалінсинтази; *P_{LHB1B1}* – промотор фотосистеми II *A. thaliana*; *gfp* – ген зеленого флуоресцентного білка *A. victoria*; *P_{Rbcs2B}* – промотор рибулозобіфосфаткарбоксилази *A. thaliana*; *gus* – ген β-глюкуронідази *A. thaliana*.

Для створення біотехнологічних рослин озимого ріпаку, що несуть ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, була використана генетична конструкція pSPE2053, створена нами в ході цього дослідження [83]. Ген *Cas9* був поміщений під контроль промотора гена *nos* та термінатора гена *Atug7*. Також конструкція pSPE2053 містить гени *bar* (під контролем промотора гена *RbcS2B* та термінатора гена *ocs*) і *gus* (під контролем подвійного 35S промотора CaMV та 35S термінатора CaMV).

2.5. *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку

Нічну культуру *A. tumefaciens* GV3101 нарощували при температурі 28°C протягом 18 годин в рідкому середовищі LB [2], яке містило наступні антибіотики: рифампіцин (Rf) – 50 мг/л, гентаміцин (Gm) – 25 мг/л та ампіцилін (Amp) – 100 мг/л (для генетичних конструкцій pCB203, pCB133 та pCB135) або канаміцин (Km) – 100 мг/л (для генетичної конструкції pSPE2053).

Бактеріальну суспензію центрифугували та ресуспендували в інокуляційному середовищі MCI (табл. 2.1) так, щоб оптична щільність бактерій становила 0,2, 0,5 або 1 при довжині хвилі світла 600 нм. Гіпокотилі, прекультивовані на середовищі MCK, інокулювали протягом 10, 30 або 60 хвилин з наступним просушуванням на стерильному фільтрувальному папері. Далі експланти поміщали на середовище MCK (табл. 2.1) та ко-культивували в умовах темряви при 24°C. Через 48 годин їх пересаджували на середовище MCK, доповнене 500 мг/л антибіотику Ст для елімінації бактеріальних клітин, та культивували протягом 10–12 днів. Після цього експланти пересаджували на середовище MCO3 (табл. 2.1), доповнене селективними агентами для відбору трансформованих клітин, – 5 мг/л фосфіотрицину (PPT) або 25 мг/л канаміцину (Km), із поступовим

збільшенням кількості агента в середовищі МСР3 – до 8 мг/л РРТ або 50 мг/л Km (табл. 2.1). На етапі елонгації та вкорінення пагонів кількість селективного агента знову зменшували до 3 мг/л РРТ або 25 мг/л Km. Всі живильні середовища містили 400 мг/л антибіотика Ст для уникнення бактеріальної контамінації. Пасажування здійснювали кожні два тижні.

Частоту генетичної трансформації обчислювали як співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин, утворених з окремих експлантів, до загальної кількості експлантів, використаних у досліді.

Таблиця 2.1. Склад живильних середовищ, що були використані в роботі

Позначення середовища	Базовий сольовий склад	Сахароза, г/л	Агар-агар, г/л	pH	Регулятори росту, мг/л					Інші компоненти	
					2,4-Д, мг/л	БАП, мг/л	Зеа, мг/л	Кін, мг/л	2-іП, мг/л	AgNO ₃ , мг/л	Ст, мг/л
МСК	МС	30	7	5.7–5.8	1	-	-	-	-	-	-/500
МСІ	1/2 МС	20	-	5.2	-	-	-	-	-	-	-
МСО1	МС	30	7	5.7–5.8	-	4	2	-	-	5	400
МСО2	МС	30	7	5.7–5.8	-	4	-	2	-	5	400
МСО3	МС	30	7	5.7–5.8	-	4	-	-	2	5	400
МСР1	МС	30	7	5.7–5.8	-	3	2	-	-	-	400
МСР2	МС	30	7	5.7–5.8	-	3	-	2	-	-	400
МСР3	МС	30	7	5.7–5.8	-	3	-	-	2	-	400
МСЕ	1/2 МС	20	8	5.7–5.8	-	0,1	-	-	-	-	400
МСВ	1/2 МС	20	8	5.7–5.8	-	-	-	-	-	-	400

2.6. Транз'єнтна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин махорки *N. rustica* L.

Нічну культуру *A. tumefaciens* GV3101, що містила генетичну конструкцію pSPE2053, вирощували, як описано в пп. 2.5. Клітини агробактерій центрифугували та ресуспендували в буфері для інфільтрації (10 мМ MgSO₄, рН 5,6–5,8) з кінцевою оптичною щільністю OD₆₀₀ = 1. Інфільтрацію листків 4-тижневих рослин махорки *N. rustica* L. проводили отриманою суспензією за допомогою шприца [85].

2.7. Молекулярно-генетичний аналіз рослин

Загальну ДНК виділяли методом СТАВ [86] або методом виділення за допомогою силікагелю [87] із листового матеріалу рослин-регенерантів ріпаку *B. napus* L.

Для визначення соматональної варіабельності в культурі *in vitro* ріпаку озимого, виділяли геномну ДНК перенесених у ґрунт рослин та проводили полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами типу ISSR, які дозволяють отримувати декілька різних фрагментів із одного зразка [88]. Реакційна суміш (об'ємом 20 мкл) містила 2 мкл 10-кратного ПЛР-буферу (10X PCR Buffer, "Thermo Fisher Scientific"), 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,5 мкл 10 мМ суміші dNTPs, 0,2 мкл 100 пМ праймера ISSR 2 або ISSR 15, 4 одиниці Taq-полімерази ("Thermo Fisher Scientific"), 100 нг зразка ДНК; об'єм суміші доводили до 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q.

Рослини-регенеранти ріпаку покоління T₀ аналізували на присутність послідовностей генів *gus*, *bar*, CP4 *epsps*, *Cas9*, *gfp* за використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Реакційні суміші включали: специфічні праймери (табл. 2.2), по 2 мкл буфера для ПЛР 10xDreamTaq™

GreenBuffer ("Thermo Fisher Scientific"), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфата ("Thermo Fisher Scientific"), 2 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase ("Thermo Fisher Scientific"), 100 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q.

Загальну РНК виділяли за допомогою GeneJET™ RNA Purification Kit ("Thermo Fisher Scientific") із листкового матеріалу біотехнологічних рослин озимого ріпаку *B. napus* L. першого покоління (T₁). Синтез кДНК здійснювався з використанням набору RevertAid RT Kit ("Thermo Fisher Scientific") згідно інструкцій виробника.

У випадку зворотної транскрипції використовували: 4 мкл 5×Reaction buffer, 1 мкл Random Hexamer primer (0,2 мкг/мкл), 2 мкл 10 мМ dNTP Mix, 0,1 нг – 5 мкг РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки), 0,5 мкл RiboLock RNase inhibitor, 40 од/мкл, 1 мкл RevertAid Reverse transcriptase, 200 од/мкл. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q.

Проводили визначення експресії трансгенів шляхом ПЛР, використовуючи 2 мкл продуктів реакції ЗТ у 20 мкл реакційної суміші та специфічні праймери до кожного з генів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2. Специфічні праймери, використані у ПЛР-аналізі біотехнологічних рослин

№ п/п	Ген	Форвардний праймер	Реверсний праймер	Довжина очікуваного фрагмента, пн
1	<i>gus</i>	5'-ATG-GGT-CAG-TCC-CTT-ATG-TTA-3'	5'-ATA-AAG-ACT-TCG-CGC-TGA-T-3'	239
2	<i>bar</i> (I)	5'-CAG-AAA-CCC-ACG-TCA-TGC-CA-3'	5'-GAG-GCA-CAG-GGC-TTC-AAG-AG-3'	149
3	<i>bar</i> (II)	5'-AAT-CTC-GGT-GAC-GGG-CAG-GA-3'	5'-TAC-ACC-CAC-C TG-CTG-AAG-T-3'	231
4	CP4 <i>epsps</i>	5'-CAG-AAC-TCG-CCG-TGA-AGA-CT-3'	5'-GAA-TCC-GAG-GAG-GTT-TCC-C-3'	197
5	<i>Cas9</i>	5'-TTG-AAG-ACA-AA A-TGA-TGG-ATA-AG A-AGT-ACT-CTA-TCG -GA-3'	5'-TTG-AAG-ACA-AA AA-GCT-CAA-ACC-TTC-CTC-TTC-TTC-TTA-GG-3'	4136
6	<i>gfp</i>	5'-GTG-AGC-AAG-GG C-GAG-GA-3'	5'-TTA-CTT-GTA-CA G-CTC-GTC-CAT-3'	717

Реакції проводили з використанням наступних профілів:

1. ПЛР для визначення наявності соматоклональної мінливості в культурі *in vitro*: початкова денатурація 94°C – 7 хв, 40 циклів – денатурація при 94°C – 45 с, відпал праймерів при 44°C для ISSR 2 або 40°C для ISSR 15 – 45 с, елонгація при 72°C – 2 хв, кінцева елонгація при 72°C – 10 хв

2. ПЛР для визначення трансгену *gus*: початкова денатурація 5 хв при 95°C, 40 циклів – денатурація 40 с при 95°C, ренатурація 40 с при 50°C, елонгація 45 с при 72°C, кінцева елонгація 7 хв при 72°C.

3. ПЛР для визначення трансгену *bar* (I): початкова денатурація 5 хв при 95 °C, 40 циклів – денатурація 30 с при 95 °C, відпал праймерів 30 с при 60°C, елонгація 30 с при 72 °C, кінцева елонгація 7 хв при 72°C.

4. ПЛР для визначення трансгену *bar* (II): початкова денатурація 5 хв при 95 °С, 35 циклів – денатурація 30 с при 95 °С, відпал праймерів 30 с при 58°С, елонгація 1 хв при 72 °С, кінцева елонгація 5 хв при 72°С.

5. ПЛР для визначення наявності гена *CP4 epsps*: початкова денатурація 5 хв при 95 °С, 40 циклів – денатурація 40 с при 95°С, відпал праймерів 40 с при 55 °С, елонгація 45 с при 72 °С, кінцева елонгація 7 хв при 72 °С.

6. ПЛР для визначення наявності гена *Cas9*: початкова денатурація 5 хв при 95 °С, 40 циклів – денатурація 30 с при 95°С, відпал праймерів 30 с при 55 °С, елонгація 4 хв 30 с при 72°С, кінцева елонгація 10 хв при 72 °С.

7. ПЛР для визначення наявності гена *gfp*: початкова денатурація 5 хв при 95°С, 35 циклів – денатурація 30 с при 95°С, відпал праймерів 30 с при 52 °С, елонгація 1 хв при 72°С, кінцева елонгація 5 хв при 72 °С.

Реакції ампліфікації проводили в термоциклерах Gene Cycler Thermal Cycler (Bio-Rad) і T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Продукти ампліфікації розділяли в 1% або 1,5% агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію. До продуктів ампліфікації додавали 2 мкл 6-кратного буферу для нанесення (DNA Loading Buffer, "Thermo Fisher Scientific"). Електрофорез проводили за постійної напруги 110 В протягом 20 хв у 1хTBE. Візуалізацію розділених фрагментів здійснювали за допомогою УФ-фотоілюмінатора (UVP 3UV™ Transilluminator). Гелеві пластини фотографували цифровою фотокамерою. Довжину фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркери (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, GeneRuler 1kb DNA Ladder, "Thermo Fisher Scientific").

2.8. Гістохімічний аналіз активності β -глюкуронідази

Для аналізу стабільної експресії гена *gus* в біотехнологічних рослинах озимого ріпаку *B. napus* L. або транзієнтної експресії в інфільтрованих листових тканинах махорки *N. rustica* L. проводили гістохімічний аналіз експресії гена β -глюкуронідази згідно методики [89] в 100 мМ фосфатному буфері pH 7,0, який містив 1 мМ 5-бромо-4-хлор-3-індоліл- β -D-глюкуронід (X-Gluc). Фрагменти калюсу і органів ріпаку або листків махорки інкубували протягом ночі в 1 мМ розчині X-Gluc з наступним відмиванням від хлорофілу в 70%-му етиловому спирті.

2.9. Аналіз експресії гена CP4 *epsps* в трансгенних рослинах ріпаку

Для детекції білка CP4 EPSPS в трансгенних рослинах ріпаку використовували молекулярний аналіз експресії білків за допомогою іммуно-тест системи QuickStixTM Kit (Immunostrip Dipstick assay). Наявність білка CP4 EPSPS була ідентифікована EnviroLogix^R тест-смужками, яку покрито моноклональними антитілами IgG. Для отримання зразків екстрагованих білків рослинний матеріал розтирали в ступках з дистильованою водою у співвідношенні 1:5. 250 мкл зразка вносили в пробірку та занурювали в неї тест-смужку, покриту антитілами, на 10 хв при кімнатній температурі.

2.10. Генетичний аналіз

Частину насіння озимого ріпаку (T_1), отриманого в результаті самозапилення трансгенних рослин (T_0), стерильно пророщували в умовах термальної кімнати при температурі 24°C на безгормональному середовищі

МС без додавання селективного агента. Верхівки 5–7-добових проростків зі сформованими несправжніми листочками відокремлювали і переносили на середовище із селективним агентом (8 мг/л РРТ або 50 мг/л Км). Через тиждень визначали розщеплення за ознакою стійкості до селективного агента: нестійкі рослини жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння. Відповідність отриманих даних Другому закону Менделя перевіряли за допомогою критерію Пірсона, або критерію "хі-квадрат" (χ^2) [90]:

$$\chi^2 = \sum \frac{(E - O)^2}{O},$$

де Е – експериментально отримана кількість стійкого насіння, О – очікувана кількість стійкого насіння ($\chi_{st} = 3,84$ при $P = 0,05$).

2.11. Фізіологічний тест

Рослини-регенеранти озимого ріпаку лінії *BnI* (T_0), отримані після генетичної трансформації вектором pCB203, а також частину насіння T_1 , отриманого після самозапилення таких рослин, обробляли гербіцидом Баста® (діюча речовина – глюфосинат амонію, 400 г/л) при нормі витрат 2 л/га і витраті робочого розчину 200 л/га (кінцева концентрація глюфосинату амонію – 4 г/л).

Рослини-регенеранти ріпаку (T_0), отримані після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації векторами, що несуть гени стійкості до гербіциду гліфосату (генетичні конструкції pCB133, pCB135 та pSPG2254), а також частину насіння T_1 , обробляли препаратом Раундап® (діюча речовина – гліфосат, 450 г/л) при нормі витрат – 2 л/га і витраті робочого розчину 200 л/га (кінцева концентрація гліфосату – 3,6 г/л).

2.12. Створення генетичних конструкцій

Генетичні конструкції pSPE2053 та pSPE2058 створювали за допомогою методу модульного молекулярного клонування Golden Gate (MoClo) [91; 92].

Для всіх експериментів використовували базові генетичні модулі, що були люб'язно надані Dr. Nicola Patron з MoClo Plant Parts Kit (Addgene kit#1000000047) та Dr. Sylvestre Marillonnet з MoClo Toolkit (Addgene kit#1000000044)" [92; 93; 94].

Процес створення генетичних конструкцій складається з наступних етапів:

1. Вибір елементів (модулів L0 рівня) транскрипційних одиниць [95].
2. Клонування обраних елементів у вектори-акцептори за допомогою методу Golden Gate (вектори L1 рівня).
3. Приготування компетентних клітин *E. coli* Fasta [96].
4. Трансформація компетентних клітин *E. coli* продуктами клонування [97; 98].
5. Екстракція плазмідної ДНК з окремих колоній *E. coli* [99].
6. Клонування векторів L1 рівня у вектор-акцептор за допомогою методу Golden Gate (вектори L2 рівня).
7. Трансформація компетентних клітин *E. coli* продуктами клонування [97; 98].
8. Екстракція плазмідної ДНК з окремих колоній *E. coli* [99].
9. Приготування компетентних клітин *A. tumefaciens* GV 3101 [100].
10. Трансформація створеними векторами компетентних клітин *A. tumefaciens* GV 3101 [100].
11. Детекція гена *Cas9* методом ПЛР у окремих колоній *A. tumefaciens* GV 3101.

Генетичні касети склалися із послідовностей модулів L0 рівня, а саме: промоторів, 5'-послідовностей, що не транскрибуються (5'UTR), кодуєчих послідовностей (*Cas9*, *bar*, β -*gus*, *sgRNA*), термінаторів та векторів-акцепторів [92]. Також конструкції були доповнені модулями, які мають послідовності хлоропластного та ядерного сигнальних пептидів. Послідовності елементів конструкцій (табл.2.3) знаходяться на ресурсі Addgene [95].

Рестрикційні ферменти та лігазу T4 використовували відповідно до статті Engler зі співавт. [93].

Таблиця 2.3. Елементи (модулі L0 рівня), які використовували для створення генетичних конструкцій.

Регуляторний елемент	Позначення	Характеристика
pICH42211	P <i>nos A. tum</i>	промотор гена <i>nos</i> (<i>A. tumefaciens</i>)
pICH44157	P <i>RbcS2B A. th</i>	промотор гена <i>RbcS2B</i> (AT5g38420, <i>A. thaliana</i>)
pICH45089	P <i>d35S CaMV</i>	подвійний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus)
pICSL12006	P <i>CsVMV</i>	промотор + 5'-послідовність, що не транскрибується, вірусу мозаїки жолток маніоки (Cassava Mosaic Virus)
pICH44222	5 Ω CMV1	5'-послідовність, що не транскрибується, з вірусу мозаїки огірка CMV1 (Cucumber Mosaic Virus)
pICH44179	5 Ω <i>RbcS2B A. th</i>	5'-послідовність, що не транскрибується, з гена <i>RbcS2B</i> (AT5g38420, <i>A. thaliana</i>)
pICH78133	5 Ω TMV	5'-послідовність Ω , що не транскрибується, з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus) + хлоропластний транзитний пептид з гена <i>RbcS</i> (синтетичний)
pAGM1479	5 Ω TMV + 6xHIS	5'UTR, Ω (вірус тютюнової мозаїки) + N-кінцевий HIS-тег (6х полігістидин)

Продовження таблиці 2.3

Регуляторний елемент	Позначення	Характеристика
pSPE2049	<i>Cas9 Str. pyog</i>	послідовність гена Cas9 + сигнальний пептид ядерної локалізації
pSPE2050	<i>Cas9 Str. pyog</i>	послідовність гена Cas9 + сигнальний пептид ядерної локалізації
pICH43844	<i>bar S.h</i>	послідовність гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази, <i>bar</i> (<i>S. hygroscopicus</i>) з інтроном, який було виділено з гена <i>act2</i> (<i>A. thaliana</i>)
pICH75111	β - <i>gus E. coli</i>	ген β -глюкуронідази, <i>gus</i> (<i>E. coli</i>) з двома інтронами
pICH72400	T <i>Atug7</i>	термінатор гена <i>Atug7</i> разом з сигналом поліаденілювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється (<i>A. tumefaciens</i>)
pICH41432	T <i>ocs A. tum</i>	термінатор гена <i>ocs</i> разом з сигналом поліаденілювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється (<i>A. tumefaciens</i>)
pICH41414	T 35S CaMV	35S термінатор разом з сигналом поліаденілювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється, з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus)

Для конструювання транскрипційних одиниць вектора pSPE2053 використовували наступні модулі (табл. 2.3): 1) pICH42211, pICH44222, pSPE2049 та pICH72400 (вектор L1 рівня pSPE2050); 2) pICH44157, pICH44179, pICH43844 та pICH41432 (вектор L1 рівня pSPG2051); 3) pICH45089, pICH78133, pICH75111 та pICH41414 (вектор L1 рівня pSPH2052).

Для створення транскрипційних одиниць вектора pSPE2058 використовували модулі (табл. 2.3): 1) pICH45089, pAGM1479, pSPE2050 та pICH72400 (вектор L1 рівня pSPE2054); 2) pICSL12006, pICH43844 та pICH41414 (вектор L1 рівня pSPG2057). Для конструювання векторів з направляючими послідовностями для редагування жирнокислотного складу

ріпаку (вектори L1 рівня pSPE2055 та pSPE2056) дві комплементарно синтезовані оліго-ДНК (Macrogen, Seoul, Rep. of Korea) кожного з двох цільових сайтів гена десатурази жирних кислот FAD2_Aa, Aa1 (5'-attggtcctcttctgattgtcaa-3'; 5'-aaacttgacaatcagaagaggaac-3') та Aa2 (5'-attggaccatcgaggcaactcct-3'; 5'-aaacaggagttgcctcgatggtc-3'), відпалювали протягом 5 хв при температурі 95°C. Дволанцюгові послідовності ДНК клонували у вектор-акцептор pUC19_AtU6oligo по сайтах рестрикції BbsI [70]. Фрагменти ДНК, що несуть інформацію про гідові РНК, скеффолд-послідовності та промотор AtU6 синтезували за допомогою ПЛР з використанням полімерази точного синтезу q5 та виділяли з агарозного гелю.

Реакційна суміш для створення транскрипційних одиниць першого рівня включала: по 100 нг кожної клонованої послідовності та 100 нг вектору першого рівня, 1,5 мкл 10-кратного лігазного буфера ("Thermo Fisher Scientific"), 0,15 мкл 10 мг/мл стоку BSA (бичачий сироватковий альбумін), 2 одиниці рестриктази *BsaI*, 3 одиниці лігази T4 та доводили до кінцевого об'єму 15 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Реакційну суміш інкубували в термостаті при 37°C протягом 3 год. Інактивацію здійснювали 5 хв при 50°C і 5 хв при 80°C.

Транскрипційні одиниці першого рівня (pSPE2050, pSPG2051, pSPE2052, pSPE2054, pSPE2055, pSPE2056, pSPG2057) трансформували в компетентні клітини *E. coli* Fasta методом heat-shock [97; 98] та відбирали позитивні колонії методом біло-блакитної селекції [86], оскільки вектори-акцептори першого рівня містять ген-репортер (*lacZ*) фермента β -галактозидази, який розщеплює β -глікозидний зв'язок дисахариду лактози та її похідних, а також мають стійкість до антибіотика карбеліциліну.

Для створення мультигенних конструкцій використовували вектори першого рівня зі створеними транскрипційними одиницями, які клонували

у вектори-акцептори другого рівня (вектори L2 рівня) із кольоровою селекцією Cred та стійкістю до канаміцину.

Для створення генетичних конструкцій pSPE2053 та pSPE2058 реакційна суміш включала: по 100 нг кожної клонованої транскрипційної одиниці у векторах першого рівня та 100 нг вектора другого рівня, 1,5 мкл 10-кратного лігазного буфера ("Thermo Fisher Scientific"), 0,15 мкл 10 мг/мл стоку BSA, 2 одиниці рестриктази *BpiI*, 3 одиниці лігази T4 та доводили до кінцевого об'єму 15 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Реакційну суміш інкубували в термостаті при 37°C протягом 3 год. Інактивацію здійснювали 5 хв при 50°C і 5 хв при 80°C.

