

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1730 “С” 2022.09.12. 04 ПЗ

МАЦКЕВИЧ ОКСАНИ ВЯЧЕСЛАВІВНИ

2022 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

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

НУБІП України

УДК 602.6:633.15

ПОГОДЖЕНО
Лекан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
В.о. завідувача кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

(підпис) **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
(ПІБ)

(підпис) **Олена КВАСКО**
(ПІБ)

“ ” _____ 2022 р. “ ” _____ 2022 р.

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «ТРАНЗИЄНТНА ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КУКУРУДЗИ»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

НУБІП України

Гарант освітньої програми
д.с.г.н., професор

(підпис) **Микола ЛІСОВИЙ**
(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи
к.б.н., доцент

(підпис) **Катерина ГРИНЧУК**
(ПІБ)

Виконав

(підпис) **Оксана МАЦКЕВИЧ**
(ПІБ студента)

НУБІП України

КИЇВ – 2022

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о.завідувача кафедри екобіотехнології
та біоінженерії

к.б.н., _____ Олена КВАСКО
(підпис)

“ _____ ” _____ 2022 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Мацкевич Оксана Вячеславівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Транзйентна генетична трансформація кукурудзи»
затверджена наказом ректора НУБіП України від _____

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

(рок, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: закони та нормативно-правові акти
України; словникові та довідникові джерела; тези; електронні джерела; іноземні джерела

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Проаналізувати літературні дані, щодо методів транзйентної трансформації рослин, а саме кукурудзи.
2. Практично відпрацювати метод транзйентної трансформації кукурудзи та проаналізувати результати.
3. Надати рекомендації щодо використання методу транзйентної трансформації кукурудзи.

Дата видачі завдання _____

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____

(підпис)

Катерина ГРИНЧУК
(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____

(підпис)

Оксана МАЦКЕВИЧ
(прізвище та ініціали студента)

РЕФЕРАТ

магістерської кваліфікаційної роботи
Мацкевич Оксани Вячеславівни

на тему: «Транзйентна генетична трансформація кукурудзи»

Структура магістерської кваліфікаційної роботи має титульну сторінку, перелік умовних скорочень, зміст, вступ, три розділи, список використаної літератури. Робота має 18 ілюстрацій, з них 3 таблиць та 15 рисунків. У списку використаної літератури 54 джерела. Загальний обсяг роботи – 53 ст.

Актуальність обраної теми дослідження. Щороку збільшується попит на використання в комерційній діяльності генетично змінених організмів. Однак, не лише стабільно трансформовані рослини, а й транзйентні широко використовуються у людській діяльності. Вони вирішують такі проблеми, як:

пришвидщення створення стабільно генетично трансформованих рослин, шляхом перевірки експресії генів в конкретному організмі перед довготривалим процесом генної інженерії, синтез фармацевтично важливих речовин в транзйентних рослинах; підвищення урожайності кукурудзи за допомогою транзйентної експресії гену *zmm 28*. Існують різноманітні методи для створення

таких рослин для задоволення певних потреб, однак для кожного шлі та окремого виду рослин потрібно підбирати та відпрацьовувати конкретні методи. Найбільш швидким, дешевим та якісним методом є агробактеріальна інфільтрація рослин.

Тому для масштабування процесу промислового створення транзйентних рослин з корисними властивостями слід на даному організмі, в нашому випадку кукурудзі, відпрацьовати метод транзйентної трансформації.

Мета дипломної роботи: відпрацьовати метод транзйентної трансформації кукурудзи.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання:

4. Проаналізувати літературні дані, щодо методів транзйентної трансформації рослин, а саме кукурудзи.

5. Практично відпрацювати метод транзійтної трансформації кукурудзи та проаналізувати результати.

6. Надати рекомендації щодо використання методу транзійтної трансформації кукурудзи.

Об'єктом дослідження є процес відпрацювання методу транзійтної трансформації кукурудзи.

Предметом дослідження є організація та практичне відпрацювання методу транзійтної трансформації кукурудзи.

Теоретичною цінністю і прикладною значущістю результатів даної роботи є практичне відпрацювання методу транзійтної трансформації кукурудзи, що в майбутньому допоможе при створенні транзійтних рослин з бажаними корисними властивостями.

В першому розділі проаналізовано літературні дані щодо методів створення транзійтних рослин та їх використання.

В другому розділі висвітлено методику транзійтної трансформації тютюну для перевірки експресії генетичних контерукцій та методику трансформації кукурудзи.

В третьому розділі надано рекомендації з використання методу.

Сформовано висновки згідно поставлених завдань.

Ключові слова: кукурудза, тютюн, агробактерія, транзійтна трансформація, експресія.

НУБІП України

НУБІП України

Реферат	1
Перелік умовних скорочень	4
Вступ	5
Розділ 1/ Аналіз літературних даних про транзійтну трансформацію рослин	7
1.1. Аналіз даних про вирощування та виробництво кукурудзи в світі	7
1.2. Аналіз методів створення транзійтної генетично модифікованої кукурудзи	10
1.3. Використання транзійтних рослин	20
Розділ 2 Матеріали і методи використані для проведення транзійтної трансформації кукурудзи	28
2.1. Транзійтна трансформація рослин <i>Nicotiana rustica</i> для перевірки експресії генетичних конструкцій	28
2.1.1. Аналіз експресії маркерного гену GFP	30
2.2. Транзійтна трансформація кукурудзи	30
2.2.1. Аналіз експресії маркерного GUS в рослинах кукурудзи	32
Розділ 3 Обговорення результатів	34
3.1. Перевірка експресії генетичних конструкцій у транзійтно трансформованих рослин <i>Nicotiana rustica</i>	35
3.2. Транзійтна трансформація кукурудзи та детекція експресії маркерного гену GUS	38
3.3. Рекомендації щодо практичного використання транзійтної трансформації кукурудзи	45
Висновки	47
Список використаної літератури	49

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

НУБІП України

MP – маркетинговий рік;

GMO – генетично модифікований організм;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

НУБІП України

Bt Corn – тип генетично модифікованої кукурудзи;

GUS – маркерний ген β -глюкурунідази;

GFP – маркерний ген зелений флуорисцентний білок.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Актуальність обраної теми дослідження. Щороку збільшується попит на використання в комерційній діяльності генетично змінених організмів. Однак, не лише стабільно трансформовані рослини, а й транзйентні широко використовуються у людській діяльності. Вони вирішують такі проблеми, як:

підвищення створення стабільно генетично трансформованих рослин, шляхом перевірки експресії генів в конкретному організмі перед довготривалим процесом генної інженерії; синтез фармацевтично важливих речовин в транзйентних рослинах; підвищення урожайності кукурудзи за допомогою

транзйентної експресії гену zmm28. Існують різноманітні методи для створення таких рослин для задоволення певних потреб, однак для кожної цілі та окремого виду рослин потрібно підбирати та відпрацьовувати конкретні методи. Найбільш швидким, дешевим та якісним методом є агробактеріальна інфільтрація рослин.

Тому для масштабування процесу промислового створення транзйентних рослин з корисними властивостями слід на даному організмі, в нашому випадку кукурудзі, відпрацьовувати метод транзйентної трансформації.

Мета дипломної роботи: відпрацьовувати метод транзйентної трансформації кукурудзи.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання:

7. Проаналізувати літературні дані, щодо методів транзйентної трансформації рослин, а саме кукурудзи.
8. Практично відпрацьовувати метод транзйентної трансформації кукурудзи та проаналізувати результати.
9. Надати рекомендації щодо використання методу транзйентної трансформації кукурудзи.

Об'єктом дослідження є процес відпрацьовування методу транзйентної трансформації кукурудзи.

Предметом дослідження є організація та практичне відпрацьовування методу транзйентної трансформації кукурудзи.

В даній роботі використовувались такі методи дослідження: порівняння (для аналізу методів транз'єнтної трансформації рослин), спостереження (для аналізу експресії маркерних генів), метод ідентичних умов (для перевірки експресії генетичних конструкцій в рослинах тютюну), моделювання (для створення методу транз'єнтної трансформації кукурудзи на основі методу такої трансформації рослин тютюну).

Теоретичною цінністю і прикладною значущістю результатів даної роботи є практичне відпрацювання методу транз'єнтної трансформації кукурудзи, що в майбутньому допоможе при створенні транз'єнтних рослин з бажаними корисними властивостями.

Апробація даних магістерської роботи. Мацкевич О.В., Принчук К.В.
Методи створення транз'єнтних рослин та їх застосування; тези наук. доп. VII Всеукраїнська науково-практична конференція присвячена 100-річчю кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології ім. І.П. ЧУЧМІЯ Уманського НУС., м. Умань, 4 листопада 2022р.

Структура роботи: складається з вступу, трьох розділів, висновку, списку використаної літератури.

РОЗДІЛ 1

НАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ПРО ТРАНЗИЄНТНУ ТРАНСФОРМАЦІЮ РОСЛИН

1.1. Аналіз даних про вирощування та виробництва кукурудзи в світі

Кукурудза є однією з найважливіших рослин у світі, та являється лідером зернового балансу планети. Це друга за об'ємами вирощування культура і найбільш вирощувана зернова культура у світі, у 2019 році вироблено понад 1 мільярд тон. Географічно більшість продукції з кукурудзи походить з Америки та Південно-Східної Азії, причому на США, Китай і Бразилію припадає понад 65% кукурудзи, виробленої в усьому світі в 2020 році, а США є основним виробником і споживачем кукурудзи в світі [2]. Щороку активно збільшується попит на цю зернову культуру і відповідно збільшуються експортні потужності країн, що вказано в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

Динаміка світового експорту кукурудзи, млн тонн

№	Країна	2020/2021 МР	2019/2020 МР
1	США	58	47
2	Бразилія	39	33
3	Аргентина	34	38,5
4	Україна	32,5	30,5
5	Росія	3,9	4,2
6	Сербія	2,92	2,8
7	ЄС	2,7	4,8
8	Парагвай	2,5	2,3
9	Південна Африка	5,3	2,5
10	Бірма	1,8	2,15

Джерело: [2].

Кукурудза залишається однією з найважливіших культур для безпосереднього споживання людиною, особливо в країнах Африки та

Центральній Америці, Лесото, Малаві, Замбії, Зімбабве, Південній Африці та Мексиці.

Ця рослина також використовується як важлива частина корму для худоби, оскільки 36% виробленої у всьому світі кукурудзи використовується як корм для тварин; у США відсоток досягає 67%. Така важливість також підтверджується

використанням кукурудзи в паливній промисловості для виробництва біоетанолу – 98% усіх видів рослин, що використовуються в США, 70% частки в Китаї та Канаді, а також виробництво кукурудзяного крохмалю, кукурудзяної олії та кукурудзяного підсолоджувача. – з обсягом споживання кукурудзи за

вагою 6,1 і 21,1 тон відповідно – частка 7,9% від загального використання кукурудзи [3].

Походження кукурудзи, яка використовується як сільськогосподарсько значуща культура, бере свій початок приблизно 9000 років тому в регіоні

Центральної Америки, особливо в сучасній Мексиці. Навіть якщо існує багато різних теорій про фактичного генетичного попередника кукурудзи, найбільш визнана гіпотеза припускає, що вона походить від рослин теосинту, групи диких родичів кукурудзи [4]. Селекційні зусилля, вжиті місцевими жителями для

одомашнення кукурудзи, призвели до модифікації фенотипу з сильною високої трави з кількома стеблами на міцну рослину з одним стеблом із великими зернами, вирівняними в кілька рядів.

Основною метою досліджень кукурудзи протягом 20-го століття була розробка ліній з високою адаптивністю до різних середовищ, а також великою кількістю зерна, яке можна було б переробити без будь-якого зниження якості кінцевого продукту. Високі властивості адаптації є вирішальними для створення важливих у сільському господарстві ліній кукурудзи. Сорти, що володіють цими властивостями, можна вирощувати в різних умовах: від сухих до вологих, від низьких температур вирощування до високих. Такі риси охоплюють стійкість до абіотичних стресів, таких як посуха, повені, засолення ґрунту або біотичний стрес грибкових, бактеріальних або навіть тваринних паразитів.

Урожайність сортів та гібридів генетично модифікованої кукурудзи з роками зростає з 5,6 % до 24,5%. Також такі рослини мають менший відсоток хвороб, що призводить до економічної вигоди при їх промисловому вирощуванні. Найбільші площі вирощування ГМО кукурудзи мають США, Бразилія, Аргентина та Канада [41].

У сучасних дослідженнях рослин кукурудза є важливим модельним організмом, що проявляється різними перевагами. Її притаманна генетична різноманітність і вирощування, яке дозволяє рослині рости в умовах географічної широти від 40°S до 58°N, тому її можна вирощувати в польових

умовах дослідниками в усьому світі [5]. Її фізіологічна характеристика однодомної рослини з одностатевими квітками відрізняє кукурудзу від інших злаків з двостатевими квітками, які повинні піддаватися зусиллям, щоб запобігти самозапиленню в лабораторних умовах. Крім того, кукурудза дає сотні зерен після одного схрещування, забезпечуючи селекціонерів практично необмеженою кількістю селекційного матеріалу для подальшої роботи.