Рекомбінантну плазмідну ДНК трансформували як у штам *E. coli* Fasta, так і в штам *A. tumefaciens* GV3101.

Для детекції гена *Cas9* та підтвердження успішності створення генетичних конструкцій проводили скринінг окремих колоній *A. tumefaciens* GV3101. ПЛР зі специфічними праймерами до гена *Cas9* (табл. 2.2) та розділення продуктів ампліфікації проводили як описано в пп. 2.7. В якості негативного контролю використовували деіонізовану воду Milli-Q замість ДНК. В якості позитивного контролю використовували плазмідну ДНК з наявним в її складі геном *Cas9*.

2.13. Статистичний аналіз результатів

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою Microsoft Office Excel. Для підтвердження достовірності результатів описані дослідження проводили тричі. Статистичну достовірність відмінностей між отриманими даними оцінювали за допомогою критерію Стюдента. Розраховували найменшу істотну різницю (HIP), $P \leq 0,05$.

Висновки до розділу 2

Запропоновано модифіковані методики регенерації, яровизації та генетичної трансформації озимого ріпаку, які є економічно вигідними та забезпечують високу ефективність отримання біотехнологічних рослин. Створено ефективну платформу для редагування геному озимого ріпаку.

Описано методики введення рослин озимого ріпаку в культуру *in vitro*, генетичної трансформації, індукції калюсогенезу, органогенезу, регенерації та адаптації біотехнологічних рослин до умов *in vivo*. Вказані умови, в яких здійснювали молекулярно-біологічні, гістохімічні, імуноферментні, генетичні та фізіологічні аналізи. Описаний метод модульного молекулярного клонування Golden Gate.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора: [79], [80], [81], [82], [83], [101], [102], [103], [104], [105], [106].

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ЕФЕКТИВНОЇ СИСТЕМИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ *IN VITRO* ОЗИМОГО РІПАКУ *B. NAPUS* L. ЛІНІЇ *Bn1*

3.1. Підбір умов регенерації *in vitro* озимого ріпаку лінії *Bn1*

В якості експлантів ми використовували сегменти гіпокотилів, розміром 0,5–1 см, отримані з 6-денних проростків ріпаку [80]. Сім'ядолі відокремлювали таким чином, щоб забезпечити відсутність меристеми у експланті. Калюс утворювався в місцях порізів на третю добу культивування на середовищі МСК (табл. 2.1).

Через два тижні після індукції калюсогенезу на живильному середовищі МСК, експланти озимого ріпаку лінії *Bn1* поміщали на середовище МСО1, МСО2 або МСО3 для формування адвентивних бруньок. Виявлено, що експланти утворювали морфогенні осередки з однаковою частотою на усіх живильних середовищах (МСО1–3). При культивуванні експлантів озимого ріпаку на регенераційних живильних середовищах (МСР1, МСР2, МСР3), спостерігали відмінності в частоті утворення органів.

Дану методику відпрацьовували, орієнтуючись на дослідження Rahnama та Sheykhhasan [24], де в якості цитокінінів використовували БАП та Зеа, а частота трансформації становила 20,2%. На відміну від Rahnama та Sheykhhasan, крім Зеа ми використали Кін та 2-іП, в результаті чого було встановлено, що частота регенерації пагонів озимого ріпаку лінії *Bn1* була найвищою на середовищі, доповненому 2 мг/л 2-іП (рис. 3.1, рис. 3.2), і становила $48,45\% \pm 2,80\%$ в порівнянні з $36,60\% \pm 4,52\%$ такої на середовищі, доповненому 2 мг/л Зеа.

Найнижчою частота регенерації пагонів була на живильному середовищі, доповненому 2 мг/л Кін ($21,61\% \pm 7,37\%$) (рис. 3.1).

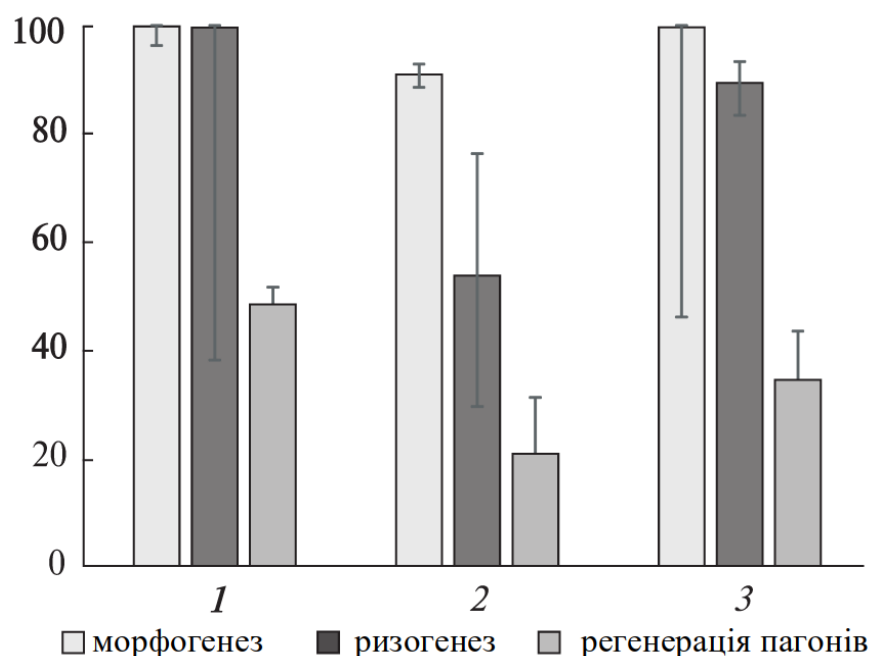


Рис. 3.1. Частота регенерації озимого ріпаку на живильному середовищі МСР, доповненому 3 мг/л БАП, 400 мг/л Ст та 2 мг/л цитокініну:

1 – 2-іП (МСР3); 2 – Кін (МСР2); 3 – Зеа (МСР1).

Примітка: $P < 0,05$.

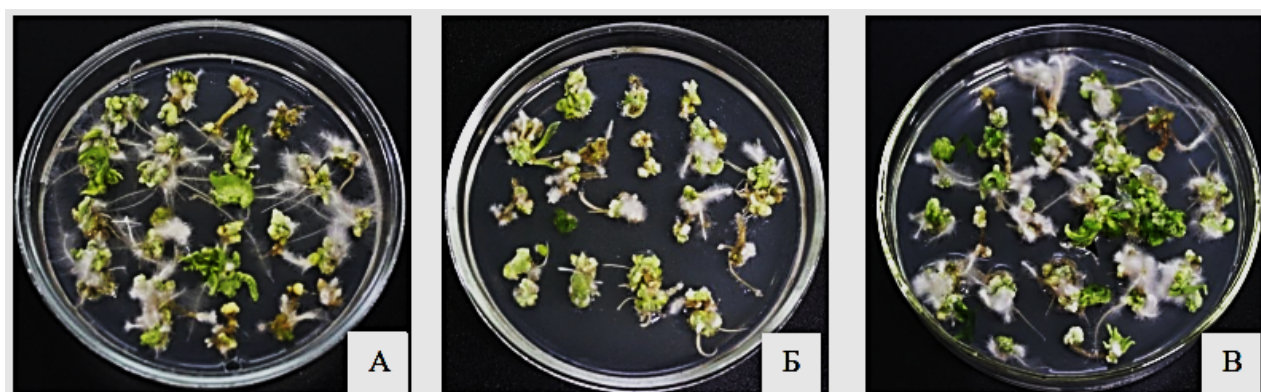


Рис. 3.2. Експланти озимого ріпаку на 2-й тиждень культивування на регенераційному живильному середовищі МСР, доповненому 3 мг/л БАП, 400 мг/л Ст та 2 мг/л цитокініну:

А – Зеа (МСР1); Б – Кін (МСР2); В – 2-іП (МСР3).

В дослідженнях Mashayekhi et al. частота регенерації комерційної лінії ріпаку Licord становила 15,26% при культивуванні гіпокотилів на живильному середовищі, доповненому 4 мг/л БАП та 2 мг/л Зеа [23].

При тривалому культивуванні на середовищах МСР2 та МСР3 іноді спостерігали вітрифікацію регенованих органів, що є частою проблемою при роботі з культурою тканин *in vitro* [35]. Вітрифікації вдалось позбутися при пасажуванні на середовище для елонгації пагонів МСЕ. З огляду на це, для індукції органогенезу та регенерації озимого ріпаку більш ефективним та економічно вигідним є використання середовищ МСО3 та МСР3.

За методикою [24] сформовані регенеранти одразу пересаджували на живильне середовище для вкорінення, у якому вміст макро- і мікросолей було зменшено вдвічі, доповнене 5 мг/л ІМК. Однак, нами було виявлено, що така кількість ауксину є критичною і призводить до некрозу тканин ріпаку озимого лінії *Vnl*. Крім того, для формування повноцінних пагонів, ми додали етап елонгації на живильному середовищі, доповненому 0,1 мг/л БАП (МСЕ). Це дозволило отримати повноцінні рослини-регенеранти озимого ріпаку та їх клони.

Для регенерації ріпаку шляхом органогенезу іноді використовують сім'ядолі [22; 25; 27] і фрагменти листя [20; 30]. Показано, що використання листових експлантів для регенерації і трансформації ярого ріпаку має ряд переваг і забезпечує ефективність трансформації до 70–85% [30]. Проте, в наших експериментах частота регенерації з таких експлантів була дуже низькою (до 10%), а процес культивування триваліший і складніший, ніж запропонований у нашому дослідженні. Натомість, при використанні гіпокотилів в якості експлантів для регенерації ярого ріпаку, констатували частоту регенерації на рівні 50–80% [19; 21]. При трансформації калюсних культур, отриманих з гіпокотилів комерційних ліній ріпаку частота регенерації на селективному живильному

середовищі становила від 15,26% [23] до 36,4% [29]. Але на сьогоднішній день ще не була розроблена система регенерації для озимого ріпаку комерційних ліній, яка включала б етап яровизації та отримання насіння нового покоління.

Для вкорінення рослини пересаджували на живильне середовище МС з половинним вмістом солей, доповнене 0,1 мг/л ІМК або 0,1 мг/л НОК. Але екзогенні регулятори росту пригнічували розвиток сформованих регенерантів (рис. 3.3), тому рослини були пересаджені на безгормональне живильне середовище (МСВ). Таким чином, всі рослини піддавали спонтанному ризогенезу та відмічали 100%-ве вкорінення.



Рис. 3.3. Рослини-регенеранти ріпаку озимого лінії *Bn1* на безгормональному живильному середовищі МСВ (А) та на живильному середовищі МС, доповненому 0,1 мг/л НОК (Б).

3.2. Адаптація рослин-регенерантів ріпаку лінії *Bn1* до умов *in vivo* та отримання насіння T_0

Після формування кореневої системи на живильному середовищі МСВ (рис. 3.4 А) рослини-регенеранти озимого ріпаку пересаджували в торф'яний субстрат, створювали вологий мікроклімат і вирощували в умовах теплиці при температурі 24°C та 16-ти годинному фотоперіоді протягом 4-х тижнів для їх адаптації (рис. 3.4 Б).

Далі рослини озимого ріпаку (рис. 3.4 В) яровизували за [107–109] – поміщали до яровизаційної камери та вирощували за короткого світлового дня (8 годин) при температурі 4°C протягом 8 тижнів (рис. 3.4 Г). Успішну яровизацію відмічали за збільшенням міжвузлової відстані у пагонів ріпаку. За таких умов вдалося досягти $83,93\% \pm 5,33\%$ бутонізації та цвітіння рослин (рис. 3.4 Д, Е). З яровизованих рослин було отримане насіння (рис. 3.4 Ж).

Експерименти, проведені на модельному виді *Arabidopsis thaliana* показали, що затримка цвітіння озимих форм обумовлена наявністю у них домінантних генів *FRI* та *FLC* [110; 111]. Ген *FLC* кодує білок, що діє як сильний інгібітор цвітіння, пригнічуючи дію генів-активаторів цвітіння. Роль гена *FRI* полягає у підвищенні експресії *FLC* [111; 112].

У ріпаку були знайдені гомологи *FRI* та *FLC*: гени *BnFRI* та *BnFLC* [113; 114]. В результаті яровизації відбувається зниження рівня транскрипції генів *FRI*, *FLC* та індукція цвітіння [115].

У дослідженні [107] показано, що частота бутонізації та цвітіння починає збільшуватися після 6 тижнів яровизації ріпаку озимого сорту Северянин і досягає 87,5% після 8-тижневої яровизації рослин за умов короткого світлового дня.



Рис. 3.4. Схема отримання насіння ріпаку озимого лінії *Bn1*:

- А – рослина-регенерант на живильному середовищі МСВ;
 Б – адаптація до ґрунтових умов; В – кінець адаптаційного періоду;
 Г – яровизація в клімат-камері; Д – бутонізація яровизованої рослини;
 Е – ізоляція та самозапилення; Ж – насіння покоління F_0 .

Після адаптації до умов теплиці отримані рослини-регенеранти ріпаку озимого (рис. 3.4 В) мали нормальну морфологію вегетативних та генеративних органів (рис. 3.4 Д). Отримане біотехнологічне насіння T_0 (рис. 3.4 Ж) також відповідало характеристикам інтактного насіння лінії ріпаку *Bn1*.

3.3. Визначення соматоклональної варіабельності в культурі *in vitro* озимого ріпаку лінії *Bn1*

Незважаючи на те, що соматоклональна варіабельність може бути джерелом бажаних ознак (які потім намагаються закріпити в геномі рослини), для трансформації або подальшого культивування в умовах *in vitro* частіше обирають регенеранти, у яких такого явища не спостерігається. В нашій роботі такі зміни є недопустимими, оскільки використовувалась комерційна лінія із важливими сільськогосподарськими ознаками, тому будь-яка соматоклональна варіабельність знижує цінність батьківського генотипу.

В селекційних програмах рослин роду *Brassica* використовують різноманітні маркерні системи, такі як: ізоферменти, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів ДНК (RFLP) [116], довільно ампліфіковану поліморфну ДНК (RAPD) [117], олігонуклеотидний фінгерпринтинг, поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP) [118], прості повторювані послідовності (мікросателіти, SSR) та поліморфізм одиничних нуклеотидів (SNP) [119].

Серед молекулярних маркерів найзручнішими для виявлення генетичної мінливості є мікросателітні тандемні повтори. Це простий і швидкий метод, який поєднує більшість переваг SSR та AFLP з універсальністю RAPD, і використовує праймери, специфічні до мікросателітів в реакції ПЛР для ампліфікації ISSR (inter simple sequence

repeats) послідовностей різного розміру. Маркери ISSR дуже поліморфні і корисні в дослідженнях генетичного різноманіття, філогенезу, мічення генів, картування геному та еволюційної біології. [120].

У нашій роботі для визначення соматональної варіабельності в культурі *in vitro* ріпаку озимого лінії *Bn1* були використані праймери ISSR 2 та ISSR 15, які застосовувались у дослідженнях поліморфізму рослин *Brassica* sp. [121].

Результати ПЛР з використанням ISSR 2 та ISSR 15 маркерів показали, що культивування рослин-регенерантів протягом двох місяців на обраному нами регенераційному живильному середовищі МСР3 з подальшим пасажуванням на МСЕ та МСВ не призводить до утворення соматоклонів у озимого ріпаку (рис. 3.5, 3.6), оскільки довжини отриманих фрагментів не відрізняються у контролю (рис. 3.5 та рис. 3.6, доріжка К2) та регенерантів (рис. 3.5 та рис. 3.6, доріжки 1-9).

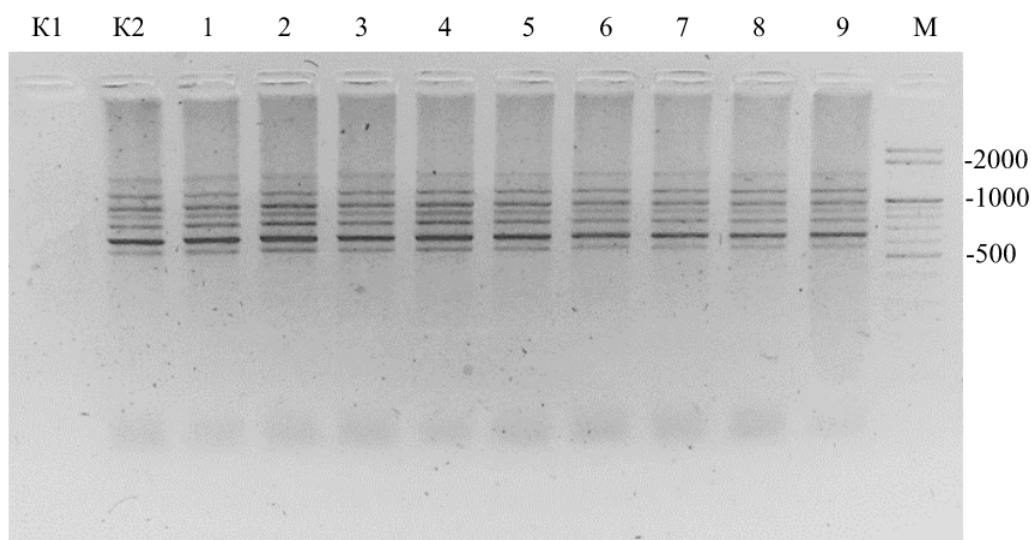


Рис. 3.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням маркера ISSR 2: Доріжки 1–9 – досліджувані зразки озимого ріпаку лінії *Bn1*, отриманого на регенераційному живильному середовищі МСР3; *K*₁ – негативний контроль (Milli-Q); *K*₂ – позитивний контроль – ДНК інтактної рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*; *M* – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ("Thermo Fisher Scientific").

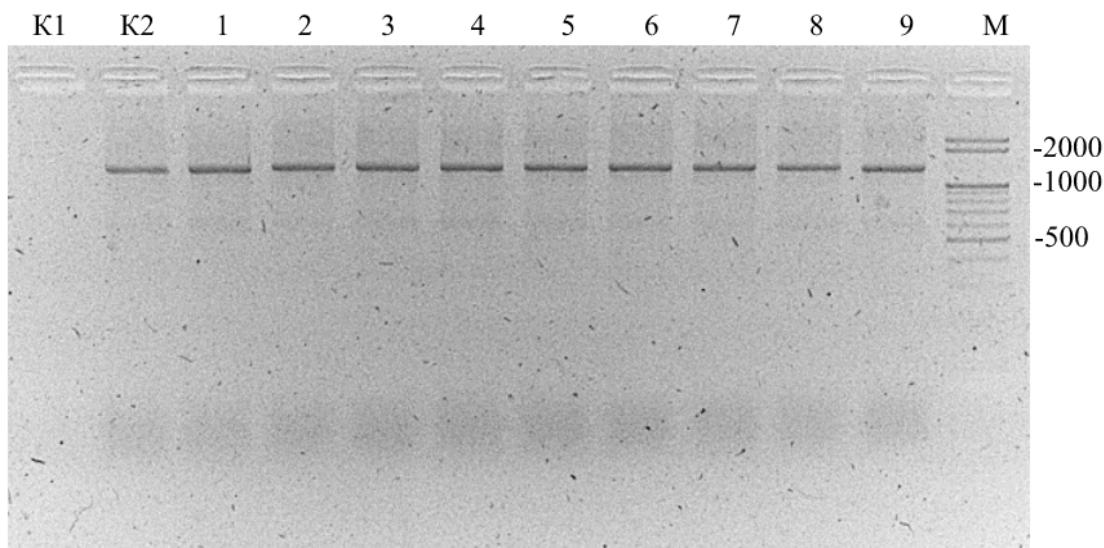


Рис. 3.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням маркера ISSR 15: Доріжки 1–9 – досліджувані зразки озимого ріпаку лінії *Bn1*, отриманого на регенераційному живильному середовищі МСР3; K_1 – негативний контроль (Milli-Q); K_2 – позитивний контроль – ДНК інтактної рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*; M – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ("Thermo Fisher Scientific").

В роботі Mahjoob et al. [121] при використанні 13-ти молекулярних маркерів типу ISSR для 35-ти генотипів *Brassica* (*B. napus*, *B. juncea*, *B. rapa*, *B. nigra*) було показано, що ампліфіковані фрагменти мали довжини від 2500 до 500 пн, що корелює з даними, отриманими в нашому дослідженні (рис. 3.5, 3.6). Під час проведення експерименту контрольні та дослідні рослини знаходилися в однаковій фазі розвитку.

Таким чином, при використанні молекулярних маркерів типу ISSR генетичних змін у рослинному матеріалі ріпаку озимого лінії *Bn1* не виявлено, що може свідчити на користь застосування даної методики у подальших біотехнологічних дослідженнях *in vitro*.

3.4. Підбір умов генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* української селекції [81]

В якості експлантів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовували 3-добовий калюс, отриманий з гіпокотилів 6-денних проростків озимого ріпаку лінії *Bn1*. Для індукції органогенезу, регенерації пагонів та отримання насіння ми використовували модифіковану нами методику, описану вище [80]. Для оптимізації умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовували генетичну конструкцію pCB203, поміщену в штам *A. tumefaciens* GV3101.

Зазвичай в експериментах із генетичної трансформації гіпокотилів комерційних сортів ріпаку використовують агробактеріальну суспензію з оптичною щільністю при довжині хвилі 600 нм (OD_{600}) від 0,2 [19], 0,4 [21], 0,5 [29] до 0,8 [23] та 1 [49]. Раніше також повідомлялося, що збільшення щільності бактеріальних клітин призводить до зниження відновлювального потенціалу клітин рослини, що зменшує ефективність стабільної трансформації [122].

Для визначення оптимальної щільності бактеріальних клітин нами були використані такі значення OD_{600} : 0,2, 0,5 та 1. Тривалість інокуляції становила 10, 30 та 60 хв. Контрольною вважали частоту регенерації експлантів озимого ріпаку лінії *Bn1* без інокуляції та селекції.

В ході нашого дослідження було встановлено, що для інокуляції експлантів ріпаку оптимальною є оптична щільність бактерій $OD_{600} = 0,5$, оскільки частота регенерації після трансформації суттєво знижується при $OD_{600} = 0,2$ та $OD_{600} = 1$. Крім того, при $OD_{600} = 1$ збільшується частота агробактеріальної контамінації та утворення некротів після культивування (рис. 3.7).

Максимальна частота регенерації експлантів ($25,02\% \pm 4,59\%$) після трансформації спостерігалась при тривалості інокулювання тканин 10 хв.

Збільшення часу інокулювання сприяло значному некрозу та контамінації тканин, внаслідок чого процес отримання рослин-регенерантів ускладнювався (рис. 3.8).

Тривалість ко-культивування експлантів з клітинами *Agrobacterium* може варіювати від 1 до 5 днів, але здебільшого становить 48-72 год. Збільшення часу ко-культивування (понад 5 діб) може призводити до надмірного розвитку агробактерій, пригнічення регенерації трансформантів і подальшої загибелі експлантів [123]. Нами експериментально встановлено, що більш доцільною є тривалість ко-культивування експлантів ріпаку озимого лінії *Bn1* з клітинами агробактерій на середовищі МСК протягом 48 год, порівняно з 72 год, оскільки після цього стає складніше усунути бактеріальну контамінацію та отримати рослини-регенеранти.