Зі зміною клімату та умов вирощування сільськогосподарських рослин, зростанням резистентності рослин до шкідників, у світі збільшується тенденція використання генетично модифікованих рослин. Селекціонери активно працюють над створенням нових сортів та гібридів кукурудзи з рисами, які зможуть покращити врожайність культури та її стійкість до шкідників та хвороб. Генна інженерія рослин є корисною для створення нових сортів із потрібними властивостями швидше, ніж традиційна селекція рослин, із більш специфічним способом зміни геному. Однак у створенні генетично зміненої кукурудзи все ще є бар'єри, які необхідно подолати, передусім залежність результату трансформації від генотипу, регенерації стабільних трансформантів за допомогою культури рослинних тканин та трудомісткість використовуваних протоколів.

Отже, виробництво кукурудзи у світі посідає перші місця з виробництва сільськогосподарських культур. Щороку збільшується вирощування та виробництво цієї культури, адже постійно зростають об'єми її споживання. Для

задоволення багатьох потреб виробників цієї рослини розвиваються дослідження з її генетичної трансформації. Ці дослідження мають успіх, адже в багатьох країнах вирощується ГМО кукурудза, яка задовольняє потреби у промисловому використанні цієї рослини.

1.2. Аналіз методів створення транз'єнтної генетично модифікованої кукурудзи

Через велике навантаження на створення нових сортів сільськогосподарських культур без використання трудомістких традиційних методів було зосереджено увагу на створенні методів, які використовують рослину на клітинному або тканинному рівні, а не рослину загалом. Культура рослинної тканини, яку можна описати як культивування рослинних клітин *in vitro* в суворо встановлених, відтворюваних і стерильних умовах, виявилася необхідною для створення протоколів для швидкого культивування зрілих рослин із окремих тканин, їх розмноження шляхом виробництва клонів, фланкування насіння -стадії рослини або для розмноження рослин із природно погано проростаючого насіння. Щоб успішно створювати трансформовані клітини, процес має пройти дві важливі події: 1 - ендогенне введення чужорідної ДНК і 2 - включення молекули в геном. Ці події називаються тимчасовою та стабільною трансформацією відповідно [6].

Основна відмінність між традиційними методами селекції та трансформацією полягає в тому, що трансформація дозволяє точно ввести потрібний ген у рослину, яка модифікуватиметься більш контрольованим способом. Крім того, метод генетичної трансформації може використовувати введення чужорідних генів в організм, таким чином можливе використання більше доступних генів.

Спроби перенести чужорідні гени в кукурудзу були зроблені ще в 1960-х роках, однак про перший успішний експеримент з трансформованою кукурудзою було повідомлено в 1986 році, але жодна фертильна рослина не

виробляла пиліок. Першою трансгенною рослиною кукурудзи, запущеною в комерційну продукцію в 1996 році в США, була Bt Corn – сорт кукурудзи, стійкий до паразитів європейського кукурудзяного метеллика, і вже до 2015 року було схвалено 143 трансгенні види кукурудзи, які становили приблизно 30% площі всіх біотехнологічно вдосконалених культур [7].

Покращення у рослинах ознак важливих для виробництва можливе не лише за рахунок стабільної генетичної трансформації, а також і за використання методів нестабільної – транзійтної. В рослинних тканинах можливо синтезувати цінні в сфері фармацевтики такі білки як: інсулін, моноклональні антитіла, гормон росту людини, та інші [11, 12].

На сьогодні існує три основні методи створення транзійтної генетичної трансформації рослин – електропорація, бомбардування частинками та опосередкована *A. tumefaciens* трансформація, які зображено на прикладі кукурудзи на рис. 1.1..

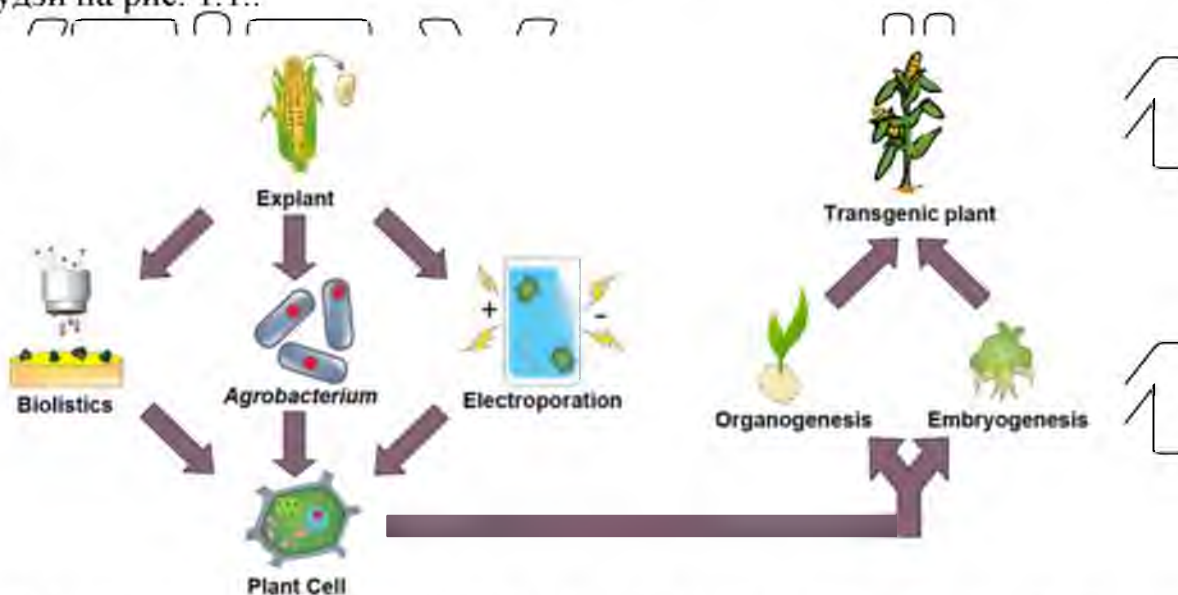


Рисунок 1.1. Спрощена схема основних методів транзійтної генетичної трансформації кукурудзи.

Джерело: [8, ст. 12]

Електропорація — це фізичний метод трансформації, який використовує електричний імпульс для створення тимчасових пор у клітинних мембранах, через які такі речовини, як нуклеїнові кислоти, можуть проходити в клітини. Це

високоєфективний метод для введення чужорідних нуклеїнових кислот у багато типів клітин, включаючи бактерії та клітини ссавців.

Електропорація заснована на простому процесі. Клітини-господарі та вибрані молекули суспендовані в розчині, і навколо суміші замикається електричний ланцюг. Через клітинну суспензію розряджається електричний імпульс з оптимізованою напругою, який триває лише від кількох мікросекунд до мілісекунд. Це порушує подвійний фосфоліпідний шар мембрани та призводить до утворення тимчасових пор. Електричний потенціал на клітинній мембрані одночасно підвищується, щоб дозволити зарядженим молекулам,

таким як ДНК, проходити через мембрану через пори способом, подібним до електрофорезу. Основною перевагою електропорації є її застосування для тимчасової та стабільної трансформації всіх типів клітин. Крім того, оскільки електропорація проста і швидка, з її допомогою можлива трансформація великої

кількості клітин за короткий час, після визначення оптимальних умов для електропорації. Основним недоліком електропорації є значна загибель клітин, спричинена імпульсами високої напруги, і лише частково успішне відновлення мембрани, що вимагає використання більшої кількості клітин порівняно з методами хімічної трансформації [9].

Цей метод належить до перших методів, які використовуються для перенесення чужорідних генів у клітини кукурудзи. Підготовка протопластів кукурудзи зазвичай здійснюється шляхом виділення з кашосної культури та подальшої деградації клітинної стінки з використанням суміші ферментів целюлази та пектинази. Калюси зазвичай отримують з незрілих зародків, вирощених у культурі експлантів *in vitro*. Альтернативним способом руйнування клітинної мембрани за допомогою електричного струму є використання хімічної речовини поліетиленгліколю. Це органічна речовина, нетоксична для рослинних клітин, яка діє руйнуючи плазмалему [10].

На жаль, електропорація все ще залишається досить жорсткою для використовуваних клітин, а протоколи, що вимагають обробки електрикою, залишаються трудомісткими, що є ще більш складним для однодольних рослин,

чий соматичні клітини, такі як клітини мезофілу, не можуть бути використані для ізоляції протопластів. Це змушує будь-якого дослідника вдаватися до роботи з громіздкими культурами ембріонних клітин. Крім того, культивування протопластів протягом тривалого часу зазвичай призводить до втрати здатності до регенерації, що прогнозує, що метод значною мірою неефективний.

Ще одним методом транзійтної трансформації рослин є біолістична трансформація. Вона була вперше зареєстрована в 1987 році як альтернатива електропорації, особливо для видів, які погано піддаються генетичній трансформації (таких як авокадо, манго та персики) [13].

Біолістичну трансформацію можна визначити як введення речовин у непошкоджені клітини та тканини за допомогою високошвидкісних носіїв з нафесеною на них ДНК. Оскільки біолістичний процес є прямим методом перенесення генів він не має швидкого механізму хромосомної інтеграції чужорідної ДНК. Таким чином, подія інтеграції, що виникає в результаті біолістичного процесу, залежатиме від ДНК, що доставляється, і біології організму, який необхідно трансформувати [14].

У біолістиці процес починається зі змішування ДНК з частинками важкого металу, зазвичай вольфраму або золота. Ці дрібні частинки прилипають до негативно зарядженої ДНК. Частинки ДНК з металом завантажуються в генну гармату, а газ під тиском, гелій, забезпечує силу гармати. Потім частина металевих частинок проникне через клітинні мембрани і доставить ДНК до клітин. Схематично процес зображено на рис. 1.2..

H

Biolistic

GOLDBIO

H



H

DNA and gold particles are mixed

DNA/gold particles in the gene gun are shot to the cells

Metal particles penetrate the membrane and deliver DNA to the cells

Рисунок 1.2. Етапи проведення біолістичної трансформації
Джерело: [42]

Мільйони металевих частинок, покритих ДНК, стріляють у клітини-мішені або тканини за допомогою біолістичного пристрою або генної гармати. ДНК вимивається з частинок, які осідають усередині клітин, і частина може бути стабільно включена в хромосоми господаря. За допомогою доставки частинок з ДНК — це метод трансформації, за якого використовують тиск гелію для введення мікроносіїв, покритих ДНК, у клітини. Цим методом можна трансформувати такі різноманітні цілі, як клітини бактерій, грибів, комах, рослин і тварин, а також внутрішньоклітинні органели. Така доставка частинок з ДНК є зручним методом трансформації неушкоджених клітин у культурі *in vitro*, оскільки необхідні мінімальні маніпуляції до та після використання цього методу. Крім того, цю техніку набагато легше та швидше виконати, ніж виснажливе завдання електропорації. За допомогою біолістичної системи доставки частинок з ДНК можлива як стабільна так і тимчасова трансформація.

H

5. Інтеграція та експресія Т-ДНК у геномі рослин [17].

Agrobacterium tumefaciens, яка є паличкоподібною грамнегативною ґрунтовою бактерією, використовується як посередник вектора, вставляючи чужорідну молекулу ДНК всередину клітини рослини. Щоб ввести свою плазмиду, що містить Т-ДНК, всередину клітини, *Agrobacterium* природним чином використовує відкриті рани, щоб перетнути клітинні стінки. Після поранення пошкоджені клітини коренів дводольних рослин виробляють і накопичують фенольні вторинні метаболіти такі як ацетосерингон або гідроксіяцетосирингон, які захищають ділянку від нематод, комах, грибів або бактерій [18]. Однак ці

сполуки приваблюють симбіотичні бактерії, що фіксують азот, такі як *Agrobacterium* і *Rhizobium*, які можуть проникати в тканину. Це відбувається шляхом індукції патогенних генів VIR, розташованих на плазміді Ті, що індуктує пухлину, разом із сегментом Т-ДНК, який інтегрується у власний геном рослинної клітини, що містить гени для біосинтезу опінів, таких як нопалін або октолін – поживних речовин, важливих для виживання бактерій [19].

Відкриття міжвидового перенесення ДНК забезпечило систему передачі генів, хоча для досягнення повного потенціалу були необхідні деякі модифікації.

Добре відомо, що хвороботворна бактерія *Agrobacterium* запускає неконтрольований поділ клітин, керований синтезом ауксинів, таких як індол-3-оцтова кислота, або цитокінінів, таких як зеатин, шлях біосинтезу якого кодується плазмідною Ті. Таким чином ріст кореневої пухлини обмежував би застосування методу. У результаті всі онкогени (гени, відповідальні за утворення пухлини) довелося штучно видалити з плазмиди бактерії [20].

Оскільки включення Т-ДНК в геном рослини є рідкісним, вченим довелося розробити систему, яка дозволила б дослідникам легко ідентифікувати трансформовані рослини порівняно з нетрансформованими. Найзручніше було вставити маркерний ген – ген, який допомагає визначити, чи була введена чужорідна ДНК – оточена регуляторною послідовністю рослини, в область Т-ДНК разом із цікавим геном. Такі маркерні гени можуть мати біохімічний ефект, надаючи трансформованим рослинам перевагу над нетрансформованими

(стійкість до антибіотиків або гербіцидів) або спектроскопічним, що робить трансформовані рослини візуально відмінними від нетрансформованих (наприклад, фермент β -глюкуронідаза, що катаболізує перетворення безбарвного субстрату в кольоровий продукт) [21].