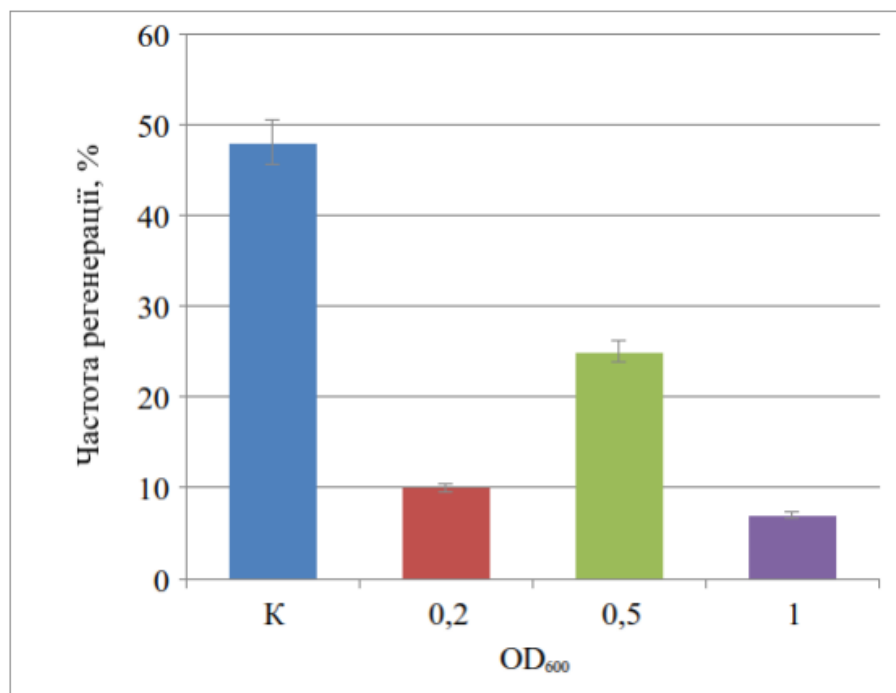


Рис. 3.7. Залежність частоти регенерації озимого ріпаку лінії *Bn1* на селективному живильному середовищі МСР3 від оптичної щільності бактеріальної суспензії OD при довжині хвилі світла 600 нм (при тривалості інокулювання 10 хв); К – контроль.

Примітка: $P < 0,05$.

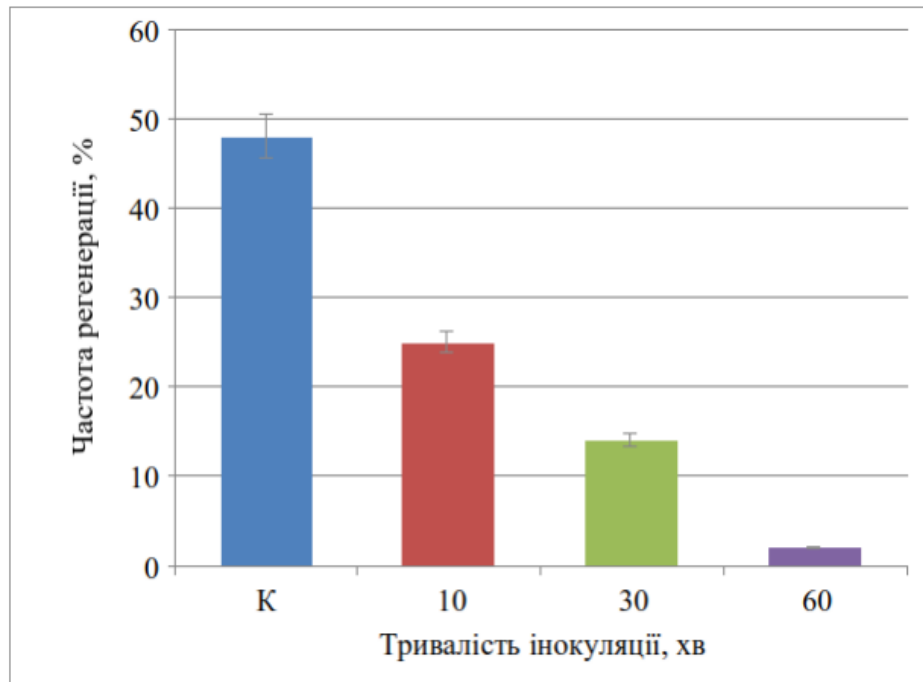


Рис. 3.8. Залежність частоти регенерації озимого ріпаку лінії *Bn1* на селективному живильному середовищі МСР3 від тривалості інокуляції (при оптичній щільності бактеріальної суспензії $OD_{600} = 0,5$); К – контроль.

Примітка: $P < 0,05$.

Часто для підвищення частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в інокуляційне середовище додають ацетосирингон (50–200 мкМ) – синтетичну фенольну сполуку, що активує гени вірулентності *A. tumefaciens* [21; 24; 29]. Нами встановлено, що додавання ацетосирингону в інокуляційне середовище є недоцільним, оскільки спричиняє некроз тканин та знижує частоту регенерації озимого ріпаку лінії *Bn1* на 20%.

Крім того, індукторами перенесення Т-ДНК можуть бути специфічні умови середовища, наприклад: низьке значення рН (5,0–5,8) за температури не вище 32°C [124]. Так, рановий сік рослин містить компоненти цитоплазми, вакуолей і речовини, необхідні для відновлення клітин чи формування лігніфікованих чи суберинізованих клітинних стінок; рН ранового соку – 5,0–6,0. Тому інфікування рослин агробактеріями є найбільш успішним в місцях контакту з рановими поверхнями. З огляду

на це, рН середовища для інокуляції експлантів ріпаку (МСІ) дещо нижче, ніж в інших живильних середовищах і становить 5,2 (табл. 2.1).

При *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації гіпокотилів ріпаку сорту SLM046 вектором, що містить ген *bar* та ген стійкості до шкідників *CryIAb*, для відбору трансформованих клітин використовували регенераційне живильне середовище, доповнене 8 мг/л фосфінотрицину, а для вкорінення кількість агента зменшували до 3 мг/л [24]. При цьому частота трансформації ріпаку за генами *bar* та *CryIAb* становила 20,2%.

В нашому дослідженні ступінчата селекція з підвищенням концентрації з 5 мг/л РРТ в середовищі МСОЗ до 8 мг/л в регенераційному живильному середовищі МСРЗ дозволила відібрати максимальну кількість трансгенних рослин та відкинути хибно-позитивні варіанти. Для того, щоб рослини утворювали корені, концентрацію РРТ зменшували до 3 мг/л у середовищах МСЕ та МСВ.

Гістохімічний аналіз GUS-активності показав експресію β -глюкуронідази у рослин-регенерантів та дорослих фертильних рослин озимого ріпаку лінії *Bn1* (рис. 3.9).

ПЛР за геном *gus* підтвердила наявність трансгену у 20 з 22 рослин ріпаку. Таким чином, частота трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* за геном *gus* становила $22,75\% \pm 2,28\%$ (рис. 3.10).

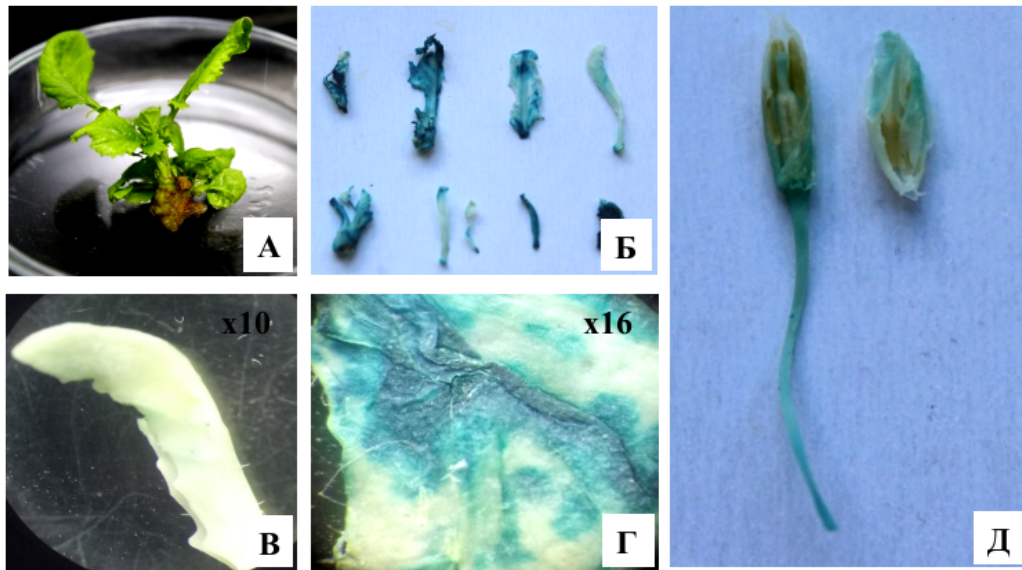


Рис. 3.9. Гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази в рослинних тканинах: А – рослина-регенерант озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1*, отримана після генетичної трансформації за допомогою конструкції pCB203; Б, Г, Д – експресія β -глюкуронідази в листках та бутонах ріпаку, трансформованого з використанням генетичної конструкції pCB203; В – негативний контроль (*B. napus*).

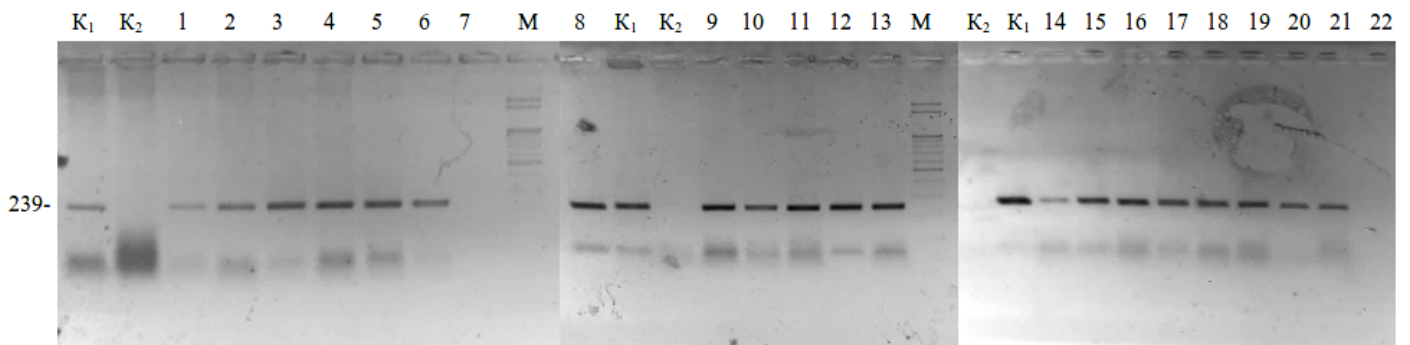


Рис. 3.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *gus*: Доріжки 1–22 – досліджувані зразки; K₁ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pCB203; K₂ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку лінії *Bn1*; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Всі отримані рослини-регенеранти (T_0) озимого ріпаку лінії *Bn1* після вкорінення на середовищі МСВ висаджували в торф'яну суміш, адаптували до умов *in vivo* та обробляли гербіцидом Баста® при нормі витрат 2 л/га. Рослини, що вижили після обробки, яровизували за [80]. Із яровизованих рослин отримали насіння (рис. 3.11), частину якого пророщували на живильному середовищі МС, доповненому 8 мг/л РРТ, а частину висівали в ґрунт та обробляли гербіцидом Баста®.

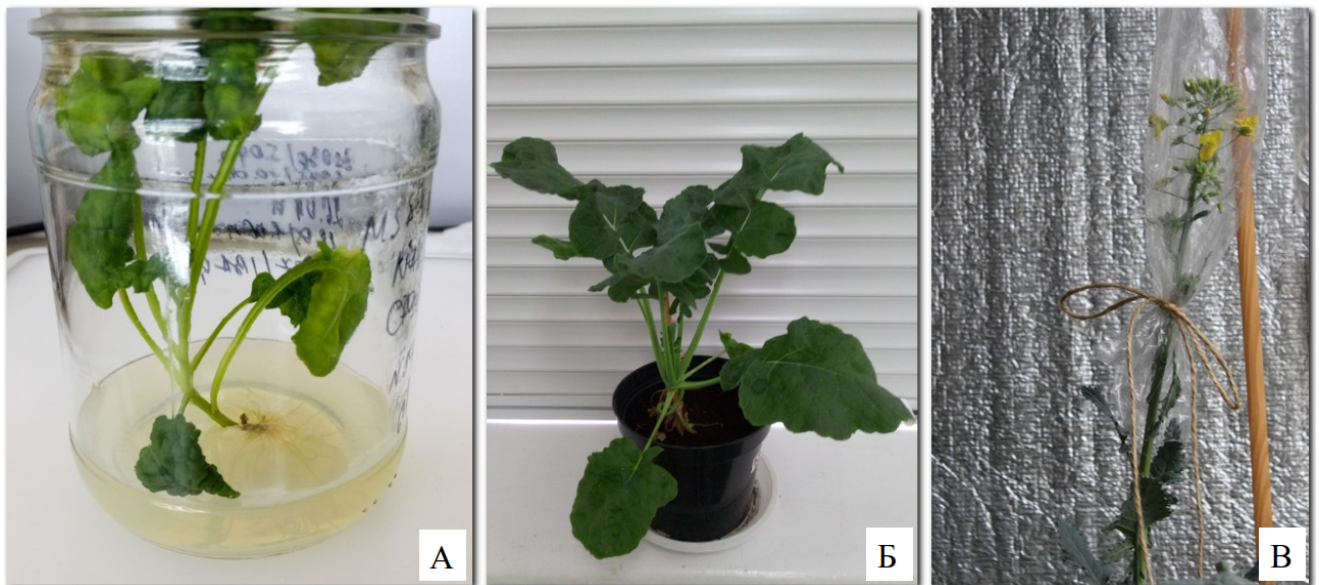


Рис. 3.11. Отримання трансгенного насіння озимого ріпаку лінії *Bn1* після трансформації вектором pCB203: А – вкорінення рослин-регенерантів на живильному середовищі МСВ; Б – адаптація рослин до умов *in vivo*; В – ізоляція бутонів після яровизації для отримання насіння.

Результати генетичного та фізіологічного (рис. 3.12) тестів показали наявність розщеплення 3:1 у першому поколінні (T_1) трансгенних рослин озимого ріпаку за ознакою стійкості до РРТ та гербіциду Баста®.

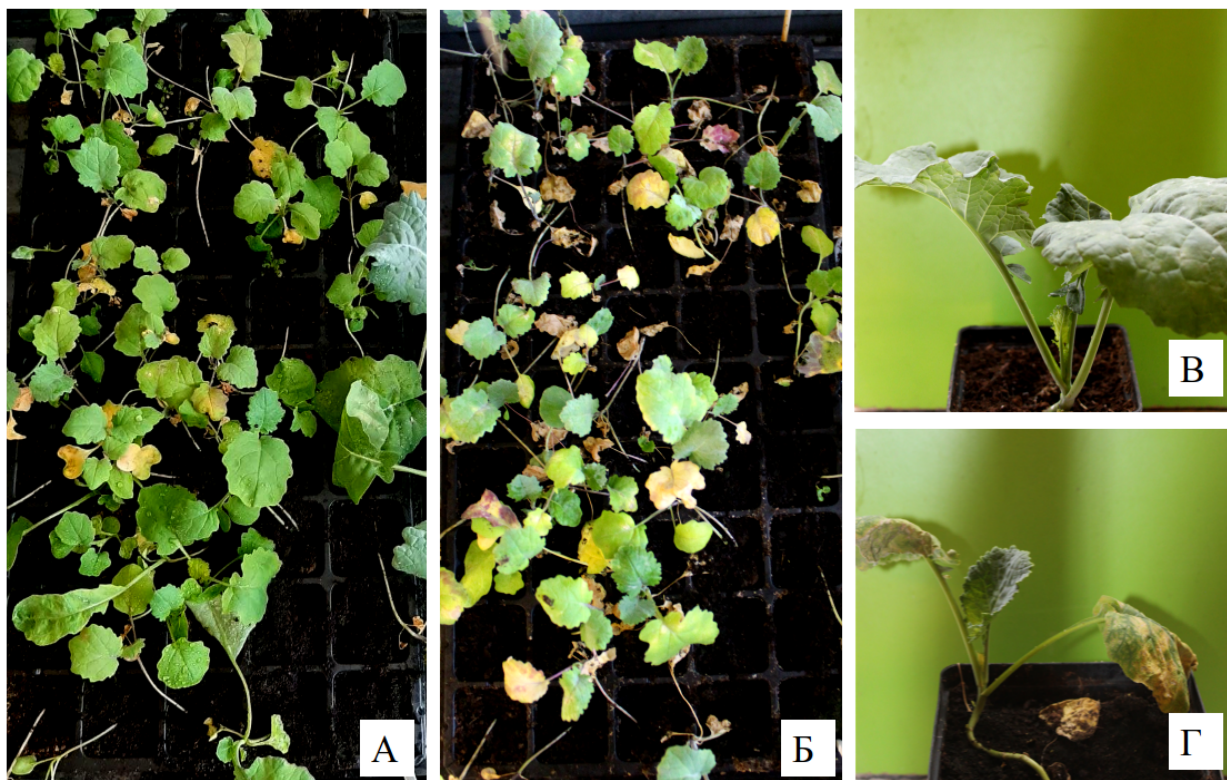


Рис. 3.12. Рослини ріпаку озимого T_1 до (А, В) та після (Б, Г) обробки гербіцидом Баста®:

А, Б – трансгенні рослини, отримані після самозапилення T_0 ;

В, Г – контроль (інтактні рослини ріпаку озимого лінії *BnI*)

В результаті проведених експериментів нами була оптимізована схема отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку від введення в культуру *in vitro* до отримання насіння T_0 (рис. 3.13).

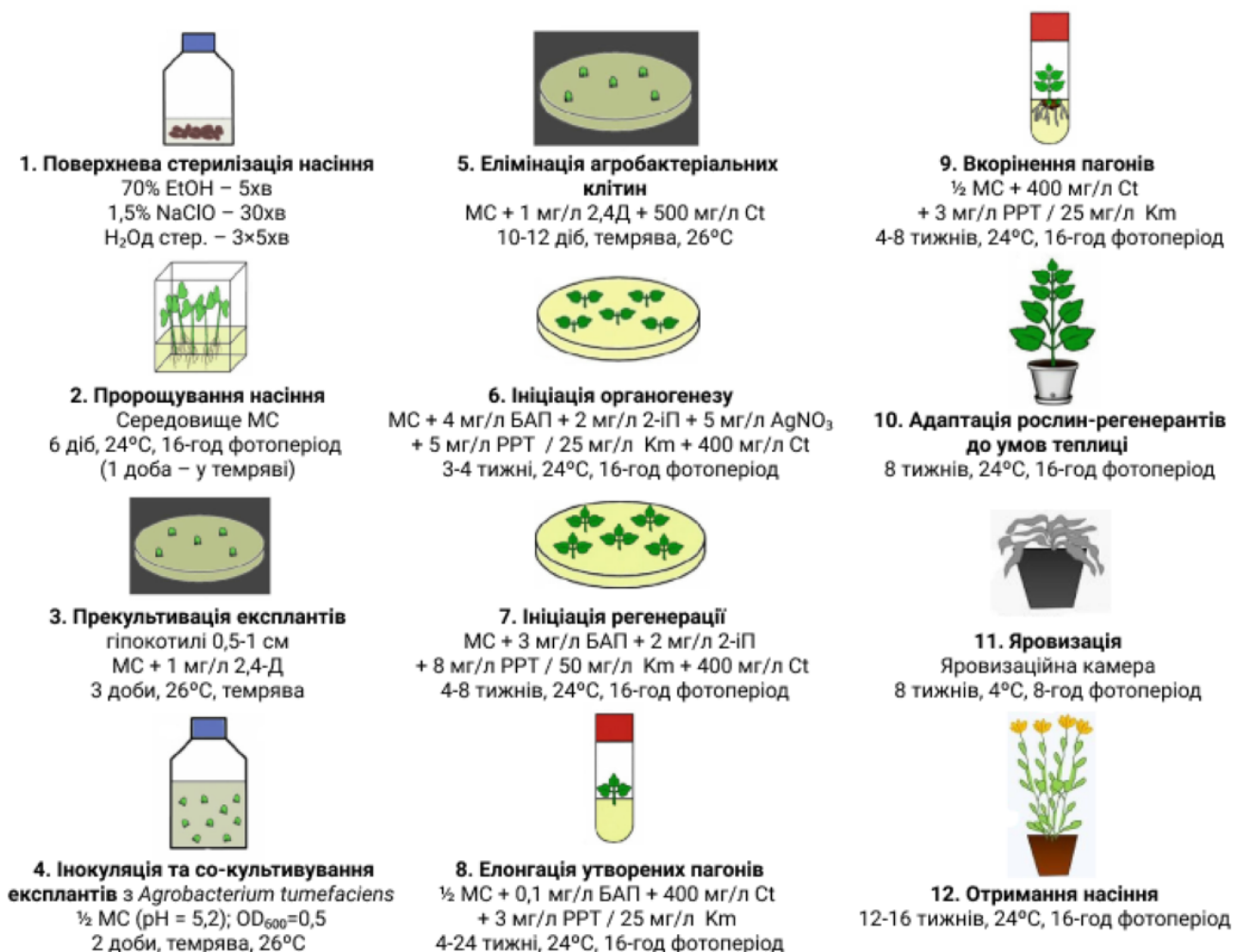


Рис. 3.13 Схеми експерименту "від насіння до насіння"

Використання гіпокотилів у якості експлантів має ряд переваг: висока здатність до регенерації, можливість отримати кілька експлантів із одного проростка (до 10 при використанні гіпокодилів і лише 2 – для сім'ядоль) та простота маніпуляцій *in vitro* [31; 44].

Частота генетичної трансформації гіпокотилів ріпаку варіює в різних джерелах: 6,5–13,16% [49], 17,38% [72], 24% [29], 13,4–54,2% [19]. У дослідженні [23] для 8-ми сортів ріпаку частота трансформації гіпокотилів за геном *gus* становила від 0,2–1,04% до 10,30–15,26%. Таким чином, утворення рослин-регенерантів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ріпаку залежить від багатьох факторів, зокрема визначальними є генотип рослини та її сприйнятливість до трансформації,

про що повідомлялося раніше. Нездатність до трансформації може бути обумовлена стійкістю певних сортів ріпаку до хвороб та патогенів [44].