Перші експерименти з трансформації кукурудзи з використанням *Agrobacterium* відносяться до 1990-х років, через десять років після перших високоефективних експериментів з трансформації на початку 1980-х років, результати були дещо непримітними. Перша дослідницька група, яка встановила високий вихід трансформованих експлантів - 5-30% від загальної кількості [22],

перерахувала кілька факторів, таких як: тип експлантату, бактеріальний штам, склад середовища або бактеріальний склад, які критичні для досягнення високого виходу трансформованих експлантів кукурудзи, що довело необхідність подальшої оптимізації цього методу. Щоб подолати обмеження, пов'язані зі стійкістю кукурудзи до *Agrobacterium*, кілька дослідницьких груп намагалися створити ефективні системи трансформації, вивчаючи агроінфільтрацію та мікроін'єкцію бактерією у меристеми пагонів.

Генетична трансформація рослин, опосередкована агробактерією, яка доставляє та інтегрує вірулентну ДНК (перенесену ДНК, Т-ДНК) у рослинні клітини, спочатку вважалася рідкісним прикладом природного перенесення ДНК між царствами. Однак дослідження показали, що горизонтальний перенос генів є значно менш рідкісним, ніж вважалось раніше [23], нещодавно було продемонстровано, що агробактеріальна інфекція рослинних тканин (тобто експресія генів, що містять Т-ДНК) може відбуватися тимчасово або стабільно.

Припускають, що швидка тимчасова експресія в рослинах переважно відбувається з копій Т-ДНК, які не інтегровані в геном хазяїна, але демонструють високі рівні експресії [24]. І навпаки, стабільна трансформація зазвичай вимагає кількох місяців для отримання першого покоління трансформованих рослин.

Новий підхід до тимчасової експресії може досягти високих рівнів експресії в інфікованих тканинах шляхом доставки набагато більшої кількості копій Т-ДНК у рослинні клітини, а ніж одна або кілька копій, які зазвичай інтегруються в

геном хазяїна через стабільний процес перетворення. Хоча агробактеріально-опосередкована стабільна трансформація рослин широко використовується в сільському господарстві і необхідна для багатьох аспектів рослинництва, останнім часом увага також приділяється транзентній трансформації рослин [25]. Метод тимчасової агроінфільтрації [26] забезпечує швидке та масштабоване виробництво рекомбінантного білку, дослідження субклітинної локалізації субклітинної локалізації білка та білок-білкових взаємодій, а також розробку функціональних геномних аналізів.

Як ефективний інструмент для вивчення функції генних продуктів є тимчасова експресія генів, яка забезпечує зручну альтернативу стабільній трансформації. Незважаючи на те, що агроінфільтрація широко використовується для *Nicotiana benthamiana* для швидкої оцінки функції генів і досліджень взаємодії білків, її використання обмежується процесами, які природно відбуваються в цьому виді. В даний час тимчасова експресія не працює ефективно в багатьох інших видах/тканинах рослин, включаючи модельний вид рослин для трансформації - арабідопсис. Він залишається найбільш широко трансформованим видом (переважно за допомогою методів трансформації на основі занурення квітів) [27], завдяки великій кількості доступних генетичних інструментів і ресурсів. Хоча стабільні системи трансформації, такі як квіткове занурення, забезпечили потенціал для мутантної комплементации, а також здатність зв'язувати експресію генів з маркерними білками для дослідження глобальної експресії генів, системи тимчасової експресії забезпечили зручну альтернативу через ефективність часу та праці [24]. Агробактеріально опосередковану трансформацію проростків успішно використовували для експресії широкого спектру конструкцій, керованих різними промоторами, у сім'ядолях рослин *арабідопсису* різного генетичного походження [28]. Крім того, тимчасова трансформація проростків і листя *арабідопсису* шляхом біолітичної бомбардування або інфільтрації а агробактерій створена [29]. Однак жоден із цих методів не набув широкого поширення через вимоги до спеціального обладнання, використання дорогих мікрочастинок золота і, ще

найкритичніше, через надзвичайно низьку ефективність трансформації. Труднощі тимчасової трансформації арабідопсису пов'язані з імунною реакцією рослин, викликаною сприйняттям *Agrobacterium* [30].

Оскільки метод надійної тимчасової трансформації генів у різних видів міг би значно підвищити здатність оцінювати функцію білка, локалізацію та взаємодію залежно від виду чи незалежно від нього, існує нагальна потреба в розробці такого методу.

Тимчасова (транзйентна) трансформація рослин дозволяє тимчасово вводити або замовчувати гени для визначення їх експресії; таким чином: чужорідна ДНК не інтегрується в клітину хазяїна. Цей метод в основному використовується для вивчення функції гена або поведінки промотора та функції білка. Його також можна використовувати для глушіння генів шляхом експресії малих інтерферуючих РНК (si RNA) і мікро РНК (mi RNA) у рослинних тканинах. У цьому випадку тимчасова трансформація може тривати дні або тижні [44].

Останні розробки в методах тимчасової експресії дозволили ефективно доставляти та експресувати декілька генів в одній рослинній клітині протягом кількох днів. Це відкрило шлях до застосування тимчасової експресії для таких застосувань, як: виробництво макромолекулярних комплексів та аналіз і маніпулювання метаболічними шляхами. Можливість спостерігати ефект експресії генів протягом кількох днів означає, що тимчасова експресія стає методом вибору для багатьох застосувань синтетичної біології на основі рослин.

Останніми роками розробка та застосування систем тимчасової експресії призвело до значних успіхів у здатності застосовувати принципи синтетичної біології до рослин. Традиційно модифікація рослин для отримання рекомбінантного білка заснована на генеруванні стабільних трансгенних ліній, що потребує багато часу та ресурсів. Тимчасове перетворення рослинних тканин, навпаки, відбувається дуже швидко, утворюючи рекомбінантні білки або продукти їх діяльності протягом кількох днів, і тепер їх можна збільшити до комерційно значущих рівнів виробництва [32]. Завдяки значним покращенням продуктивності експресії, тимчасовий підхід став привабливою системою

виробництва та призвів до значного прогресу у використанні рослин у синтетичній біології.

НУВІП УКРАЇНИ

1.3. Використання транз'єнтних рослин

Тимчасова експресія білка в рослинних клітинах займає менше часу, ніж виробництво цілих трансгенних рослин. Для тимчасової експресії агроінфільтрація є простим і ефективним методом доставки трансгенів у рослинні клітини. Після зараження *Agrobacterium* рекомбінантні білки можуть вироблятися в рослинних клітинах від 3 до 10 днів.