Важливим чинником для успішної генетичної трансформації ріпаку також може бути штам агробактерії. Порівняно зі штамми *A. tumefaciens* C58C1 та EHA105, для штаму GV3101 відмічали найбільшу ефективність трансформації – 7,2–31,3% [44] та 13,4–54,2% [19]. Крім того, в роботі [21] при використанні штаму LBA4404 відмічали ефективність трансформації гіпокотилів озимого ріпаку сортів Wester, Con-1 та Rasola на рівні 45–75%.

Селекція трансгенних тканин на живильному середовищі за допомогою генів стійкості до антибіотиків також є важливим фактором для підвищення ефективності генетичної трансформації ріпаку [125]. Ефективний відбір залежить від виду антибіотика та його концентрації. Зазвичай, у дослідженнях з однаковою частотою використовуються гени стійкості до неоміцину (канаміцину) – *nptII*, гігromіцину – *hptII*, та фосфінотрицину – *bar (pat)* [31; 44]. Ген *bar (pat)* також надає трансгенним рослинам стійкості до гербіциду Баста[®], тому може виступати в якості і селективного, і цільового гена. Крім селективних, у генетичних конструкціях також використовуються репортерні гени, які забезпечують специфічний фенотип трансгенних рослин і дозволяють швидко їх детектувати. Важливими прикладами репортерних генів є β -глюкуронідаза – *gus* [21; 126], хлорамфенікол ацетилтрансфераза – *cat* [127], ген зеленого флуоресцентного білка – *gfp* [128; 129] та ген люциферази – *luc* [46].

Частота генетичної трансформації гіпокотилів ріпаку лінії *BnI* (22,75% $\pm$ 2,28%) знаходиться на досить високому рівні, що дозволяє судити про достатню ефективність методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, запропонованої у нашому дослідженні.

Висновки до розділу 3

Оптимізована нами система регенерації є економічною, (вимагає використання невеликої кількості доступних регуляторів росту) і ефективною (забезпечує високу частоту регенерації та отримання насіння нульового покоління вже через рік після початку експериментів). Крім того, морфологічних і генетичних змін у рослинному матеріалі не виявлено при використанні молекулярних маркерів типу ISSR, тому дану методику можна використовувати в подальших біотехнологічних дослідженнях озимого ріпаку зі збереженням цінного генотипу.

Також нами запропоновано протокол для *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку, в якому були модифіковані наступні параметри: оптична щільність бактеріальної суспензії для інокуляції рослин має становити $OD_{600} = 0,5$, а тривалість інокулювання – 10 хв. В наших експериментах додавання ацетосирингону чинило негативний ефект на частоту регенерації ріпаку. За результатами ПЛР частота трансформації лінії *Bn1* за геном *gus* становить $22,75\% \pm 2,28\%$. З яровизованих рослин отримане насіння, яке морфологічно не відрізняється від інтактного, а генетичне розщеплення у першому поколінні трансгенних рослин T_1 становить 3:1. Таким чином, дану методику можна використовувати для отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку та проведення подальших досліджень.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора: [80], [81], [101], [102].

РОЗДІЛ 4

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОГО РІПАКУ *B. NAPUS* L. ЛІНІЇ *Bn1*

4.1. Створення трансгенних рослин озимого ріпаку, стійких до гербіциду гліфосату

Комплексні програми боротьби з бур'янами з використанням класичних та хімічних методів успішно ведуться протягом багатьох десятиліть. Однак, зі збільшенням масштабів сільськогосподарського виробництва існує потреба в хімічних гербіцидах широкого спектру дії та подальшій розробці культур, стійких до дії таких гербіцидів [130]. Гліфосат є діючою речовиною найбільш широко використовуваних і важливих гербіцидів у світі, оскільки він ефективний, економічний і екологічно доброякісний.

Для створення стійких до гліфосату рослин ми використовували запропоновану нами методику генетичної трансформації озимого ріпаку [81]. В роботі були використані генетичні конструкції pCB133, pCB135 та pSPG2254.

В дослідженнях [23; 24] із генетичної трансформації гіпокотилів комерційних ліній ріпаку застосовували ступінчасту селекцію зі збільшенням концентрації PPT в середовищі для регенерації до 8 мг/л, а концентрацію Km збільшували до 200 мг/л [51]. В нашому дослідженні ступінчата селекція з підвищенням концентрації селективних агентів в регенераційному живильному середовищі MCR3 дозволила відібрати максимальну кількість трансгенних рослин та відкинути хибно-позитивні варіанти (рис. 4.1) [82]. Для того, щоб трансгенні рослини утворювали

корені, концентрацію PPT / Km зменшували до 3 мг/л або 25 мг/л відповідно у середовищі для елонгації (MCE) та вкорінення пагонів (MCB).

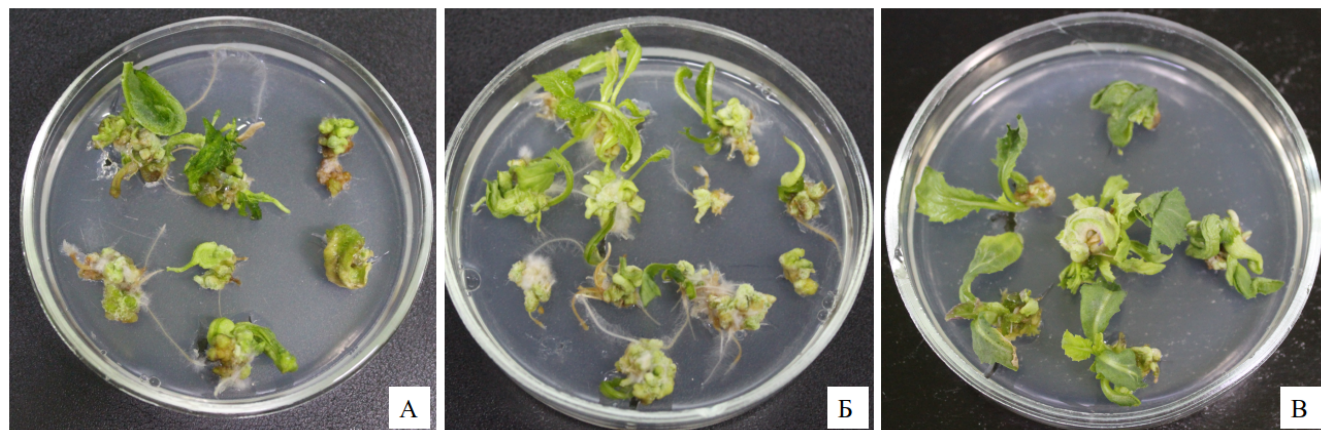


Рис. 4.1. Експланти озимого ріпаку лінії *Bn1* на 4-й тиждень культивування на регенераційному живильному середовищі MCR3, доповненому 50 мг/л Km (А) або 8 мг/л PPT (Б, В) після трансформації генетичними конструкціями:

А – pCB135; Б – pCB133; В – pSPG2254.

Крім того, в попередніх дослідженнях нами було показано, що для відбору *in vitro* біотехнологічних рослин ріпаку, стійких до дії гербіциду гліфосату, можна також використовувати живильне середовище МС, доповнене 0,1 мМ гербіциду. В регенераційному середовищі кількість гліфосату слід збільшувати до 0,5 мМ [79].

ПЛР аналіз за геном CP4 *epsps* підтвердив наявність трансгену в 11 з 12 рослин-регенерантів ріпаку, отриманих після трансформації за допомогою вектора pCB135 (рис. 4.2).

В результаті ПЛР аналізу 7-ми ліній озимого ріпаку, отриманих після генетичної трансформації за допомогою конструкції pCB133, було підтверджено наявність інтеграції трансгену *bar* у 6 рослин-регенерантів (рис. 4.3).

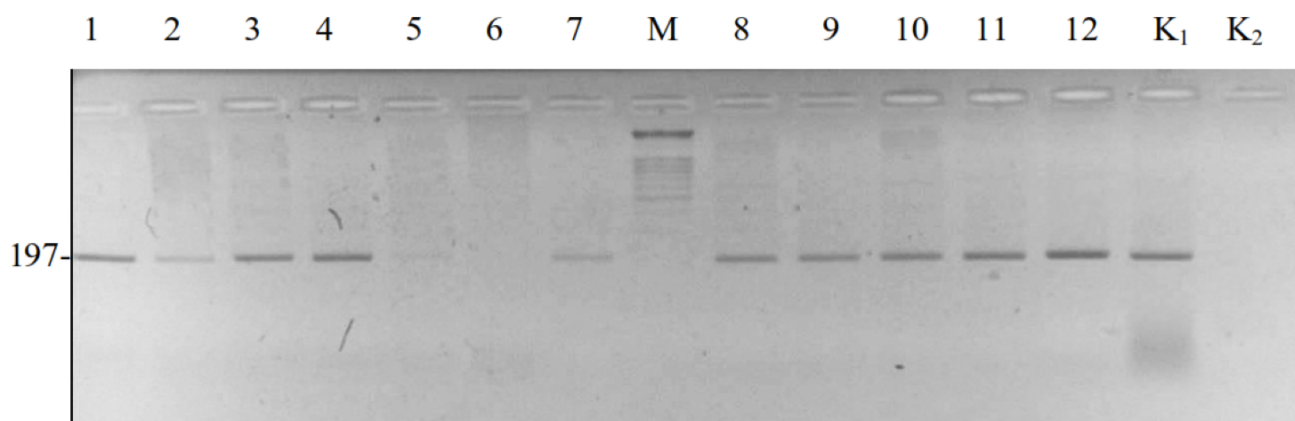


Рис. 4.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *CP4 epsps*: Доріжки 1–12 – досліджувані зразки; K₁ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pCB135; K₂ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку лінії *BnI*; M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

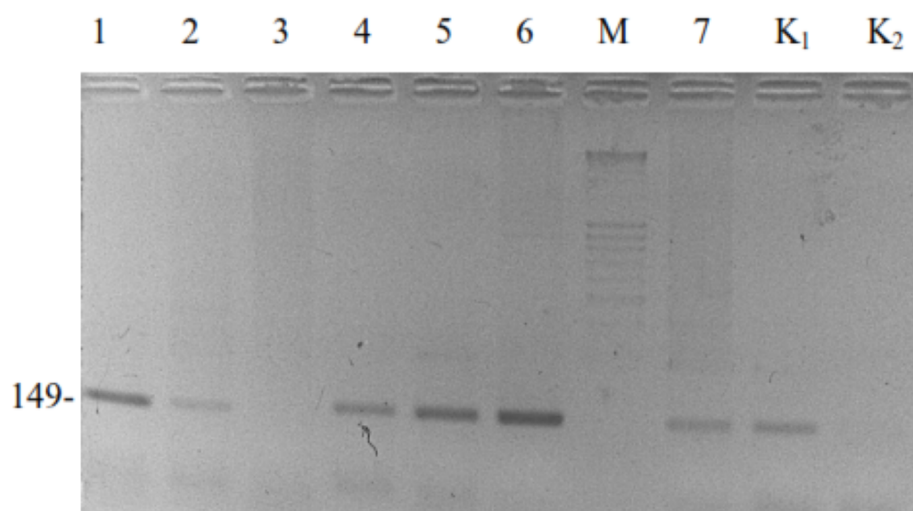


Рис. 4.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*: Доріжки 1–7 – досліджувані зразки; K₁ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pCB133; K₂ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку лінії *BnI*; M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Трансгенні рослини озимого ріпаку T₀, отримані після генетичної трансформації вектором pSPG2254, перевіряли за допомогою ПЛР на присутність гена *gfp*. Інтеграцію трансгена було підтверджено у 9 з 12 незалежних ліній озимого ріпаку (рис. 4.4) [106].

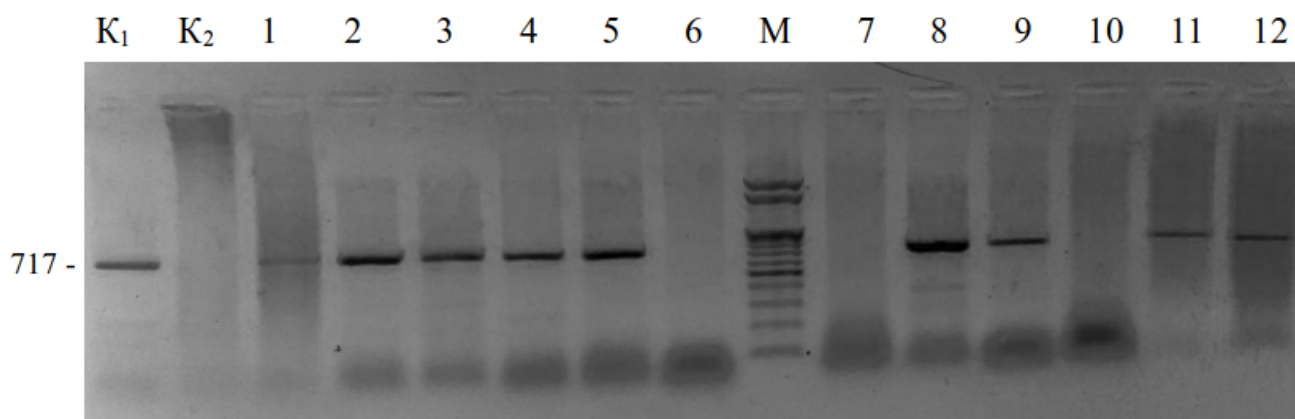


Рис. 4.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *gfp*:

Доріжки 1–12 – досліджувані зразки; K₁ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pSPG2254; K₂ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку лінії *BnI*; M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

В жодному із випадків на доріжках зразків негативного контролю не спостерігали синтезу фрагментів очікуваних розмірів, тоді як у позитивному контролі детектували наявність фрагментів розміром 197 (рис. 4.2), 149 (рис. 4.3) та 717 пн (рис. 4.4).

Гістохімічний аналіз показав експресію β -глюкуронідази в тканинах рослин-регенерантів озимого ріпаку після трансформації вектором pSPG2254 (рис. 4.5).

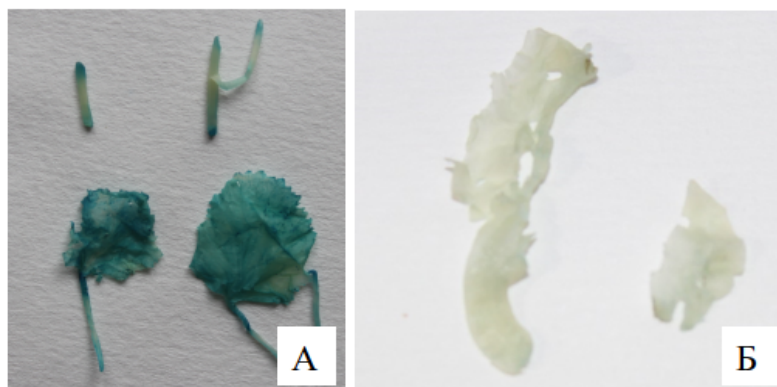


Рис. 4.5. Гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази в рослинних тканинах озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *BnI*:

А – рослина-регенерант, отримана після генетичної трансформації за допомогою конструкції pSPG2254; Б – негативний контроль.

Всі отримані рослини-регенеранти (T_0) озимого ріпаку лінії *BnI* після вкорінення на середовищі МСВ висаджували в торф'яну суміш та адаптували до умов теплиці. Через чотири тижні проводили обробку гербіцидом Раундап® (діюча речовина – гліфосат, 450 г/л) із розрахунку 200 л/га. Рослини, які вижили після обробки, яровизували за [80]. З яровизованих рослин отримали насіння, яке морфологічно не відрізнялось від інтактного (рис. 4.6).



Рис. 4.6. Стручки з насінням покоління T_0 , отримані після яровизації трансгенних рослин озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *BnI*

Наявність білка CP4 EPSPS в ПЛР-позитивних зразках озимого ріпаку перевіряли за допомогою імунотест-системи тест-смужками, покритими моноклональними антитілами. Поява смужки на тест-системі вказує на наявність специфічного білка CP4 EPSPS, як показано на рис. 4.7. За допомогою імунотест-системи QuickStix™ Kit було підтверджено результати попередніх ПЛР-аналізів: наявність білка CP4 EPSPS детектовано у 11 рослин-регенерантів озимого ріпаку, отриманих після генетичної трансформації конструкцією pCB135, та у 6 рослин – після трансформації генетичною конструкцією pCB133.

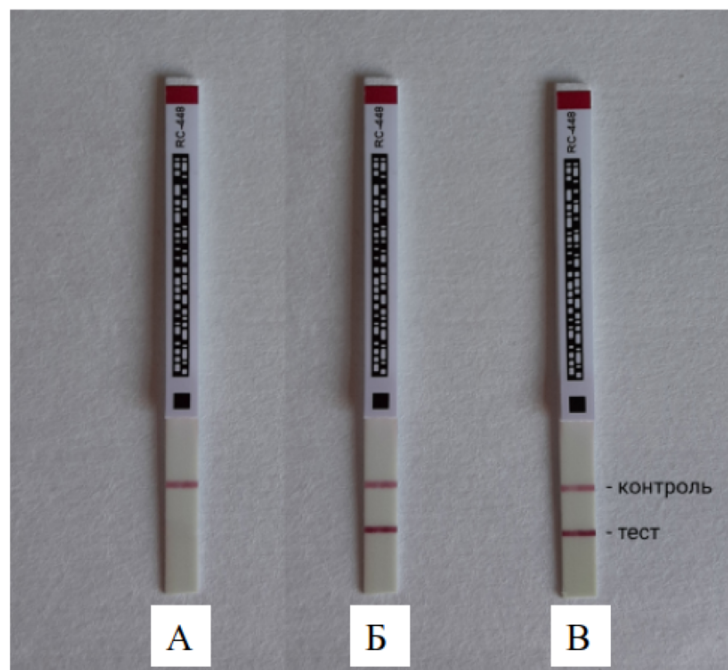


Рис. 4.7. Результати аналізу експресії білка CP4 EPSPS в трансгенних рослинах ріпаку T₀ за допомогою імунотест-системи QuickStix™ Kit: А – контроль; Б – CP4 EPSPS смужка водного екстракту рослини, трансформованої конструкцією pCB135; В – CP4 EPSPS смужка водного екстракту рослини, трансформованої конструкцією pCB133.

В роботі [24] за допомогою імунотест-системи Bt-Cry1Ab / 1Ac Immuno-strip (Adgia Inc., USA) детектували наявність рекомбінантного білка Cry1Ab у 21 з 23 ПЛР-позитивних рослин ріпаку. Таким чином, частота

трансформації за імуноферментним аналізом становила 18,4% [24]. Такий результат можна пояснити тим, що при вбудовуванні трансгена не завжди відбувається його експресія внаслідок замовчування або позиційного ефекту. В нашій роботі імунотест-систему QuickStix™ Kit для детекції білка CP4 EPSPS використовували після обробки рослин гербіцидом Раундап®, тому спостерігали позитивний результат для усіх досліджуваних зразків.

4.2. Аналіз біотехнологічних рослин ріпаку озимого покоління T₁

Отримане після яровизації насіння з біотехнологічних рослин озимого ріпаку стерильно пророщували на живильному середовищі МС. Верхівки 5–7-денних проростків стерильно відрізали та висаджували на живильне середовище МС, доповнене селективним агентом: 8 мг/л PPT для ліній, отриманих за допомогою конструкцій pCB133 і pSPG2254, та 50 мг/л Km – для ліній, отриманих за допомогою генетичної конструкції pCB135. Через тиждень визначали розщеплення за ознакою стійкості до селективного агента – PPT або Km (табл. 4.1): нестійкі рослини жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння.

У всіх рослин, крім ліній T₁Bn/133/8 та T₁Bn/2254/64 спостерігали розщеплення за ознакою стійкості до селективного антибіотика 3:1 (табл. 4.1). Значення критерію відповідності χ^2 для лінії T₁Bn/133/8 та T₁Bn/2254/64 значно виходить за межі табличного $\chi^2_{st} = 3,84$, що можна пояснити недостатньою кількістю насіння в досліді або низькою експресією відповідного трансгена.

Таблиця 4.1. Генетичний аналіз біотехнологічних рослин ріпаку озимого, отриманих з насіння T₀

Лінія	Схожість насіння <i>in vitro</i> , %	Кількість насіння, шт.		Розщеплення	χ^2 *
		PPT+	PPT-		
T ₁ Bn/133/3	91	65	26	3:1	0,16
T ₁ Bn/133/7	98	61	37	3:1	2,13
T ₁ Bn/133/8	98	19	30	-	40,41
T ₁ Bn/2254/64	99	42	23	-	10,56
T ₁ Bn/2254/238	98	68	23	3:1	0,01
		Km+	Km-		
T ₁ Bn/135/1	76	61	15	3:1	0,28
T ₁ Bn/135/3	90	72	18	3:1	0,30
T ₁ Bn/135/4	100	59	41	3:1	3,41
T ₁ Bn/135/6	80	48	32	3:1	2,40
T ₁ Bn/135/10	90	63	27	3:1	0,30
T ₁ Bn/135/14	95	72	23	3:1	0,01
T ₁ Bn/135/20	83	56	27	3:1	0,63
Bn1 (контроль)	100	0	0	-	-

Примітка. * – $\chi^2_{st} = 3,84$ при P = 0,05

Крім того, частину насіння висівали в ґрунт в умовах теплиці та проводили обробку гербіцидом Раундап® (рис.4.8). Фізіологічний тест *in vivo* підтвердив результати генетичного аналізу *in vitro* та показав наявність розщеплення у першому поколінні (T₁) трансгенних рослин 3:1 за ознакою стійкості до гліфосату.

Отримані за допомогою вектора pSPG2254 трансгенні рослини ріпаку T₁, які вижили після обробки гліфосатом, аналізували на присутність гена *bar* на рівні РНК. Інтеграцію трансгена було підтверджено в усіх досліджуваних рослинах ріпаку озимого, отриманих після самозапилення T₀ та обробки гербіцидом. Результати ПЛР із продуктами реакції ЗТ за геном *bar* наведені на рисунку 4.9 [106].

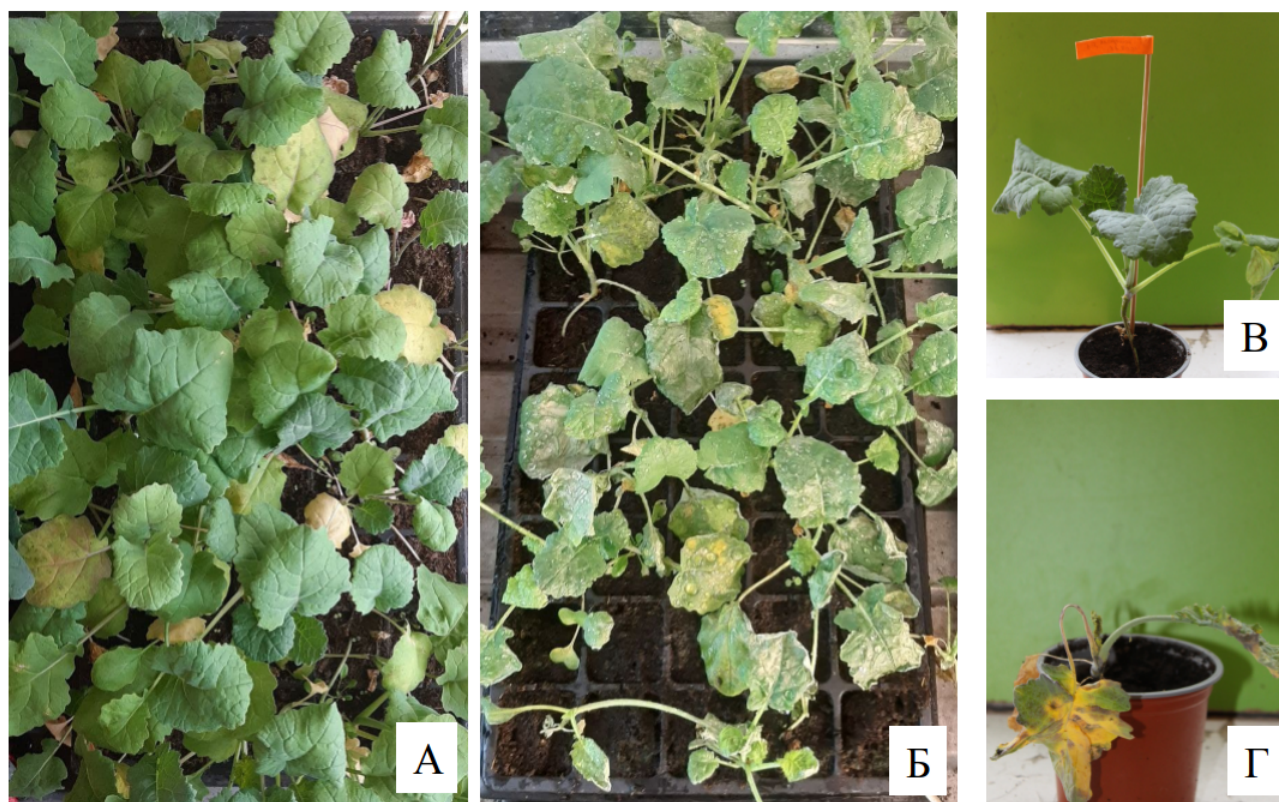


Рис. 4.8. Рослини ріпаку озимого T_1 до (А, В) та після (Б, Г) обробки гербіцидом Раундап®:

А, Б – трансгенні рослини, отримані після самозапилення T_0 ;

В, Г – контроль (інтактні рослини ріпаку озимого лінії *BnI*).

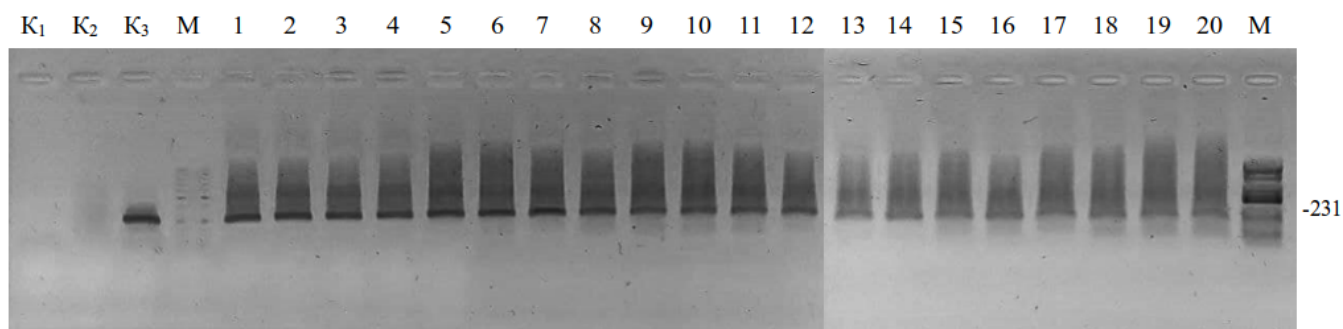


Рис. 4.9. Електрофореграма результатів ПЛР із продуктами реакції ЗТ за геном *bar*: Доріжки 1–20 – досліджувані зразки;

K_1 – негативний контроль – Milli-Q; K_2 – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку озимого лінії *BnI*; K_3 – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pSPG2254;

М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Трансгенні рослини ріпаку озимого T₁, отримані на основі векторів pCB133 та pCB135, після обробки гербіцидом Раундап® перевіряли на наявність білка CP4 EPSPS за допомогою імунотест-системи QuickStix™ Kit. Наявність білка CP4 EPSPS було підтверджено в усіх рослинах, що вижили після обробки гербіцидом.

Культури, стійкі до дії гербіциду гліфосату, були створені ще у 90-х рр. минулого століття з використанням нечутливого до гліфосату гена *epsps*, виділеного з бактерій *Agrobacterium* sp. штам CP4 [131; 132]. Так, у 1996 році з'явилась комерційно доступна генетично модифікована RR соя *Glycine max*, а в 1998 – RR кукурудза *Zea mays*. Патент на RR ріпак *B. napus* був зареєстрований компанією Monsanto Technology LLC у 2000 році [133]. Трансформаційна подія у ріпаку PV-BNGT04(RT73) була отримана за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації та містила два цільових гени – толерантності та стійкості до гліфосату – CP4 *epsps* і *gox*.

Співробітниками ІКБГІ НАНУ за допомогою генетичної конструкції pCB133 також були отримані біотехнологічні рослини ріпаку на основі ярих промислових сортів Ексголд, Титан та Обрій [134]. Ці рослини одночасно перевіряли на стійкість до двох гербіцидів – Баста® та Раундап®, в результаті чого на основі сорту Ексголд відібрали шість гомозиготних ліній ріпаку, стійких до гербіциду гліфосату. Крім того, за допомогою одночасного використання конструкцій pCB133 та pBISN-desC::*licBM3* на основі сорту Обрій були створені трансгенні рослини, які містили чотири гетерологічні гени: два селективні (*nptII* і *bar*) та два цільові (CP4 *epsps* та *desC::*licBM3**) [52]. При цьому частота регенерації ріпаку із листових дисків становила приблизно 8–9%, а частота трансформації сорту Калинівський за допомогою конструкції pICH3744 досягала 86,3±1,2% [134]. Проте, в останній роботі частоту трансформації ріпаку обчислювали як співвідношення ПЛР-позитивних рослин до

кількості рослин-регенерантів, отриманих на селективному середовищі; тобто ці значення коректніше розглядати як ефективність трансформації, а не частоту. Таким чином, у нашому дослідженні ефективність трансформації гіпокотилів озимого ріпаку за геном *gus* становить 90,9%.

В дослідженні Kahrizi et al. для отримання толерантних до гліфосату рослин ріпаку *B. napus* сорту PF7045/91 було використано генетичну конструкцію pBI121, що містила мутантний ген *epsps* з *E. coli* K12 [135]. Оскільки амінокислотні залишки гліцину 96 та аланіну 183 відіграють важливу роль у зв'язуванні гліфосату, автори за допомогою сайт-специфічного мутагенезу отримали наступні точкові мутації в гені *epsps* *E. coli* K12: заміна гліцину 96 на аланін та заміна аланіну 183 на треонін. Показано, що трансгенні рослини ріпаку були стійкими до гліфосату за обробки розчином концентрацією 10 мМ, що еквівалентно 1,69 г/л гербіциду. В нашій роботі для обробки біотехнологічних рослин ріпаку використовували розчин гербіциду Раундап[®], який містив 3,6 г/л гліфосату.

Крім того, було показано, що подвійна мутація в гені *epsps* з *E. coli* (заміна триптофану 97 на ізолейцин, проліну 101 – на серин) спричиняє конформаційні зміни, необхідні для отримання каталітично ефективного гена *epsps*, що забезпечить стійкість до гліфосату у кукурудзи *Z. mays* [136].

У роботі Achary et al. було показано, що надмірна експресія мутантного гена *epsps* рису *Oryza sativa* *TIPS-OsEPSPS* під контролем убіквітинового промотора кукурудзи (*ZmUbi*) призвела до високої толерантності до гліфосату (за трикратної обробки від рекомендованої дози). Більше того, показано, що EPSPS відіграє роль у підвищенні врожайності рису, а стійкі до гліфосату біотехнологічні рослини *O. sativa* продукували на 17–19% більше зерен порівняно з диким типом [137].

Висновки до розділу 4

В результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133 та pCB135, Т-ДНК яких містить ген CP4 *epsps*, котрий забезпечує стійкість рослин до гербіциду гліфосату, а також конструкцією pSPG2254, яка несе мутантний ген *Bn epsps*, було отримано трансгенні рослини озимого ріпаку. Встановлено, що в першому поколінні (T₁), отриманому в результаті самозапилення біотехнологічних рослин озимого ріпаку (T₀), спостерігається генетичне розщеплення 3:1 за ознакою стійкості до гербіциду гліфосату. Трансгенне насіння не відрізняється від інтактного за морфологічними ознаками. Наявність білка CP4 EPSPS в трансгенних рослинах ріпаку доведена за допомогою імуно-тест системи. Також показано, що мутантний ген *Bn epsps*, який входить до складу конструкції pSPG2254, забезпечує стійкість трансгенних рослин озимого ріпаку до гліфосату на такому ж рівні, як і ген CP4 *epsps* з *A. tumefaciens* CP4, що входить до складу конструкцій pCB133 та pCB135.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора: [79], [82], [103], [106].

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ПЛАТФОРМИ ДЛЯ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ ОЗИМОГО РІПАКУ *B. NAPUS* L.

5.1. Створення генетичної конструкції, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9

Для створення генетичної конструкції ми використовували метод молекулярного клонування Golden Gate, що базується на використанні рестриктаз IIS типу та ДНК-лігази з фагу T4.

На першому етапі генетичні елементи конструкції (модулі L0 рівня) перевіряли рестрикційним аналізом. Всі модулі клонували у вектор-акцептор (вектор L1 рівня) для створення транскрипційних одиниць. Вектор L1 рівня містить ген *lacZ*, який кодує фермент β -галактозидазу, що розщеплює дисахарид лактозу на глюкозу та галактозу, для біло-блакитного скринінгу бактерій.

В результаті нами було клоновано три генетичні конструкції першого рівня – pSPE2050, pSPR2051 та pSPH2052, які містили окремі транскрипційні одиниці для експресії гена бактеріального білка Cas9 під контролем промотора гена *nos* та термінатора гена *Atug7*; гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar* під контролем промотора гена *RbcS2B* та термінатора гена *ocs* та гена β -глюкуронідази *gus* під контролем подвійного 35S промотора CaMV та 35S термінатора CaMV (рис. 5.1). Біло-блакитний скринінг дозволив швидко детектувати колонії з ймовірно позитивним результатом (рис. 5.2 Б). Створені конструкції перевіряли за допомогою ПЛР та рестрикційного аналізу (рис. 5.2 А).

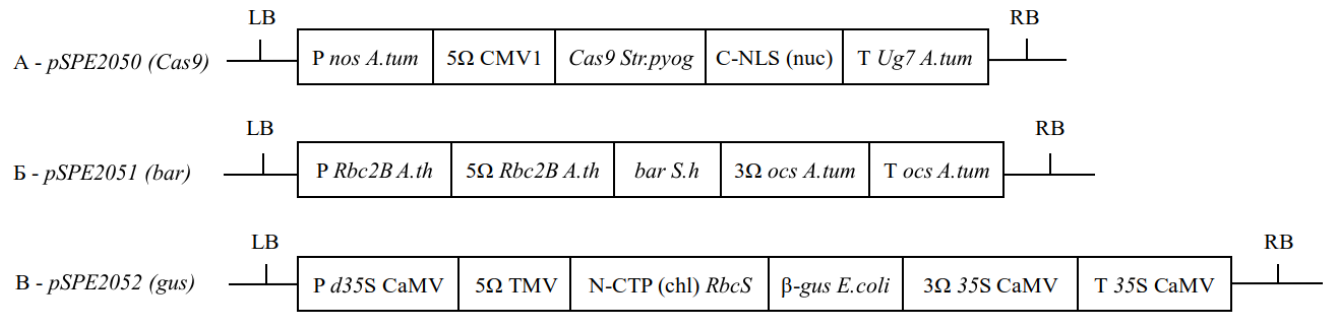


Рис. 5.1. Схематичне зображення Т-ДНК створених векторів першого рівня:

А – вектор pSPE2050 з геном бактеріального білка Cas9 під контролем промотора гена *nos* та термінатора гена *Atug7*; Б – вектор pSPG2051 з геном фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) під контролем промотора гена *RbcS2B* та термінатора гена *ocs*; В – вектор pSPH2052 з геном β -глюкуронідази (*gus*) під контролем подвійного 35S промотора CaMV та 35S термінатора CaMV.

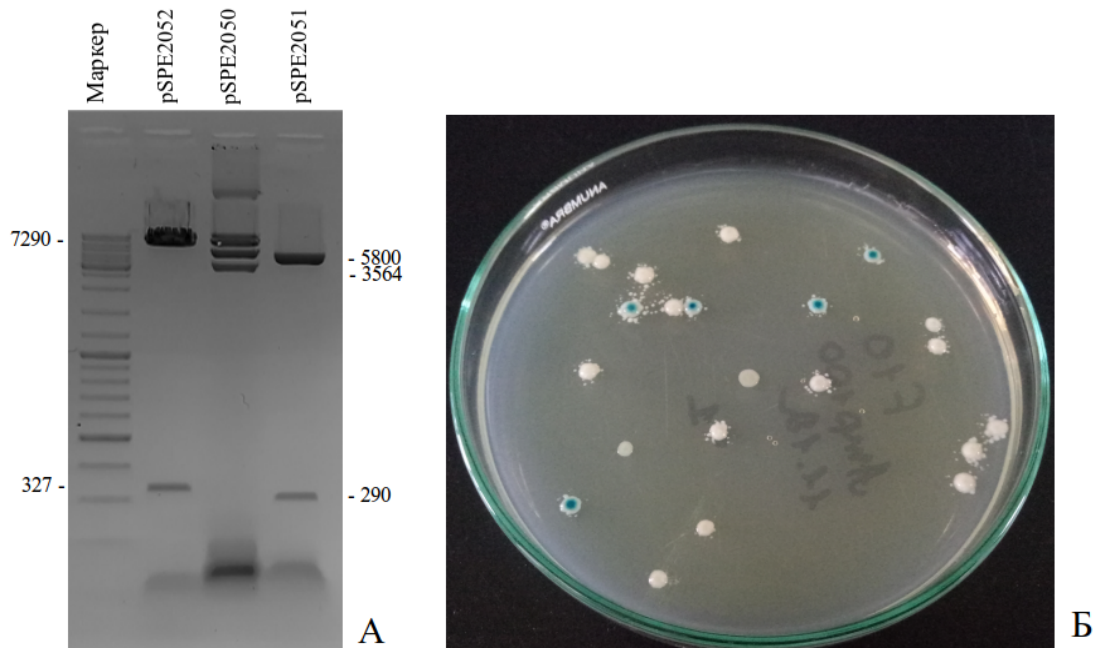


Рис. 5.2. Перевірка векторів першого рівня: А – рестрикційний аналіз плазмідної ДНК; Б – біло-блакитний скринінг отриманих колоній *E. coli*.

При створенні генетичних конструкцій, крім кодуючих послідовностей генів та регуляторних елементів (промотори та термінатори), нами були також використані послідовності, що не трансклюються – 5'-UTR різного походження. Це обумовлено тим, що використання в якості додаткового регуляторного елемента синтетичної консенсусної 5'-UTR послідовності призводить до збільшення рівня накопичення рекомбінантного білка майже на 25% [138; 139]. Значною мірою це пов'язано з наявністю низки регуляторних послідовностей у складі 5'-UTR мРНК, які можуть визначати як характер зв'язування з різними регуляторними білками, так і рівень стабільності транскрипту.

З літературних джерел відомо, що у векторах, які використовують для редагування геному рослин, ген бактеріального білка Cas9 зазвичай розміщують під контроль нативного або подвійного 35S промоторів вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (35S та d35S CaMV) [29]. Однак, в роботі Wei H., зі спів. [140] було показано, що максимальна активність ферменту β-глюкуронідази спостерігалась при використанні промотора гена нопалінсинтази *nos*, під контролем якого знаходився відповідний ген, порівняно з двома мінімальними промоторами 35S CaMV. Тому в нашій роботі ген білка Cas9 помістили під контроль промотора гена *nos*.

Після рестрикційного аналізу (рис. 5.2 А) створених векторів першого рівня (pSPE2050, pSPR2051 та pSPH2052), відповідні плазмідні виділяли з клітин *E. coli* та клонували у вектор-акцептор другого рівня (вектор L2 рівня) для створення мультигенної конструкції pSPE2053 (Додаток А). Далі здійснювали перенос рекомбінантної плазмідної ДНК в компетентні клітини *E. coli* Fasta, виділяли плазмідну ДНК та проводили рестрикційний аналіз створеної конструкції (рис. 5.3 А). За допомогою ПЛР аналізу було доведено наявність гена *Cas9* в створеній конструкції. Далі перевіреною плазмідною трансформували компетентні клітини *A. tumefaciens*

штам GV3101 та знову перевіряли за допомогою ПЛР на наявність гена *Cas9* (рис. 5.3 Б, В).

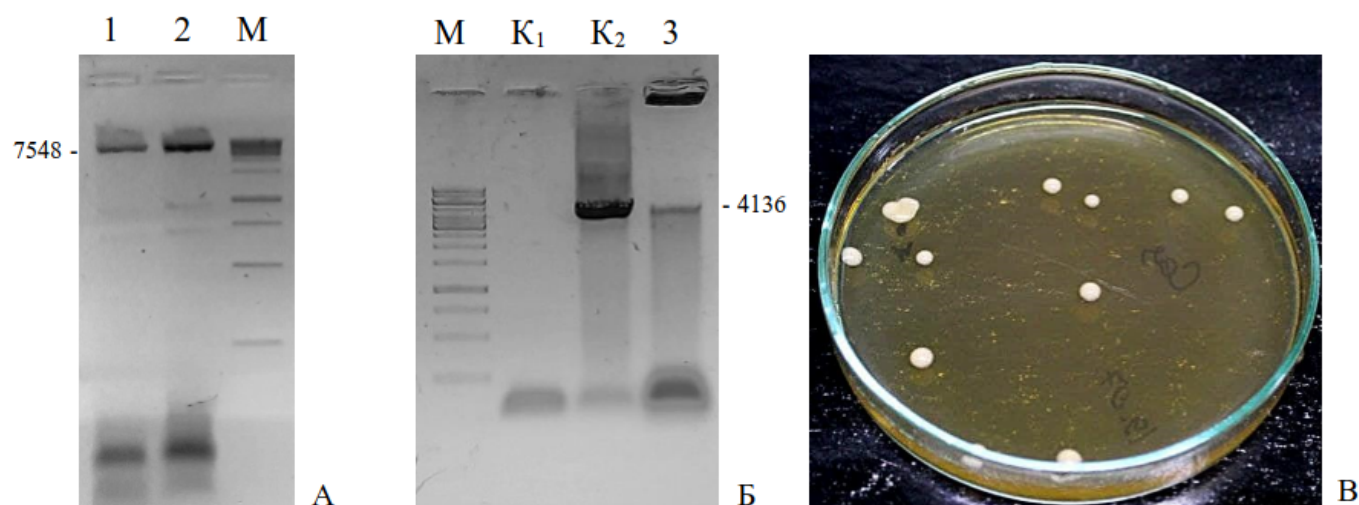


Рис. 5.3. Перевірка створеної генетичної конструкції pSPE2053.

А – рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, рестриктаза *EcoRI*: 1, 2 – ДНК з різних колоній *E. coli* Fasta, М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix; Б – електрофореграма розділення продуктів ампліфікації послідовності гена *Cas9* в плазмідній ДНК: К₁ – негативний контроль – Milli-Q; К₂ – позитивний контроль – плазмідна ДНК pSPE2050, що містить ген бактеріального білка *Cas9*; 3 – плазмідна ДНК з колонії *A. tumefaciens* GV3101, що містить створену генетичну конструкцію pSPE2053; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix; В – колонії *A. tumefaciens* GV3101, після трансформації плазмідною ДНК pSPE2053.

Для перевірки транз'єнтної експресії гена *gus*, який міститься у створеній конструкції pSPE2053, було проведено агроінфільтрацію суспензією агробактерій листків рослин махорки *N. rustica* L. – одного з модельних видів роду *Nicotiana*. Серед видів цього роду найчастіше використовують *N. benthamiana* Domin, який є модельним видом для дослідів по транз'єнтній експресії різних генів. Наприклад, Nekrasov зі спів.

(2013) у своїй роботі для перевірки генетичної конструкції з геном *Cas9*, який було зшито з геном *gfp*, використовували агроінфільтрацію рослин *N. benthamiana* [141]. А Baltes N., зі спів. (2015) показали можливість отримання стійкості до гемівірусів, використовуючи ко-інфільтрацію рослин *N. benthamiana* агробактеріальними конструкціями, що несли гени *Cas9* та *gfp* [142].

Гістохімічний аналіз GUS-активності показав високу експресію гена *gus* у листках 4-тижневих інфільтрованих рослин махорки (рис. 5.4 А, Б), в той час як у контрольних (неінфільтрованих) тканинах рослин махорки GUS-активності не було виявлено (рис. 5.4 В).

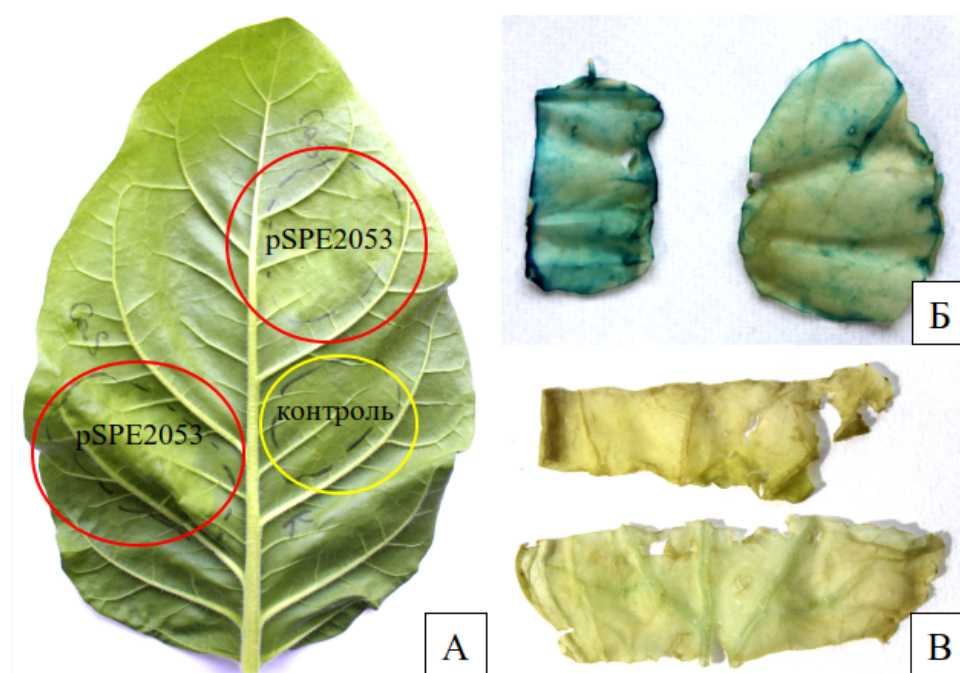


Рис. 5.4. Гістохімічний аналіз експресії гена *gus* в листкових тканинах махорки *N. rustica* L.:

А – листя махорки після інфільтрації, яке використовували для аналізу; Б – експресія β -глюкуронідази в листкових тканинах махорки після інфільтрації суспензією *A. tumefaciens* GV3101, що містить створену генетичну конструкцію pSPE2053; В – фрагменти листків контрольних (неінфільтрованих) рослин махорки.