НУВІП УКРАЇНИ

Рослини стають перспективною біофабрикою для великомасштабного виробництва рекомбінантних білків завдяки низькій вартості, масштабованості та безпечності. Агроінфільтрація листя рослин рослинним вірусним вектором, що несе цікавий ген, є швидким і ефективним методом виробництва білка в рослинах. В даний час цей метод використовується для виробництва широкого діапазону білків для різноманітних застосувань, включаючи вакцинні антигени, антитіла та білкові наночастинки, такі як вірусеподібні частинки [33]. Низка фармацевтичних білків, що утворюються шляхом тимчасової експресії, наразі перебувають у стадії клінічної розробки.

НУВІП УКРАЇНИ

З виробництвом рослинних фармацевтичних препаратів з трансгенних рослин ціла нова галузь біофармацевтичних препаратів знаходиться на порозі зародження. Ідея використання культурних рослин як лікувальної їжі та клітковини розвивалася з розвитком біотехнології, як інструменту. Трансгенні рослини для виробництва ліків, вакцин, дієтичних добавок, діагностичних засобів, засобів для складання дієт, за прогнозами, незабаром доповнять звичайні ліки, доступні на ринку [33]. Концепція їстівних вакцин зараз викликає великий інтерес серед дослідників, оскільки вони мають величезний потенціал, особливо в країнах, що розвиваються, де трансгенні культури з імуногенними антигенами проти різних хвороб можуть використовуватися як джерело їжі. Такі вакцини не

НУВІП УКРАЇНИ

НУВІП УКРАЇНИ

НУВІП УКРАЇНИ

НУВІП УКРАЇНИ

тільки дешеві у виробництві, але вони також мають більший потенціал комерціалізації, ніж інші джерела виробництва вакцин.

Завдяки сучасному прогресу в біотехнологічних інструментах тепер стало можливим розробляти генетично модифіковані рослини як біореакторна система, що діє як джерело великомасштабного виробництва білка для терапевтичних цілей. Це великомасштабне виробництво промислових або біофармацевтичних продуктів з використанням таких рослин відоме як процес «молекулярного землеробства рослин» [35]. Щоб задовольнити зростаючий

попит на біофармацевтичні продукти, фармацевтичні препарати рослинного походження можуть бути синтезованим економічно ефективним способом. Їх легше виробляти в масових процесах, з більшою безпекою та ефективніше, ніж аналогі тваринного походження. Прикладом є трансгенне секреторне антитіло, отримане від тютюну, яке вже виявлено ефективний проти бактеріальних патогенів для місцевого застосування всередині рота в клінічних випробуваннях.

Інші приклади включають рослинні антифіброзні засоби, розроблені для зменшення окислювального стресу в клітинах міоми печінки і рекомбінантні алергени, такі як алерген кліща домашнього пилу, отриманий з трансгенного тютюну та алергени пилку японського кедра, отримані з насіння трансгенного рису [36].

Білки, отримані з генетично модифікованих рослин, є повністю функціональними з ідентичністю, еквівалентною їхнім похідним у ссавців.

Таким чином, терапевтичні агенти, отримані з бактерій та інших мікроорганізмів, які не мають посттрансляційних модифікацій можуть бути легко створені за допомогою транзгентних рослин. Вибір моделі рослин ґрунтується на кількох факторах, таких як легкість розвитку рослини, методи, доступні для генетичної трансформації, масштабне виробництво терапевтичних

засобів, вилучення органів та переробка. Прикладом є рослина тютюну, яка є рослиною вибору для синтезу зеленої речовини, оскільки має високий рівень виробництва біомаси [37]. Ця рослина була однією із найдавніших видів рослин, які використовувалися для виробництва терапевтичних білків за допомогою

молекулярних стратегії ведення сільського господарства. В даний час він розробляється на комерційному рівні різними компаніями для виробництва різних фармацевтичних білків, наприклад, sIg A «careRx» від Planet Biotechnology для лікування карієсу, TGF-бета білок для лікування раку яєчників від Chlorogen & Partner, виробництво протеїну β -глюкозидази від Trans Pharma srl та

Plantechno srl для лікування хвороби Гоше та розробки антидотипних антитіл IgG компанією Bayer [38]. Тютюн чудово підходить для створення цих продуктів завдяки таким властивостям: високий потенціал врожайності, легкість

виращування, ефективний перенос генів, висока біомаса і насінництво. Тютюн не є кормовою культурою, тому ймовірність зараження харчового ланцюга будь-яким трансгенним рослинним продуктом дуже мало ймовірна.

Інші листові рослини, які були досліджені для виробництва рослинних фармацевтичних препаратів, включають люцерну та сою. Обидва вони забезпечують перевагу як азотфіксуючі рослини, що зменшує потребу в хімічних добривах під час вирощування. Крім того, високий урожай біомаси з гектара робить ці бобові особливо важливими для виробництва рекомбінантних антитіл.

Соеві боби також використовуються для виробництва лактоферину для використання в сумішах для немовлят Plantechno, тоді як Medicago

використовує люцерну як систему експресії для виробництва кількох рекомбінантних білків [39].

Зернові (рис, пшениця, кукурудза) і бобові (горох і соя) мають здатність накопичувати і зберігати рекомбінантні білки, що забезпечує легке виробництво термостійкі виробу. Звідси проблеми, пов'язані з іншими видами рослин, такі як

втрата активності та потреби в швидку обробку можна швидко подолати. Також може бути вплив комах, тварин та інших нецільових організмів унікати використання систем на основі рекомбінантного насіння. Насіння кукурудзи

було вперше використано для молекулярного дослідження сільському господарстві, і зараз вони використовуються на комерційному рівні для виробництва інсуліну та трипсину Podigene. Рекомбінантний авдіин і β -глюкуронідаза також виробляються на комерційному рівні за допомогою

кукурудзи. Рис також ще одна важлива ціль для виробництва білкових продуктів, зокрема завдяки високій продуктивності та легкості виробництва апскейлінг в комерційних умовах; прикладом є виробництво Apo-A1 (Milano) для лікування серцево-судинних захворювань компанією Plantechno srl [38]. Використання промислових культур, таких як льон і бавовна, і олійних культур, таких як ріпак, знижує витрати на переробку виробництво рекомбінантного білка. Комерційні культури зараз широко використовуються для розробки діків, наприклад, льон використовується Agragen для виробництва сироваткового альбуміну людини [40].