Таким чином, нами було створено генетичну конструкцію pSPE2053, що несе ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9, репортерний ген β -глюкуронідази *gus*, а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*.

5.2. Створення вектора, спрямованого на редагування жирнокислотного складу ріпаку *B. napus* L.

Ненасичені жирні кислоти, які входять в раціон харчування, мають профілактичні та терапевтичні властивості при деяких інфекційних та неінфекційних захворюваннях людини [143; 144].

Ріпак *B. napus* L. – важлива олійна культура, насіння якої містить три основні ненасичені жирні кислоти: олеїнову, лінолеву та ліноленову [70]. Зменшення рівня ліноленової кислоти забезпечує більшу стабільність олії та потребує меншої гідрогенізації, що призводить до одночасного зменшення кількості транс-жирних кислот [56]. В той же час переважаючий вміст олеїнової кислоти є однією з цілей селекції, оскільки це підвищує термічну стійкість олії ріпаку та робить її більш придатною для вживання в їжу.

Ферменти десатурази жирних кислот каталізують перетворення одинарного зв'язку між атомами вуглецю в ацильних ланцюгах (C–C) у подвійний зв'язок (C=C). Десатурацію олеїнової кислоти в лінолеву, а лінолевої в ліноленову каталізують десатураза жирних кислот 2 (FAD2) та 3 (FAD3) відповідно [145].

Оскільки ріпак *B. napus* є алотетраплоїдним видом, його геном містить 4 гени *FAD2* – два від *B. rapa* (*BnaA.FAD2.a* і *BnaA.FAD2.b*) та два від *B. oleracea* (*BnaC.FAD2.a* і *BnaC.FAD2.b*) [56; 145].

Таким чином, одним із завдань нашого дослідження було створити генетичну конструкцію для редагування геному CRISPR/Cas9 з метою змінити жирнокислотний склад ріпаку озимого *B. napus* L. для накопичення олеїнової кислоти.

Генетичну конструкцію створювали за допомогою методу модульного молекулярного клонування Golden Gate [91; 92]. Конструкція спрямована на створення мутантної алелі *BnaA.FAD2.a* з передчасним стоп-кодом або амінокислотною заміною.

На першому етапі створення конструкцій всі елементи (модулі L0 рівня) перевіряли рестрикційним аналізом. Всі модулі клонували в кінцевий вектор для збирання (вектор L1 рівня): 1) pICH45089, pAGM1479, pSPE2050, pICH72400; 2) pICSL12006, pICH43844, pICH41414. Для клонування послідовностей Aa1 та Aa2, що синтезують направляючі РНК, використовували вектор-акцептор pUC19_AtU6oligo, який містить промотор *AtU6* з *A. thaliana* та послідовність, що кодує скеффолд-РНК. Після клонування послідовностей Aa1 і Aa2 для отримання окремих транскрипційних одиниць вектори трансформували в компетентні клітини *E. coli* та перевіряли ПЛР-аналізом із праймерами, специфічними до послідовностей Aa1 і Aa2 (рис. 5.5). Наступним етапом була ампліфікація транскрипційних одиниць, які містять послідовності Aa1 і Aa2 за допомогою ПЛР з використанням полімерази точного синтезу q5, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації та їх виділення із гелю. Синтезовані транскрипційні одиниці клонували у вектори L1 рівня.

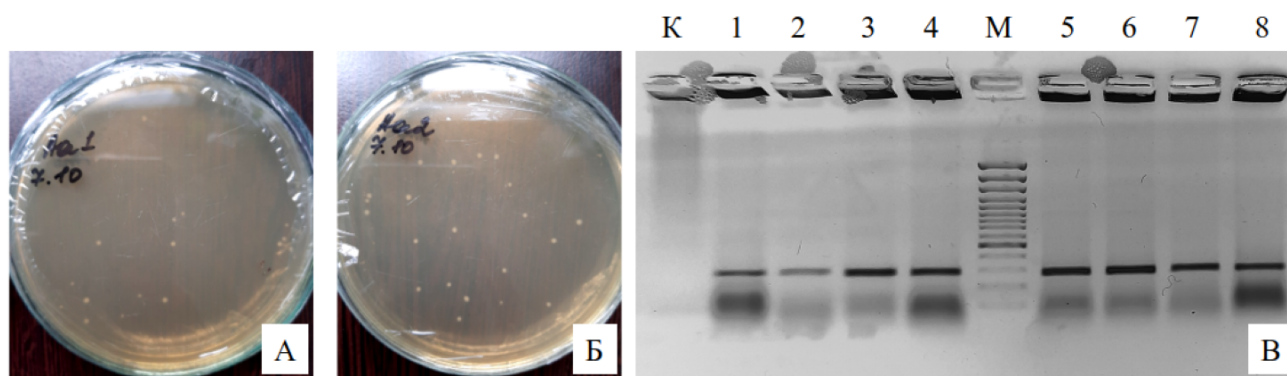


Рис. 5.5. Перевірка послідовностей Aa1 та Aa2 після клонування у вектор-акцептор pUC19_AtU6oligo.

А – колонії *E. coli*, що містять дволанцюгову послідовність Aa1; Б – колонії *E. coli*, що містять дволанцюгову послідовність Aa2; В – ПЛР-аналіз отриманих колоній зі специфічними праймерами: доріжки 1–4 – ДНК з різних колоній *E. coli*, що містять дволанцюгову послідовність Aa1; доріжки 5–8 – ДНК з різних колоній *E. coli*, що містять дволанцюгову послідовність Aa2; К – негативний контроль (Milli-Q); М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

В результаті нами було клоновано чотири генетичні конструкції першого рівня – pSPE2054, pSPE2055, pSPE2056 та pSPG2057 (рис. 5.6), які містили окремі транскрипційні одиниці для експресії гена бактеріального білка Cas9 під контролем подвійного 35S промотора CaMV та термінатора гена *Atug7*, генів направляючих послідовностей Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку і гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar* під контролем промотора гена вірусу мозаїки жилوک маніоки (Cassava Mosaic Virus) та 35S термінатора гена CaMV для відбору трансгенних рослин в культурі *in vitro*. Біло-блакитний скринінг дозволив швидко детектувати колонії з ймовірно позитивним результатом. Створені конструкції перевіряли ПЛР та рестрикційним аналізом.

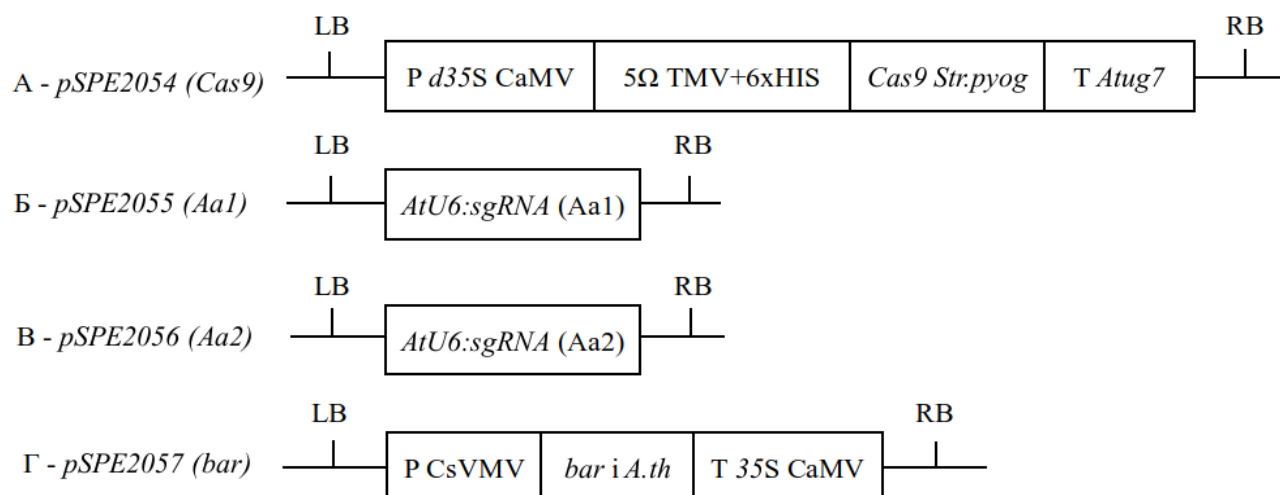


Рис. 5.6. Схематичне зображення Т-ДНК створених векторів першого рівня:

А – вектор pSPE2054 з геном бактеріального білка Cas9 під контролем подвійного 35S промотора CaMV та термінатора гена *Atug7*; Б – вектор pSPE2055 з геном направляючої РНК Aa1; В – вектор pSPE2056 з геном направляючої РНК Aa2; Г – вектор pSPG2057 з геном фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) *S. hygroscopicus* з інтроном *act2 A. thaliana* під контролем промотора гена вірусу мозаїки жилок маніюки (Cassava Mosaic Virus) та 35S термінатора гена вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV)

Після рестрикційного аналізу створених векторів першого рівня (pSPE2054, pSPE2055, pSPE2056 та pSPG2057), відповідні плазміди виділяли з клітин *E. coli* та клонували у вектор другого рівня (вектор L2 рівня). Далі здійснювали перенесення рекомбінантної плазмідної ДНК в компетентні клітини *E. coli* (рис. 5.7 А), виділяли плазмідну ДНК та проводили рестрикційний аналіз створеної конструкції (рис. 5.7 Б). За допомогою ПЛР аналізу було доведено наявність гена білка Cas9 в створеній конструкції (рис. 5.7 В). Далі перевіреною плазмідною трансформували компетентні клітини *A. tumefaciens* штам GV3101 та знову перевіряли за допомогою ПЛР зі специфічними праймерами до гена *Cas9* (рис. 5.7 Г).

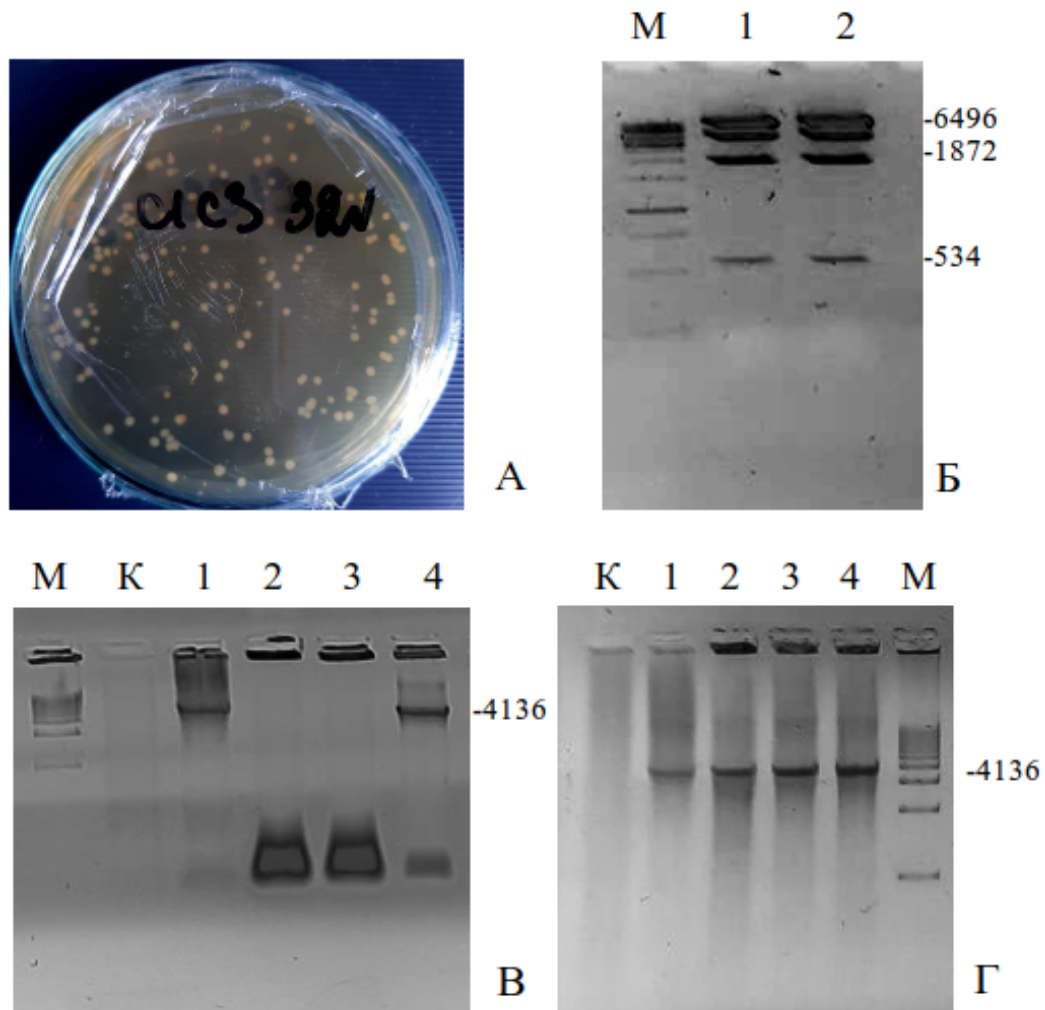


Рис. 5.7. Перевірка генетичної конструкції pSPE2058.

А – колонії *E. coli*, що містять створену генетичну конструкцію pSPE2058;
 Б – рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, рестриктаза *XhoI*: доріжки 1–2 – ДНК з різних колоній *E. coli*; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix;
 В – ПЛР-аналіз отриманих колоній зі специфічними праймерами до гена *Cas9*: доріжки 1–4 – ДНК з різних колоній *E. coli*, що містять конструкцію pSPE2058; К – негативний контроль (Milli-Q); М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix;
 Г – ПЛР-аналіз отриманих колоній зі специфічними праймерами до гена *Cas9*: доріжки 1–4 – ДНК з різних колоній *A. tumefaciens* GV3101, що містять конструкцію pSPE2058; К – негативний контроль (Milli-Q); М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Таким чином, нами було створено генетичну конструкцію pSPE2058 [105], що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти, а також селективний ген *bar*. Створена генетична конструкція може бути використана для редагування геному рослин ріпаку як в наукових, так і в прикладних цілях.

Під час досліджень, проведених для ріпаку *B. napus* сорту SW Hickory, за допомогою методу картування локусів кількісних ознак (quantitative trait loci, QTL) було показано, що ген *BnaA.FAD2.a* містить додаткову послідовність довжиною 4 пн у ділянці кодування, яка відповідає за високий вміст олеїнової кислоти [145].

Крім того, високоолеїновий сорт ріпаку Cabriolet має мутацію зсуву рамки зчитування в області кодування генів *BnaA.FAD2.a* та *BnaA.FAD2.b*. За допомогою обробки рослин сорту Cabriolet етилметансульфонатом та скринінгу популяції M₂ було отримано кілька ліній, які характеризуються подальшим збільшенням вмісту олеїнової кислоти, а відповідні мутації були ідентифіковані як *BnaC.-FAD2.a* [146].

Варто також зазначити, що у дослідженні Okuzaki et al. було створено генетичну конструкцію, спрямовану на нокаут гена *BnaA.FAD2.a* та здійснено успішне редагування геному ріпаку сорту Westar [70]. Із 22-х рослин-регенерантів ріпаку, відібраних на селективному середовищі з канаміцином, 2 містили мутантні алелі; алель *fad2_Aa* містила делецію із 4 пн. Аналіз жирнокислотного складу насіння таких біотехнологічних рослин показав статистично достовірне збільшення вмісту олеїнової кислоти порівняно з диким типом.

На сьогоднішній день були комерційно впроваджені 4 трансформаційні події ріпаку зі зміненим жирнокислотним складом [54]. Так, наприклад, під комерційною назвою Laurical™ Canola компанія Monsanto зареєструвала дві трансгенні події ріпаку: 23-198 ("Event 23") та

23-18-17 ("Event 18"), які містять ген *te* з *Umbellularia californica*, експресія якого підвищує вміст лауринової кислоти, і ген *nptII*. Компанія Nuseed Pty Ltd шляхом *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації отримала подію під назвою DHA Canola, яка містить сім генів, отриманих з дріжджів і мікроводоростей, які беруть участь у метаболізмі довголанцюгових поліненасичених жирних кислот (з 20 або більше атомів вуглецю). Такі біотехнологічні рослини ріпаку є джерелом важливих довголанцюгових омега-3 жирних кислот [147; 148]. Крім того, за допомогою *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації ріпаку компанія BASF отримала подію LBFLFK із десятима генами різного походження, що змінюють жирнокислотний склад ріпаку, а також із геном *ahas* *A. thaliana*, що надає трансгенним рослинам стійкості до гербіциду імазамоксу [54].

5.3. Отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку, що несуть ген бактеріальної ендонуклеази Cas9 як платформа для редагування геному *B. napus* L.

Одним із завдань нашої роботи було отримання трансгенних рослин озимого ріпаку, що несуть ген бактеріальної ендонуклеази Cas9 шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації *in vitro*.

Для *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів використовували генетичну конструкцію pSPE2053, створену нами в ході цього дослідження [83]. Бактеріальна конструкція містить ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, репортерний ген *gus*, а також селективний ген *bar*, що надає рослинним клітинам стійкості до гербіциду Баста® і забезпечує ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі.

Таким чином, за допомогою генетичної конструкції pSPE2053 на селективному середовищі MCP3, доповненому 8 мг/л РРТ, нами було

отримано 25 рослин-регенерантів ріпаку озимого на основі лінії української селекції *Bn1* (рис. 5.8).



Рис. 5.8. Експланти озимого ріпаку лінії *Bn1* на 4-й тиждень культивування на регенераційному живильному середовищі МСРЗ, доповненому 8 мг/л РРТ, після трансформації генетичною конструкцією pSPE2053.

Для аналізу експресії Т-ДНК у трансформованих рослинах було проведено гістохімічний аналіз активності β -глюкуронідази, який показав експресію GUS у рослин-регенерантів озимого ріпаку лінії *Bn1* (рис. 5.9).

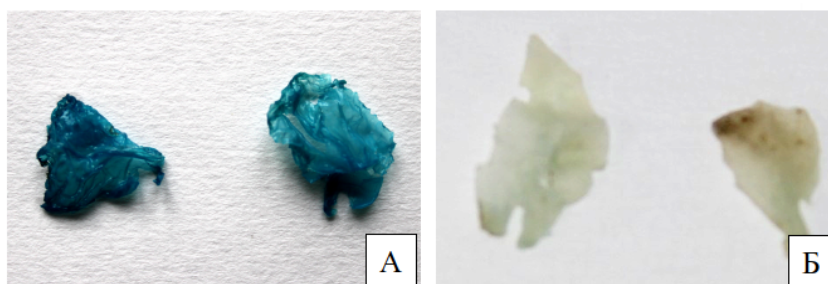


Рис. 5.9. Гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази в рослинних тканинах: А – експресія гена β -глюкуронідази в листкових тканинах озимого ріпаку української селекції після *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації конструкцією pSPE2053; Б – негативний контроль (фрагмент листа інтактного ріпаку).

Для виявлення послідовності гена бактеріального білка Cas9 було проведено ПЛР з використанням специфічних праймерів до гена *Cas9*. ПЛР показала наявність трансгену в 23 з 25 рослин-регенерантів озимого ріпаку лінії *Bn1* (рис. 5.10) [104].

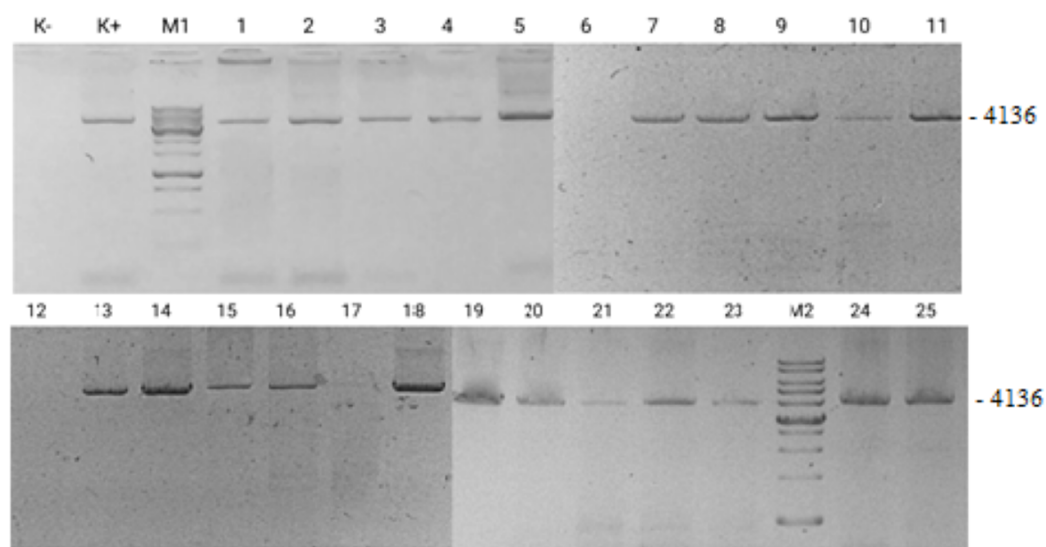


Рис. 5.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Cas9*: Доріжки 1–25 – досліджувані зразки – ДНК рослин-регенерантів ріпаку, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації генетичною конструкцією pSPE2053; K- – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку лінії *Bn1*; K+ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101, що містить генетичну конструкцію pSPE2053; M1, M2 – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

Після етапу вкорінення на середовищі MCB, доповненому 3 мг/л РРТ, рослини-регенеранти озимого ріпаку, у яких була підтверджена наявність гена *Cas9*, висаджували у торф'яну суміш та адаптували до умов *in vivo*. Оскільки генетична конструкція pSPE2053 містить ген *bar*, адаптовані рослини обробляли гербіцидом Баста® та відмітили їх 100%-ву виживаність (рис. 5.11).



Рис. 5.11. Рослини-регенеранти ріпаку озимого після обробки гербіцидом Баста®: А – після *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації генетичною конструкцією pSPE2053; Б – контроль (інтактна рослина ріпаку озимого лінії *Bn1*).

Таким чином, шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації конструкцією pSPE2053, було отримано трансгенні рослини озимого ріпаку *B. napus* L. лінії української селекції *Bn1*, що несуть ген бактеріальної ендонуклеази Cas9.

Варто зазначити, що у дослідженнях Zaidi et al. на основі вірусу погримковості тютюну (tobacco rattle virus, TRV) була розроблена TRV-система доставки sgRNA для спрямованої зміни геному рослини-хазяїна [65; 149–150]. Першим етапом дослідження для створення рослин із редагованим геномом було отримання рослин-трансформантів тютюну *N. benthamiana*, які стабільно експресують білок Cas9. Далі TRV-вектор був доставлений за допомогою агроінфільтрації листків трансгенних рослин *N. benthamiana*, що містять ендонуклеазу Cas9. У такій системі TRV доставляє одну або декілька sgRNA для модифікації геному рослини-хазяїна. Цікаво, що sgRNA може експресуватися у наступних поколіннях. Така TRV-опосередкована система доставки sgRNA є винятковою, оскільки вона не потребує застосування методу культури тканин та трансформації рослин [65].

За допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гіпокотилів було здійснено успішне редагування ріпаку *B. napus* сорту Haydn, направлене на нокаут гена *BnaALC*, залученого у розвиток струлок стручків [67]. Інактивація цього гена дозволяє запобігти висипанню насіння та, відповідно, збільшити врожай. В результаті експериментів були отримані біотехнологічні рослини T₁ із 4-ма мутантними алелями *alc*. Схожі експерименти були проведені для сорту-дворучки J9707 – отримані біотехнологічні рослини, стійкі до висипання насіння, за допомогою направленого мутагенезу гена *BnIND* [69]. Також з метою збільшення врожаю був здійснений нокаут гена *BnCLV*, що дозволило отримати біотехнологічні рослини з більшою кількістю листків, багатокамерними стручками та більшою кількістю і масою насіння [68]. Крім того, в останній роботі була показана можливість горизонтального перенесення системи CRISPR/Cas9 шляхом гібридизації ріпаку.

В роботі Khan et al. за допомогою направленого мутагенезу гена *BnaEOD3* ріпаку сорту-дворучки J9707 отримали біотехнологічні рослини з коротшими стручками та більшою кількістю насіння меншого розміру, ніж у дикого типу [73]. Таким чином, маса насіння на одну рослину у мутантів зросла в середньому на 13,9% порівняно з диким типом.

Також варто зазначити, що у дослідженні Hamada et al. показана можливість біолістичної доставки системи CRISPR/Cas9 для *in planta* редагування геному пшениці *Triticum aestivum* [151].

Висновки до розділу 5

Створена генетична конструкція pSPE2053 може бути використана для редагування геному рослин як при стабільній, так і при транзійтній генетичній трансформації для накопичення рекомбінантного білка Cas9. В такі рослини в подальшому можуть бути перенесені послідовності гідових

РНК, використовуючи стабільну/транзієнтну генетичну трансформацію або традиційні методи гібридизації.

Створено генетичну конструкцію pSPE2058, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти, а також селективний ген *bar*. Створена генетична конструкція може бути використана для редагування геному рослин ріпаку як в наукових, так і в прикладних цілях.

Отримано трансгенні рослини озимого ріпаку *B. napus* L. лінії української селекції *Bn1*, що несуть ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9. Такі рослини можуть бути в подальшому використані для цільового накопичення рекомбінантного білка; для їх інфільтрації вектором, що містить направляючі послідовності РНК або ж для створення гібридних ліній з іншими трансгенними рослинами озимого ріпаку.

Основні положення цього розділу викладені в публікаціях автора: [83], [104], [105].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою застосування прийомів генетичної інженерії наведено вирішення важливої наукової проблеми, яка полягає у створенні біотехнологічних рослин комерційної лінії озимого ріпаку *Bn1* української селекції з генами стійкості до гліфосату, а також створення платформи для редагування геному озимого ріпаку з використанням системи CRISPR/Cas9.

1. Методика регенерації *in vitro* та яровизації озимого ріпаку *B. napus* L. лінії *Bn1* української селекції є економічною (вимагає використання невеликої кількості доступних регуляторів росту) і ефективною (забезпечує високу частоту регенерації та отримання насіння нульового покоління вже через рік після початку експериментів).

2. Такі параметри *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1*, як оптична щільність бактеріальної суспензії $OD_{600} = 0,5$ та тривалість інокулювання експлантів ріпаку лінії *Bn1* протягом 10 хв, дозволили досягти показника частоти трансформації за геном *gus* – $22,75\% \pm 2,28\%$. Отримане трансгенне насіння морфологічно не відрізняється від інтактного, а генетичне розщеплення у першому поколінні біотехнологічних рослин T_1 становить 3:1.

3. В результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133 та pCB135, Т-ДНК яких містить ген CP4 *epsps*, а також конструкцією pSPG2254, яка несе мутантний ген *Bn epsps*, створено трансгенні рослини озимого ріпаку, стійкі до дії гербіциду гліфосату. В першому поколінні (T_1), отриманому в результаті самозапилення біотехнологічних рослин озимого ріпаку (T_0), спостерігається генетичне розщеплення 3:1 за ознакою стійкості до гербіциду гліфосату. Показано, що мутантний ген *Bn epsps*, який входить до складу конструкції pSPG2254, забезпечує стійкість трансгенних рослин озимого ріпаку до гліфосату на такому ж рівні, як і

ген CP4 *epsps* з *A. tumefaciens* CP4, що входить до складу конструкцій pCB133 та pCB135.

4. Генетична конструкція pSPE2053, яка містить ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, ген β -глюкуронідази *gus* та ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*, перевірена на модельному об'єкті *N. rustica* L.

5. Генетична конструкція pSPE2058 на основі системи CRISPR/Cas9 може бути використана для редагування жирно-кислотного складу насіння ріпаку як в прикладних, так і в наукових цілях.

6. Біотехнологічні рослини озимого ріпаку *B. napus* L. лінії української селекції *Bn1*, що містять ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, можуть бути в подальшому використані для цільового накопичення рекомбінантного білка, для їх інфільтрації вектором, що містить направляючі послідовності РНК або для створення гібридних ліній з іншими трансгенними рослинами озимого ріпаку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gamborg, O. L., Eveleigh, D. E. (1968). Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.*, 46 (5), 417–421.
2. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62 (3), 293–300.
3. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
4. Sakhno, L. O. (2013). Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering. *Biopolymers and Cell*, 29 (6), 443–453. doi: 10.7124/bc.000838.
5. Сахно, Л. О., Листван, К. В., Кучук, М. В. (2015). Антиоксидантна активність листків біотехнологічного ріпаку (*Brassica napus* L.), зі стійкістю до гербіцидів на основі гліфосату і глюфозинату. *Вісник Харківського національного аграрного університету: Серія Біологія*, 3 (36), 62–70.
6. Сахно, Л. О., Комарницький, І. К., Кучук, М. В. (2015). Стійкість до гліфосату і глюфозинату в поколіннях T₁–T₂ біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassica napus* L.). *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*, 13 (1), 3–10.
7. Doudna, J. A., Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9. *Science*, 346. doi: 10.1126/science.1258096.
8. USDA, ARS (2017). Germplasm Resources Information Network (GRIN) Taxonomy for Plants. Taxon: *Brassica napus* L. Available from GRIN database.
9. Lee, H., Chawla, H. S., Obermeier, C., Dreyer, F., Abbadi, A., Snowdon, R. (2020) Chromosome-scale assembly of winter oilseed rape *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.*, 11, 496. doi: 10.3389/fpls.2020.00496.
10. Luijten, S. H., Jong T. (2010). Baseline study of the distribution and morphology of *Brassica napus* L. and *Brassica rapa* L. in the Netherlands. P. 69.

11. The Biology of *Brassica napus* L. (Canola/Rapeseed). Date modified: 2017-12-22. (<https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/brassica-napus-l-/eng/1330729090093/1330729278970#shr-pg0>).
12. Кравчук В. С., Овчарук О. В. Агробіологічні особливості рослин озимого ріпаку. *Сучасний стан науки в сільському господарстві та природокористуванні: теорія і практика*: матеріали II Міжнародної наукової Інтернет-конференції (20 листопада 2020). Тернопіль, 2020. С. 88–90.
13. Органічний ріпак. Дослідний інститут органічного сільського господарства (FiBL, Швейцарія) в рамках швейцарсько-українського проекту "Розвиток органічного ринку в Україні", Київ, 2017.
14. Ріпак в Україні та світі (<https://www.kws.com/ua/uk/produkty/ripak/ripak-v-ukraini-ta-sviti/>)
15. Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>).
16. Fry, J., Barnason, A. Horsch, R. B. (1987). Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Reports*, 6 (5), 321–325. doi: 10.1007/BF00269550.
17. De Block, M., De Brouwer, D., Tenning, P. (1989). Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiology*, 91 (2), 694–701. doi: 10.1104/pp.91.2.694.
18. Moloney, M. M., Walker, J. M., Sharma, K. K. (1989). High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 8, 238–242. doi: 10.1007/BF00778542.
19. Maheshwari, P., Selvaraj, G., Kovalchuk, I. (2011). Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. *New Biotechnology*, 29 (1), 144–155. doi: 10.1016/j.nbt.2011.06.014.

20. Hoang, T. G., Raldugina, G. N. (2012). Regeneration of transgenic plants expressing the GFP gene from rape cotyledonary and leaf explants: Effects of the genotype and ABA. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59, 406–412. doi: 10.1134/S1021443712030089.
21. Hussain, S., Rasheed, A., Latif, M., Mahmood, T., Saqlan Naqvi, S. M. (2014). Canola (*Brassica napus* L.) regeneration and transformation via hypocotyl and hypocotyl derived calli. *Sarhad Journal of Agriculture*, 30, 165–172.
22. Bhalla, P. L., Singh, M. B. (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols*, 3, 181–189. doi: 10.1038/nprot.2007.527.
23. Mashayekhi, M., Shakib, A. M., Ahmad-Raji, M., Ghasemi Bezdi, K. (2008). Gene transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants, *African Journal of Biotechnology*, 7 (24), 4459–4463.
24. Rahnema, H., Sheykhhasan, M. (2016). Transformation and light inducible expression of *cryIab* gene in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Sciences*, 27 (4), 313–319.
25. Bates, R., Craze, M., Wallington, E. J. (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of oilseed rape (*Brassica napus*). *Current Protocols in Plant Biology*, 2, 287–298. doi: 10.1002/cppb.20060.
26. Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., Sugimoto, K. (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *The Company of Biologists Ltd*, 1442–1451. doi: 10.1242/dev.134668.
27. Lone, J. A., Gupta, S. K., Wani, S. H., Bhat, M. A., Lone, R. A. (2016) *In vitro* regeneration studies in *Brassica napus* with response to callus induction frequency and regeneration frequency, *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9 (5), 755–761. doi: 10.5958/2230-732X.2016.00098.X.

28. Akter, S., Mollika, S. R., Sarker, R. H., Hoque, M. I. (2016). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of two varieties of *Brassica juncea* (L.) using marker genes, *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 26 (1), 55–65. doi: 10.3329/bjar.v34i2.5802.
29. Liu, X. X., Lang, S. R., Su, L. Q., Liu, X., Wang, X. F. (2015). Improved *Agrobacterium*-mediated transformation and high efficiency of root formation from hypocotyl meristem of spring *Brassica napus* "Precocity" cultivar. *Genetics and Molecular Research*, 14 (4), 16840–16855. doi: 10.4238/2015.December.14.11.
30. Hocheva, E. A., Sakhno, L. O., Kuchuk, M. V. Method for producing transformed rape plants by method of agrobacterial transformation: Patent for utility model 39205 Ukraine. No u200811768 applied on 03.10.2008, published on 10.02.2009, bulletin № 3.
31. Ravanfar, S. A., Orbovic, V., Moradpour, M., Abdul Aziz, M., Karan, R., Wallace, S., Parajuli, S. (2017). Improvement of tissue culture, genetic transformation, and applications of biotechnology to *Brassica*, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33 (1), 1–25. doi: 10.1080/02648725.2017.1309821.
32. Klimaszewska, K., Keller, W. (1985). High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 4, 183–197. doi: 10.1007/BF00040193.
33. Ullah, I., Rashid, H., Khan, R. H. (2004). Establishment of tissue culture protocol in *Brassica* (*B. napus* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (2), 277–278.
34. Ghazemi, B.K., Karlov, G.I., Ahmadikhah, A. (2007). Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 6 (7), 861–867.
35. Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. *Micropropagation: Technology and Application*, Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.

36. Shcherbak, N., Kishchenko, O., Sakhno, L., Komarnytsky, I., Kuchuk, M. (2013). *Lox*-Dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cytology and Genetics*, 47 (3), 145–155. doi: 10.3103/S0095452713030079.
37. Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T. (2015). *In vitro* regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var *capitata*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 51, 80–87. doi: 10.1007/s11627-014-9648-7.
38. Тараненко, А.М., Банникова, М.О., Моргун, Б.В. (2014). Сортозалежні ростові показники та регенераційна здатність різних експлантів капусти в культурі *in vitro*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, 141–144.
39. Farooq, N., Asif Nawaz, M., Mukhtar, Z., Ali, I., Hundleby, P., Ahmad, N. (2019). Investigating the *in vitro* regeneration potential of commercial cultivars of *Brassica*. *Plants*, 8 (12), 558. doi: 10.3390/plants8120558.
40. Iwase, A., Mita, K., Favero, D. S., Mitsuda, N., Sasaki, R., Kobayshi, M., Takebayashi, Y., Kojima, M., Kusano, M., Oikawa, A., Sakakibara, H., Saito, K., Imamura, J., Sugimoto, K. (2018). WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in *Brassica napus*. *Developmental Biology*, 442 (1), 40–52. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.07.006.
41. Pua, E.-C., Mehra-Palta, A., Nagy, F., Chua, N.-H. (1987). Transgenic plants of *Brassica napus* L. *Nature Biotechnology*, 5, 815–817. doi: 10.1038/nbt0887-815.
42. Radke, S. E., Andrews B. M., Moloney M. M., Crouch, M. L., Kridl, J. C., Knauf V.C. (1988). Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 685–694. doi: 10.1007/BF00265588.
43. Boulter, M. E., Croy, E., Simpson, P., Shields, R., Croy, R. R. D., Shirsat, A. H. (1990). Transformation of *Brassica napus* L. (oilseed rape) using

Agrobacterium tumefaciens and *Agrobacterium rhizogenes* – a comparison. *Plant Science*, 70, 91–99. doi: 10.1016/0168-9452(90)90036-N.

44. Dai, C., Li, Y., Li, L., Du, Z., Lin, S., Tian, X., Li, S., Yang, B., Yao, W., Wang, J., Guo, L., Lu, S. (2020). An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method using hypocotyl as explants for *Brassica napus*. *Mol Breeding*, 40, 96. doi: 10.1007/s11032-020-01174-0.

45. Hundleby, P., Irwin, J. (2015). *Brassica oleracea* and *B. napus*. *Agrobacterium Protocols*, 1, 287–297. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_23.

46. Mooney, B.C., Graciet, E. (2020). A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression system to dissect molecular processes in *Brassica rapa* and *Brassica napus*. *Plant Direct*, 4 (7), e00237. doi: 10.1002/pld3.237.

47. Kong, F., Li, J., Tan, X., Zhang, Z., Qi, C., Ma, X. (2009). A new time-saving transformation system for *Brassica napus*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (11). 2497–2502.

48. Zhang, Z.-Y., Li, G.-Y., Wang, J.-L., Guo, X.-J., Wang, Z., Tan, X.-L. (2017). Establishment of rapeseed (*Brassica napus* L.) cotyledon transient transformation system for gene function analysis. *Pakistan Journal of Botany*, 49 (6): 2227–2233.

49. Hao, Y., Charles, C. T., Glick, R. B. (2010). ACC deaminase increases the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation frequency of commercial canola cultivars. *FEMS Microbiol Lett*, 307, 185–190.

50. Elahi, N., Duncan, R. W., Stasolla, C. (2016). Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1. *Plant Physiol Biochem*, 100, 52–63. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.022.

51. Cardoza, V. & Stewart, C. N. (2003). Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from

hypocotyl segment explants. *Plant Cell Reports*, 21 (6), 599–604. doi: 10.1007/s00299-002-0560-y.

52. Sakhno, L. O., Kvasko, O. Y., Olevinska, Z. M., Spivak, M. Y., Kuchuk, M. V. (2012). Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing uman alpha 2b interpheron gene. *Цитология и генетика*, 46 (6), 12–18.

53. Сахно, Л.О., Герасименко, И.М., Комарницкий, И.К., Шелудько, Ю.В., Голденкова-Павлова, И.В. (2012). Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. *Biopolymers and Cel*, 28 (6), 449–455. doi: 10.7124/bc.000135.

54. ISAAA GM Approval Database (<https://www.isaaa.org/>).

55. Imran, M., Asad, S., Barboza, A. L., Galeano, E., Carrer, H., Mukhtar, Z. (2017). Genetically transformed tobacco plants expressing synthetic EPSPS gene confer tolerance against glyphosate herbicide. *Physiol Mol Biol Plants*, 23 (2), 453–460. doi:10.1007/s12298-017-0424-0.

56. Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A. *et al.* (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251, 91. doi: 10.1007/s00425-020-03372-8.

57. Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H. and Edwards, D. (2017), Towards CRISPR/Cas crops – bringing together genomics and genome editing. *New Phytol*, 216, 682–698. doi: 10.1111/nph.14702.

58. Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7 (3), 292–302. doi: 10.1016/j.apsb.2017.01.002.

59. Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39 (21), 9275–9282. doi: 10.1093/nar/gkr606.

60. Kim, J. I. & Kim, J. Y. (2019). New era of precision plant breeding using genome editing. *Plant Biotechnol Rep*, 13, 419–421. doi: 10.1007/s11816-019-00581-w.
61. Немудрый, А.А., Валетдинова, К.Р., Медведев, С.П., Закиян, С.М. (2014). Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий. *Acta Naturae* 6 (22), 20–42.
62. Yue, J. J., Hong, C. Y., Wei, P. et al. (2020). How to start your monocot CRISPR/Cas project: plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice*, 13 (9). doi: 10.1186/s12284-019-0354-2.
63. Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y. et al. (2016). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 7, e12617. doi: 10.1038/ncomms12617.
64. Wada, N., Ueta, R., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2020). Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Plant Biology*, 20, 1-12.
65. Zaidi, S. S.-A., Tashkandi, M., Mahfouz, M. M. (Eds.). (2017). Chapter Ten – Engineering molecular immunity against plant viruses. Progress in Molecular Biology and Translational Science. *Academic Press*, 149, 167–186. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.009.
66. Han, Y. J. & Kim, J. I. (2019). Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing for the development of herbicide-resistant plants. *Plant Biotechnol Rep* 13, 447–457. doi: 10.1007/s11816-019-00575-8.
67. Braatz, J., Harloff, H.-J., Mascher, M., Stein, N., Himmelbach, A., Jung, C. (2017). CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*), *Plant Physiology*, 174 (2), 935–942. doi: 10.1104/pp.17.00426.
68. Yang, Y., Zhu, K., Li, H., Han, S., Meng, Q., Khan, S.U., Fan, C., Xie, K., Zhou, Y. (2018), Precise editing of CLAVATA genes in *Brassica napus* L.

regulates multilocular silique development. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 1322–1335. doi: 10.1111/pbi.12872.

69. Zhai, Y., Cai, S., Hu, L. et al. (2019). CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals differences in the contribution of INDEHISCENT homologues to pod shatter resistance in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 132, 2111–2123. doi: 10.1007/s00122-019-03341-0.

70. Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., Kaneko, K., Inaba, M., Imamura, J., Koizuka, N. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 63–69. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.025.

71. Huang, H., Cui, T., Zhang, L. et al. (2020). Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at *BnaFAD2* gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 133, 2401–2411. doi: 10.1007/s00122-020-03607-y.

72. Sun, Q., Lin, L., Liu, D., Wu, D., Fang, Y., Wu, J., Wang, Y. (2018). CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* genes in *Brassica napus* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, e2716. doi: 10.3390/ijms19092716.

73. Khan, M. H. U., Hu, L., Zhu, M., et al. (2021). Targeted mutagenesis of *EOD3* gene in *Brassica napus* L. regulates seed production. *Journal of Cellular Physiology*, 236, 1996–2007. doi: 10.1002/jcp.29986.

74. Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N. et al. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*, 16, 258. doi: 10.1186/s13059-015-0826-7.

75. Ma, C., Zhu, C., Zheng, M. et al. (2019). CRISPR/Cas9-mediated multiple gene editing in *Brassica oleracea* var. capitata using the endogenous tRNA-processing system. *Horticulture Research*, 6, 20. doi: 10.1038/s41438-018-0107-1.

76. Kirchner, T. W., Niehaus, M., Debener, T., Schenk, M. K., Herde, M. (2017) Efficient generation of mutations mediated by CRISPR/Cas9 in the hairy root

transformation system of *Brassica carinata*. *PLOS ONE*, 12 (9): e0185429. doi: 10.1371/journal.pone.0185429.

77. Xiong, X., Liu, W., Jiang, J. et al. (2019). Efficient genome editing of *Brassica campestris* based on the CRISPR/Cas9 system. *Molecular Genetics and Genomics*, 294, 1251–1261. doi: 10.1007/s00438-019-01564-w.

78. Jeong, S. Y., Ahn, H., Ryu, J. et al. (2019). Generation of early-flowering Chinese cabbage (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) through CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Biotechnology Reports*, 13, 491–499. doi: 10.1007/s11816-019-00566-9.

79. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко, Ю.В. (2019). Підбір селективних концентрацій гліфосату для ефективного відбору *in vitro* трансгенних тканин озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 197–201. doi: 10.7124/FEEO.v25.1164.

80. Hnatyuk, I. S., Varchenko, O. I., Kuchuk, M. V. et al. (2020). Development of an effective *in vitro* regeneration system for ukrainian breeding winter rape *Brassica napus* L. *Cytology & Genetics*, 54, 341–346. doi: 10.3103/S0095452720040039.

81. Hnatiuk, I. S., Varchenko, O. I., Bannikova, M. O., Kuchuk, M. V., Parii, M. F., Symonenko, Yu. V. (2020). Development of an effective technique for *in vitro Agrobacterium*-mediated genetic transformation of winter rape *Brassica napus* L. *AgroLife Scientific Journal*, 9 (1), 149–155.

82. Hnatyuk, I.S., Varchenko, O.I., Kuchuk, M.V., Parii, M.F., Symonenko, Yu.V. (2020). Creation of winter rapeseed *Brassica napus* L. commercial line of biotechnological plants, resistant to the glyphosate action. *Biopolymers and Cell*, 36 (6), 423–432. doi:10.7124/bc.000A40.