На сьогодні комерційна трансгенна кукурудза в першу чергу спрямована на стійкість до комах і гербіцидів. Збільшення та розширення експресії гена фактора транскрипції MADS-box кукурудзи, *zmm 28* під контролем помірного конститутивного промотора кукурудзи, призводить до збільшення росту рослин кукурудзи, фотосинтетичної здатності та використання азоту. Модуляція експресії *zmm 28* покращує численні вегетативні фенотипи. До них відноситься підвищення ранньої сили рослин, що вимірюється як збільшення висоти рослини та біомаси листя, а також збільшення загальної площі листя. Ці зміни разом можуть сприяти більшій ємності джерела як асиміляції вуглецю, так і використання азоту, а також посиленого поглинання на рівні всієї рослини.

Молекулярна та біохімічна характеристика *zmm 28* трансгенні рослини продемонстрували, що їхні покращені агрономічні властивості пов'язані з підвищеною асиміляцією рослинами вуглецю, використанням азоту та ростом рослин [52].

Дослідниками проводиться багато досліджень для створення фармацевтично важливих речовин за допомогою транз'єнтної трансформації рослин. В таблиці 1.2. наведено основні рослини, які використовуються для синтезу вакцин шляхом транз'єнтної трансформації, та хвороби, які лікують за їхнього використання.

Транзиснтні рослини, які використовують для синтезу вакцинних антигенів і білків.

Рослина або її частина	Розроблені вакцини	Які хвороби лікують
Кукурудза	Lt-B вакцина	Кишкова паличка термолабільна ентеротоксин (LT) і холерний токсин (СТ)-асоційована діарея
Тютюн	Вакцина	Неходжкінська лімфома
Тютюн	Рекомбінантний глікопротеїн B (gB)	Цитомегаловірус людини
Картопля	Вакцина проти кишкової палички	Ентеротоксигенна <i>E. Coli</i>
Томат	Вакцина TBI-HBS	Поверхня ВМІ-1 і гепатиту В Антиген
Томат	Рекомбінантний вірус Norwalk (rNV) капсидна білкова вакцина	Асоційований з вірусом <i>Norwalk</i> гастроентерит
Томат	Їстівна субодинична малярійна вакцина	Малярія
Рис	Вакцина проти <i>Chlamydomphila psittaci</i>	Хламідіоз
Шпинат	Вакцина	Сказ
Тютюн	Ротавірусоподібна частинкова вакцина	Ротавірус-асоційований гастроентерит
Булба картоплі	Поверхневий антиген гепатиту В	Гепатит Б
Протопласт тютюну	HIV pep	Профілактика ВІІ
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Рекомбінантний гемаглютинин А	Субодинична вакцина проти грипу

Джерело: [43]

На рис.1.3 зображено методологію, прийняту для виробництва транзгентних рослин і процес від відбору видів рослин до великомасштабного комерційного виробництва рослин для біофармацевтики та розробки вакцин. У системі транзгентної трансформації генетичний матеріал не вбудовується в хромосому рослини та відбувається виробництво трансформованих клітин, необхідних для виробництва білка. На цьому рисунку пояснюється три методи перенесення генів, які зараз використовуються для створення трансгенних рослин. У шість кроків пояснюється, як можна використати три різні методи перенесення генів *in vitro* для створення двох різних типів систем експресії в трансгенних рослинах, які потім можна оптимізувати та масштабувати для біофармацевтики та виробництва вакцин.

Transgenomics techniques for transgenic plant production

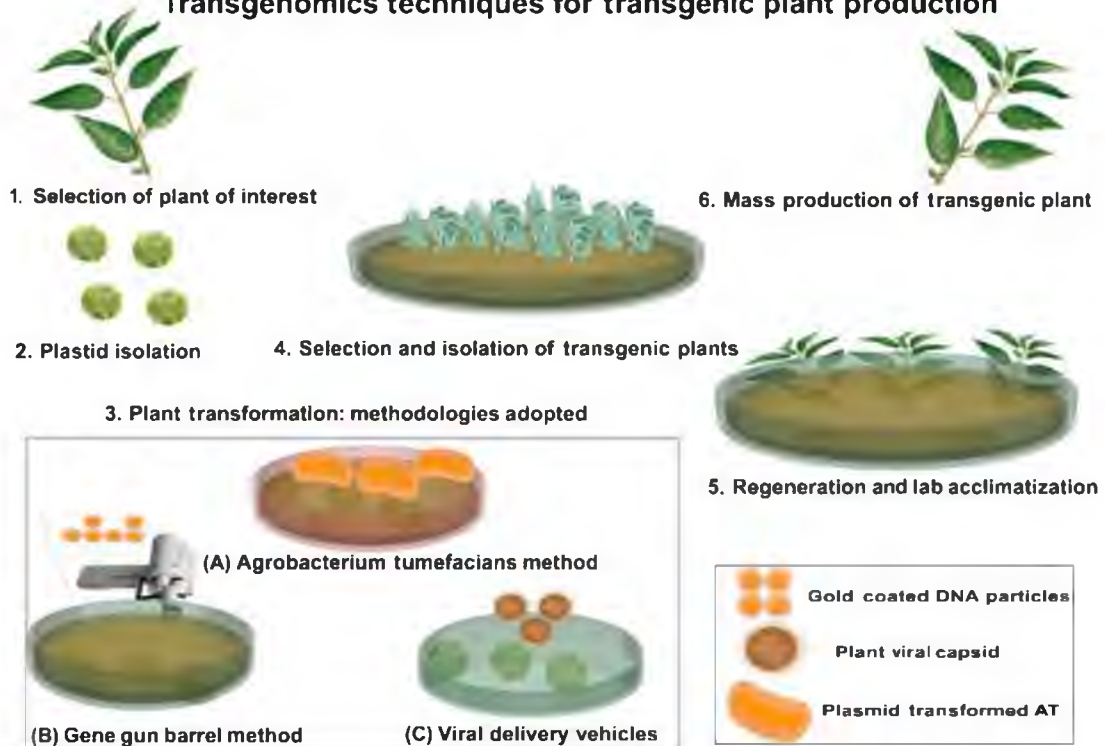


Рисунок 1.3. Трансгеномні методи, залучені до розробки трансгенних рослин і комерціалізації виробництва біофармацевтики/вакцин. Існує три методології, прийняті для трансформації рослин: (A) метод, опосередкований *Agrobacterium tumefaciens*; (B) Метод біобалістики; (C) Система доставки вірусу.

Джерело: [43].

Отже, системи транз'єнтної трансформації рослин можуть бути корисно, коли потрібна перевірка експресійних конструкцій і коли цїллю є швидке виробництво білка, наприклад для дослідницьких цїлей, функціонального аналізу та дизайну ліків, перш ніж перейти до комерційного та великомасштабного білка виробництва. Однак система тимчасової експресії має один потенційний недолїк: цїлі трансгенні листя рослин забезпечують різні рївні експресії білка, отже, це може призвести до невизначеності у виробництві продукту та може збільшити нормативне навантаження, а також вартість очищення та виробництва. Необхідно провести оптимізацію рївня білка до того, як тимчасові трансгенні рослини можна було використовувати для комерційної розробки рекомбінантних білків.