83. Гнатюк, І.С., Варченко, О.І., Парій, М.Ф., Симоненко, Ю.В. (2020). Створення генетичного вектору для редагування геному рослин, що

несе ген синтезу бактеріального білка Cas9. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 26, 176–182. doi: 10.7124/FEEО.v26.1263.

84. Горбатюк, І. Р., Щербак, Н. Л., Банникова, М. О., Великожон, Л. Г., Кучук, М. В., Моргун, Б. В. (2016). Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Физиология растений и генетика*, 48 (1), 65–74.

85. Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., Chen, Q. (2013). Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *Journal of Visualized Experiments*, 77, e50521. doi: 10.3791/50521.

86. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

87. Rogstad, S. H. (2003). Plant DNA extraction using silica. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 463. doi: 10.1007/BF02772598.

88. Godwin, I. D., Aitken, E. A. B. and Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *ELECTROPHORESIS*, 18, 1524–1528. doi: 10.1002/elps.1150180906.

89. Jefferson, R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387–405. doi: 10.1007/BF02667740.

90. Айала, Ф., Кайгер, Дж. (1988). *Современная генетика*: В 3-х т. Т. 3. М.: Мир, 336 С.

91. Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 3, e3647. doi: 10.1371/journal.pone.0003647.

92. Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One*, 6 (2), e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.

93. Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T. M., Werner, S., Jones, J. D., & Marillonnet, S. (2014). A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS synthetic biology*, 3(11), 839–843.
94. Werner, S., Engler, C., Weber, E., Gruetzner, R., & Marillonnet, S. (2012). Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered*, 3(1), 38–43. doi: 10.4161/bbug.3.1.18223.
95. <https://www.addgene.org/kits/patron-moclo/#protocols-and-resources>
96. Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1, 22-25.
97. Van Die, I., Bergmans, H., Hoekstra, W. (1983). Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence. *Microbiology*, 129, 663–670. doi: 10.1099/00221287-129-3-663.
98. Froger, A. & Hall, J. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 6. e253. doi: 10.3791/253.
99. Lezin, G., Kosaka, Y., Yost, H. J., Kuehn, M. R., & Brunelli, L. (2011). A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PLoS One*, 6(8), e23457.
100. Jyothishwaran, G., Kotresha, D., Selvaraj, T., Srideshikan, S. M., Rajvanshi, P. K., & Jayabaskaran, C. (2007). A modified freeze–thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current science*, 93(6), 770–772.
101. Гнатюк, І.С., Варченко, О.І., Парій, Я.Ф., Кучук, М.В., Парій, М.Ф., Симоненко, Ю.В. *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Селекційно-генетична наука і освіта: матеріали VII міжнародної наукової конференції, Парієві читання* (м. Умань, 19-21 березня 2018). Умань: Видавець "Сочінський М. М.", 2018. С. 51.

102. Гнатюк, І.С., Варченко, О.І., Парій, М.Ф., Симоненко, Ю.В. Ефективна методика регенерації *in vitro* ріпаку озимого *Brassica napus* L. *Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин*: Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю Національної академії аграрних наук України та 110-річчю заснування Інституту рослинництва імені В.Я.Юр'єва НААН (м. Харків, 4-5 липня 2018). Харків, 2018. С. 216–217.

103. Шатоха, Д.Г., Варченко, О.І., Парій, М.Ф., Симоненко, Ю.В., Гнатюк, І.С. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L. лінії вітчизняної селекції. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (м. Київ, 20 травня 2020). Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во "Політехніка", 2020. С. 95.

104. Шатоха, Д. Г., Варченко, О. І., Парій, М. Ф., Симоненко, Ю. В., Гнатюк, І. С. Генетичний аналіз рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L., отриманих після редагування геному вектором, що несе ген синтезу ендонуклеази Cas9. *Селекційно-генетична наука і освіта*: матеріали X міжнародної наукової конференції, Парієві читання (м. Умань, 19 березня 2021). Умань, 2021. С. 249–252.

105. Гнатюк, І. С., Варченко, О. І., Парій, М. Ф., Симоненко, Ю. В. Створення генетичної конструкції для редагування жирнокислотного складу ріпаку. *Біотехнологія: звершення та надії*: збірник тез IX Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції (м. Київ, 20-21 травня 2021). Київ, 2021. С. 85–86.

106. Гнатюк, І. С., Шатоха, Д. Г., Дзуг, М. С., Варченко, О. І., Парій, М. Ф., Симоненко, Ю. В. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин ріпаку озимого *B. napus* L., стійких до гербіциду гліфосату. *Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень*: матеріали науково-

практичної конференції (м. Полтава, 27-28 серпня 2021). Херсон: Видавництво "Молодий вчений", 2021. С. 16–20.

107. Savelieva, E. M. & Tarakanov, I. G. (2014). Control of flowering in canola plants with various response to photoperiodic and low-temperature induction. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*, 2, 57–68.

108. Filek, M., Koscielniak, J., Macháčková, I., Krekule, J. (2007). Generative development of winter rape (*Brassica napus* L.) – The role of vernalization. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1 (1), 57–63.

109. Waalen, W. M., Stavang, J. A., Olsen, J. E., Rognli, O. A. (2014). The relationship between vernalization saturation and the maintenance of freezing tolerance in winter rapeseed. *Environmental and Experimental Botany*, 106, 164–173. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.02.012.

110. Michaels, S. D., Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11 (5), 949–56. doi: 10.1105/tpc.11.5.949.

111. Caicedo, A. L., Stinchcombe, J. R., Olsen, K. M., Schmitt, J., Purugganan, M. D. (2004). Epistatic interaction between *Arabidopsis* *FRI* and *FLC* flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (44), 15670–15675. doi: 10.1073/pnas.0406232101.

112. Amasino, R. (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *The Plant cell*, 16 (10), 2553–2559. doi: 10.1105/tpc.104.161070.

113. Tadege, M., Sheldon, C. C., Helliwell, C. A., Stoutjesdijk, P., Dennis, E. S., Peacock, W. J. (2001). Control of flowering time by FLC orthologues in *Brassica napus*. *The Plant Journal*, 28 (5), 545–553. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01182.x.

114. Wang, N., Qian, W., Suppanz, I., Wei, L., Mao, B., Long, Y., Meng, J., Müller, A., Jung, C. (2011). Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus*

L.) is associated with allelic variation in the FRIGIDA homologue *BnaA.FRI.a*. *Journal of experimental botan.*, 62, 5641–5658. doi: 10.1093/jxb/err249.

115. Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (7) 3753–3758. doi: 10.1073/pnas.97.7.3753.

116. Sebastian, R., Howell, E., King, G. et al. (2000). An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* linkage map from two morphologically distinct doubled-haploid mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 75–81. doi: 10.1007/s001220050011.

117. Raza, A., Farooq, A., Khan, W., Iqbal, A., Çelik, S., Ali, M., Khan, R. (2020). Polymorphic information and genetic diversity in *Brassica* species revealed by RAPD markers. *BIOCELL*, 44, 769–776. doi: 10.32604/biocell.2020.010207.

118. ČUrn, V., Žaludová, J. (2007). Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. *Advances in Botanical Research*, 45, 155–179. doi: 10.1016/S0065-2296(07)45006-6.

119. Fu, F., Liu, X., Wang, R. et al. (2019). Fine mapping of *Brassica napus* blackleg resistance gene Rlm1 through bulked segregant RNA sequencing. *Scientific Reports*, 9, 14600. doi: 10.1038/s41598-019-51191-z.

120. Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica*, 128, 9–17. doi: 10.1023/A:1020691618797.

121. Mahjoob, B., Zarini, H. N., Hashemi, S. H. et al. (2016). Comparison of ISSR, IRAP and REMAP markers for assessing genetic diversity in different species of *Brassica* sp. *Russian Journal of Genetics*, 52, 1272–1281. doi: 10.1134/S1022795416120073.

122. Ziemienowicz, A. (2014). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 95–102, doi: 10.1016/j.bcab.2013.10.004.

123. Opabode, J. T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (1), 12–20. doi: 10.5897/BMBR.9000001.
124. Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et biophysica acta*, 1694 (1-3), 219–234. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.013.
125. Rani, T, Yadav, R., Yadav, N., Rani, A., Singh, D. (2013). Genetic transformation in oilseed brassicas – A review. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83 (4), 367–373.
126. Князев, А. В., Вершинина, З. Р., Баймиев, А. Х., & Чемерис, А. В. (2010). Генетическая трансформация рапса (*Brassica napus* L.) сорта Hanna с помощью *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. *Сельскохозяйственная биология*, (5), 49–54.
127. Van Dorst, B., Mehta, J., Rouah-Martin, E., Backeljau, J., De Coen, W., Eeckhout, D., Robbens, J. (2011). Selection of scFv phages specific for chloramphenicol acetyl transferase (CAT), as alternatives for antibodies in CAT detection assays. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 783–789.
128. Engineer, C. B., Fitzsimmons, K. C., Schmuke, J. J., Dotson, S. B., Kranz, R. G. (2005). Development and evaluation of aGal4-mediated LUC/GFP/GUS enhancer trap system in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 7, 5–9.
129. Raldugina, G. N., Hoang, T. Z., Ngoc, H. B., Karpichev, I. V. (2021). An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 25 (2), 147–156. doi: 10.18699/VJ21.018.
130. Gianessi, L. P. (2013). The increasing importance of herbicides in worldwide crop production, *Pest Management Science*, 69 (10), 1099–1105. doi:10.1002/ps.3598.
131. Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K., Hallas, L. (1992). Inhibitors of amino acid

biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Singh BK, Flores HE, Shannon JC (eds) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants, *American Society of Plant Physiologists*, 7, 139–145.

132. Kishore, G. M., Padgett, S. R., Fraley, R. T. (1992). History of herbicide-tolerant crops, methods of development and current state of the art-emphasis on glyphosate tolerance, *Weed Technology*, 6 (03), 626–634. doi: 10.1017/s0890037x00035934.

133. Krieb, R., Zeng, Q. (2000). *Canola event PV-BNGT04(RT73) and compositions and methods for detection thereof*. Patent No.: CA 2425349 C.

134. Sakhno, L. O. (2015). *Creation of canola plants (Brassica napus L.) bearing heterologous genes of different origins and analysis of their tolerance to abiotic stresses*. – Manuscript. thesis for Dr. Sc. degree in biology (Dr. Sc. Biol.), – Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

135. Kahrizi, D., Salmanian, A. H., Afshari, A., Moieni, A., Mousavi, A. (2007). Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Rep*, 26 (1), 95–104. doi: 10.1007/s00299-006-0208-4.

136. Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., Schönbrunn, E. (2009). Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 -> Ile and Pro101 -> Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 284 (15), 9854–9860. doi: 10.1074/jbc.M809771200.

137. Achary, V. M. M., Sheri, V., Manna, M., Panditi, V., Borphukan, B., Ram, B, Agarwal, A, Fartyal, D, Teotia, D, Masakapalli, S. K., Agrawal, P. K., Reddy, M. K. (2020). Overexpression of improved *EPSPS* gene results in field level glyphosate tolerance and higher grain yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 18 (12), 2504–2519. doi: 10.1111/pbi.13428.

138. Кимиссе, М. Г., Кабардаева, К. В., Гра, О. А., Тюрин, А. А. (2015). Вклад консенсусной 5'-нетранслируемой области в эффективность трансляции гетерологичных генов в растительных клетках. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство*, 3, 56–68. doi: 10.22363/2312-797X-2015-3-56-68.

139. Sugio, T., Satoh, J., Matsuura, H., Shinmyo, A., Kato, K. (2008). The 5'-Untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 300–302. doi: 10.1263/jbb.105.300.

140. Wei, H., Meilan, R., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Strauss, S. H. (2006). Transgenic sterility in *Populus*: expression properties of the poplar PTLF, *Agrobacterium* NOS and two minimal 35S promoters in vegetative tissues. *Tree Physiology*, 26, 401–410. doi.org/10.1093/treephys/26.4.401.

141. Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J., Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31, 691–693. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>.

142. Baltes, N., Hummel, A., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A., Bisaro, D., Voytas, D. (2015). Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants*, 1, e15145. doi: 10.1038/nplants.2015.145.

143. Сахно, Л. А. (2010) Трансгенные растения семейства крестоцветных как продуценты ненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью. *Биотехнология*, 3 (2), 9–18.

144. WHO (2008). *Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat and fatty acids, from the Joint FAO/WHO Expert Consultation on fats and fatty acids in human nutrition*. 10–14 November 2008, WHO: Geneva.

145. Yang, Q., Fan, C., Guo, Z., Qin, J., Wu, J., Li, Q., Fu, T., Zhou, Y. (2012). Identification of *FAD2* and *FAD3* genes in *Brassica napus* genome and

development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents. *Theor Appl Genet*, 125, 715–729. doi: 10.1007/s00122-012-1863-1.

146. Wells, R., Trick, M., Soumpourou, E., Clissold, L., Morgan, C., Werner, P., Gibbard, C., Clarke, M., Jennaway, R., Bankroft, I. (2014). The control of seed oil polyunsaturate content in the polyploid crop species *Brassica napus*. *Mol Breeding*, 33, 349–362. doi: 10.1007/s11032-013-9954-5.

147. Ward, C. (2013). The development of DHA canola, a sustainable source of essential long-chain omega-3 oils. *CSIROPedia*. Retrieved from <https://csiropedia.csiro.au/dha-canola/>.

148. Nuseed Omega-3. First land-based source of DHA essential nutrients (<https://nuseed.com/omega-3-canola-program/>).

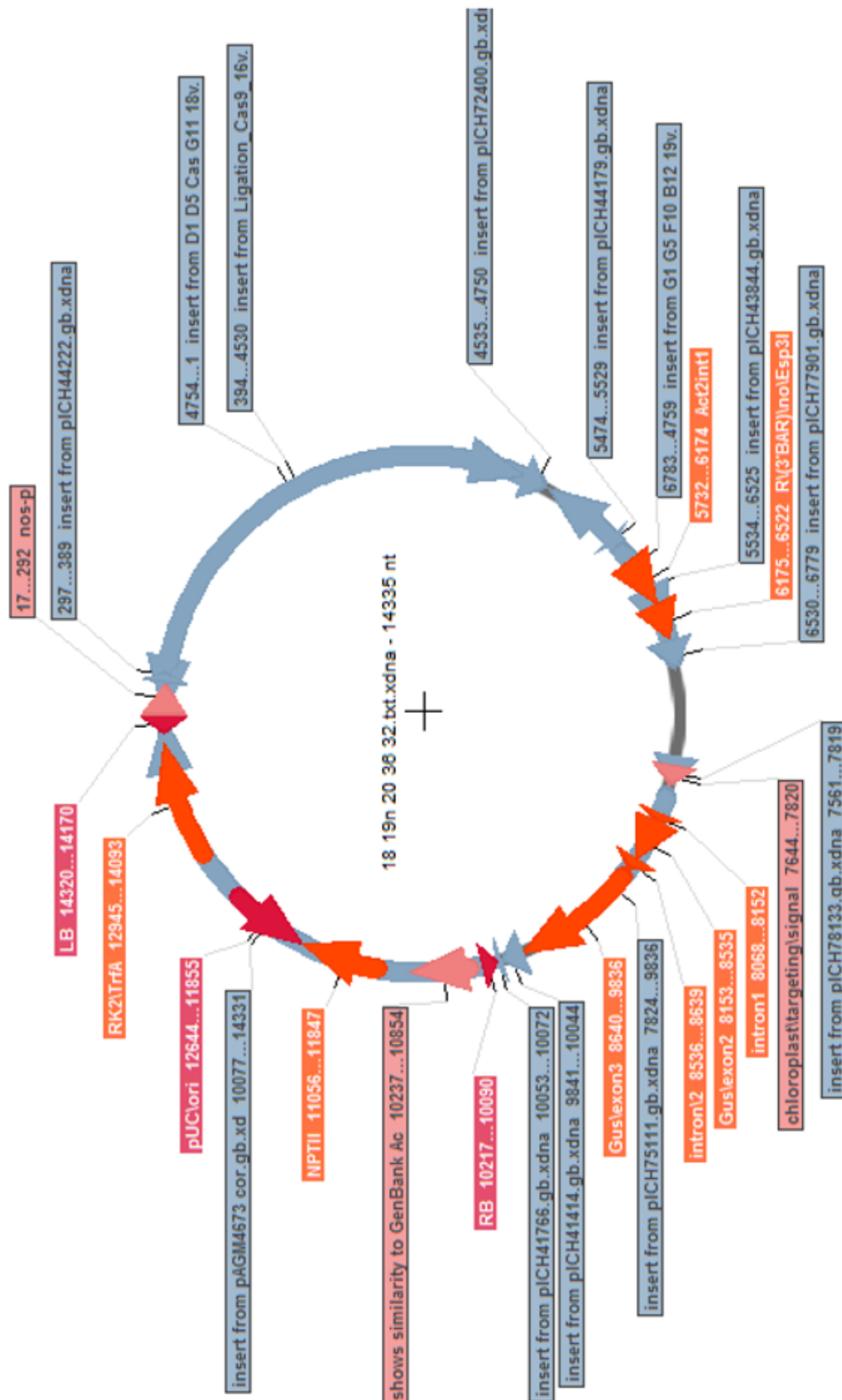
149. Ali, Z., Abulfaraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Baltes, N., Voytas, D., Dinesh-Kumar, S., Mahfouz, M. M. (2015). Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System, *Molecular Plant*, 8 (8), 1288–1291, doi: 10.1016/j.molp.2015.02.011.

150. Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., Mahfouz, M. M. (2015). *CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants*. *Genome Biology*, 16 (1), 238. doi:10.1186/s13059-015-0799-6.

151. Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N., & Imai, R. (2018). Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Scientific reports*, 8(1), 1–7.

Додаток А

Комп'ютерне моделювання *in silico* плазмід рSPE2053, що містить ген бактеріального білка Cas9, ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar* та ген β -глюкуронідази *gus* (програма *SerialCloner*)



Додаток Б

Акт впровадження результатів науково-дослідницької роботи в проектну документацію ТОВ «БЕТА НК»

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України



М.В. Кучук
«20» жовтня 2021 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «БЕТА НК»



М.Ф. Парій
«20» жовтня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів науково-дослідницької роботи

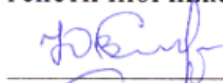
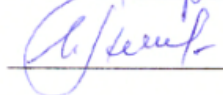
Ми, що підписалися нижче, представники Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України – к.б.н Симоненко Ю.В., пров. інж. Гнатюк І. С. з однієї сторони та представники Товариства з обмеженою відповідальністю «БЕТА НК» 08160, Київська обл., Києво-Святошинський район, село Гатне, вулиця Швеця, будинок 52-Б

в особі директора Парія М.Ф.

склали цей акт про те, що результати дисертаційної роботи Гнатюк І. С. за темою: «Застосування прийомів генетичної інженерії для отримання біотехнологічних рослин та редагування геному ріпаку озимого *Brassica napus* L.» у вигляді протоколів «Теоретичні підходи у створенні біотехнологічних рослин ріпаку» впровадженні у науково-практичну роботу відділу біотехнології ТОВ «БЕТА НК». Це дало можливість підвищити ефективність роботи відділу у вирішенні задач щодо створення біотехнологічних рослин ріпаку.

Назва впровадженого результату	Форма упровадження	Ефект від упровадження
«Теоретичні підходи у створенні біотехнологічних рослин ріпаку»	Удосконалення протоколів та вибір генів-мішеней для створення біотехнологічних рослин ріпаку	Удосконалення протоколів та вибір генів-мішеней для створення біотехнологічних рослин ріпаку дозволило підвищити результативність роботи вдвічі та отримати понад 100 незалежних трансформаційних подій ріпаку

Від Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Симоненко Ю.В.

Гнатюк І. С.

Від ТОВ «БЕТА НК»



Парій М. Ф.

Додаток В

Список опублікованих праць за темою дисертації

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко, Ю.В. Підбір селективних концентрацій гліфосату для ефективного відбору *in vitro* трансгенних тканин озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 197–201. doi:10.7124/FEEO.v25.1164.
2. Hnatyuk I.S., Varchenko O.I., Kuchuk M.V., Parii M.F., Symonenko Yu.V. Development of an effective *in vitro* regeneration system for Ukrainian breeding winter rape *Brassica napus* L. *Cytology and Genetics*. 2020. Vol. 54, No. 4. P. 341–346. doi:10.3103/S0095452720040039.
3. Hnatiuk I.S., Varchenko O.I., Bannikova M.O., Kuchuk M.V., Parii M.F., Symonenko Yu.V. Development of an effective technique for *in vitro* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of winter rape *Brassica napus* L. *AgroLife Scientific Journal*. 2020. Vol. 9, No. 1. P. 149–155.
4. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. Створення генетичного вектору для редагування геному рослин, що несе ген синтезу бактеріального білка Cas9. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 176–182. doi:10.7124/FEEO.v26.1263.
5. Hnatyuk I.S., Varchenko O.I., Kuchuk M.V., Parii M.F., Symonenko Yu.V. Creation of winter rapeseed *Brassica napus* L. commercial line of biotechnological plants, resistant to the glyphosate action. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36, No. 6. P. 423–432. doi:10.7124/bc.000A40.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій Я.Ф., Кучук М.В., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація озимого ріпаку *Brassica napus* L. *Селекційно-генетична наука і освіта: матеріали VII міжнародної наукової конференції, Парієві читання*

(м. Умань, 19-21 березня 2018). Умань: Видавець "Сочінський М. М.", 2018. С. 51.

7. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. Ефективна методика регенерації *in vitro* ріпаку озимого *Brassica napus* L. *Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин*: Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю Національної академії аграрних наук України та 110-річчю заснування Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН (м. Харків, 4-5 липня 2018). Харків, 2018. С. 216–217.

8. Шатоха Д.Г., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В., Гнатюк І.С. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L. лінії вітчизняної селекції. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (м. Київ, 20 травня 2020). Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во "Політехніка", 2020. С. 95.

9. Гнатюк І.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. Створення генетичної конструкції для редагування жирнокислотного складу ріпаку. *Біотехнологія: звершення та надії*: збірник тез IX Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції (м. Київ, 20-21 травня 2021). Київ, 2021. С. 85–86.

10. Шатоха Д.Г., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В., Гнатюк І.С. Генетичний аналіз рослин озимого ріпаку *Brassica napus* L., отриманих після редагування геному вектором, що несе ген синтезу ендонуклеази Cas9. *Селекційно-генетична наука і освіта*: матеріали X міжнародної наукової конференції, Парієві читання (м. Умань, 19 березня 2021). Умань, 2021. С. 249–252.

11. Гнатюк І.С., Шатоха Д.Г., Дзуг М.С., Варченко О.І., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин

ріпаку озимого *B. parris* L., стійких до гербіциду гліфосату. *Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень*: матеріали науково-практичної конференції (м. Полтава, 27-28 серпня 2021). Херсон: Видавництво "Молодий вчений", 2021. С. 16–20.