Висновок до розділу 1

Рослини можуть бути генетично модифіковані для спадкової експресії білка, також, можлива їхня транз'єнтна трансформація можуть для виробництва фармацевтичних препаратів на комерційному рївні та дослідження експресії генів. *A. tumefaciens* зазвичай використовується для введення генів шляхом внесення відповідних модифікацій у геном патогена. Рослини *Nicotiana tabacum* були широко розроблені як модельні системи рослин для створення транз'єнтних трансформацій. Для дводольних, таких як тютюн і горох, і деяких однодольних, таких як рис, конверсія, трансформація опосередкована *Agrobacterium*, залишається найкращим методом для транз'єнтної експресії генів. Метод балїстичної трансформації також використовується для отримання трансгенних рослин, де є генетичний матеріал нанесений на невеликі металеві гранули, вводиться безпосередньо всередину рослинних клітин і включається в генетичний матеріал рослини або експресується транз'єнтно. Стабільна генетична трансформація рослини є трудомістким процесом. Сорт рослин, створений таким чином, може бути доступним майже через тривалий час для

тестування цікавого білка, отже, для дослідницьких цілей перед переходом до стабільної трансформації рослин перевага віддається обов'язковій системі транз'єнтної трансформації. Вибір системи експресії рослин залежить від кількох факторів, таких як ефективність синтезу генетично модифікованих рослин, вартість розробки, необхідна кількість рекомбінантного білка та вимоги до виробництва.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТРАНЗІЄНТНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ КУКУРУДЗИ

Дослідження було проведено на базі лабораторії відділу біотехнології і генетичної інженерії рослин товариства з обмеженою відповідальністю «ВНІС», м. Київ.

Метод транз'єнтноі трансформації проводили за використання агробактеріальної інфільтрації. Для перевірки генетичних конструкцій спершу трансформували модельний об'єкт – тютюн *Nicotiana rustica* L.. Потім проводили транз'єнтну трансформацію кукурудзи гібриду А 188, який являється модельним об'єктом в дослідженнях створення генетично трансформованих рослин [46,47].

2.1. Транз'єнтна трансформація рослин *Nicotiana rustica* L. для перевірки експресії генетичних конструкцій

Рослинний матеріал – *Nicotiana rustica* L. вирощували в умовах теплиці закритого ґрунту з шістнадцяти годинним світловим фотоперіодом з температурою 24°C. Кожну рослину вирощували одноосібно в горщику з ґрунтовою сумішшю торгової марки Eсо plus. Використовували рослини віком 4-х тижнів, які мали три – чотири пари листків. Транз'єнтну трансформацію проводили методом агробактеріальної інфільтрації листкових тканин з використанням методики [44] з модифікаціями. Було використано культури *Agrobacterium tumefaciens*: шість генетичних конструкцій, три з яких було штаму GV3101 (кодові назви: №1, №2, №3), інші три – LBA4404 (кодові назви: №4, №5, №6), які містили маркерні гени – GFP та GUS. В якості негативного контролю використовували культуру *A. Tumefaciens* без маркерних генів.

Методика транз'єнтноі трансформації рослин тютюну мала такі етапи:

1. Культури *A. tumefaciens* з генетичними конструкціями №1-6, та *A. Tumefaciens*, яка не містила маркерні гени нарощували за температури 28°C

протягом 18 годин в 50 мл стерильного рідкого поживного середовища LB, рН 7,0, склад якого наведено в таблиці 2.1. Середовище стерилізували в автоклаві за температури 121 °С, тиску – 1 атмосфери протягом 20 хвилин.

Таблиця 2.1.

Склад рідкого поживного середовища LB

№	Речовина	Кількість г на 1 л
1	NaCl	10
2	Екстракт дріжджів	5
3	Казеїн	0,5

Джерело: [45]

2. Отриману бактеріальну суспензію потрібно центрифугували 5 хв при 1400 об/ хв.

3. Надосад слід обережно злити, а білий аморфний осад, який містить в собі клітини бактерій потрібно ресуспендувати в 10 мл 0,01 М розчину сульфату магнію.

4. Отриманий розчин для інфільтрації потрібно ввести в міжклітинний простір листків. Це робили за допомогою шприца без голки, попередньо зробивши поранення на листку голкою для введення розчину. Приклад методу інфільтрації листкової пластини наведено на рис.2.1., використовували рослинний матеріал – листя арабідопсису [23].

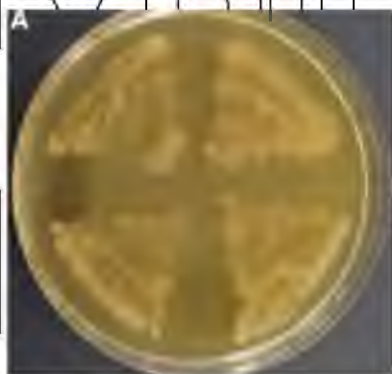


Рисунок 2.1. Метод агробактеріальної інфільтрації листя арабідопсису за допомогою шприца без голки

Джерело: [23].

5. Рослини тютюну з інфільтрованим агробактерією листям вирощували в теплиці закритого ґрунту з шістнадцяти годинним світловим фотоперіодом з температурою 24 °С протягом семи днів.

2.1.1. Аналіз експресії маркерного гену GFP

Експресію гену GFP детектували візуально на сьомий день після інфільтрації за допомогою ультрафіолетової лампи. На одному листку було інфільтровано *A. Tumefaciens* семи генетичних конструкцій, одна з яких була як негативний контроль. Тому можливо було побачити експресію всіх штамів одночасно, в однакових умовах.

2.2. Транзйєнтна трансформація кукурудзи

Для транзйєнтної трансформації кукурудзи використовували культури *Agrobacterium tumefaciens*: шість генетичних конструкцій, три з яких було штаму GV3101 (кодові назви: №1, №2, №3), інші три – LBA4404 (кодові назви: №4, №5, №6), які містили маркерні гени – GFP та GUS та в якості негативного контролю використовували *A. Tumefaciens* без маркерних генів.

Рослинний матеріал – кукурудзу вирощували одноосібно в горщиках з ґрунтовою сумішшю в умовах теплиці з шістнадцяти годинним світловим фотоперіодом з температурою 24 °С. Використовували рослини на стадії 4х листків. Щоб визначити стадію вегетативного розвитку цієї культури використовували метод заснований на підрахунку листків, який зображено на рис. 2.2. [48].

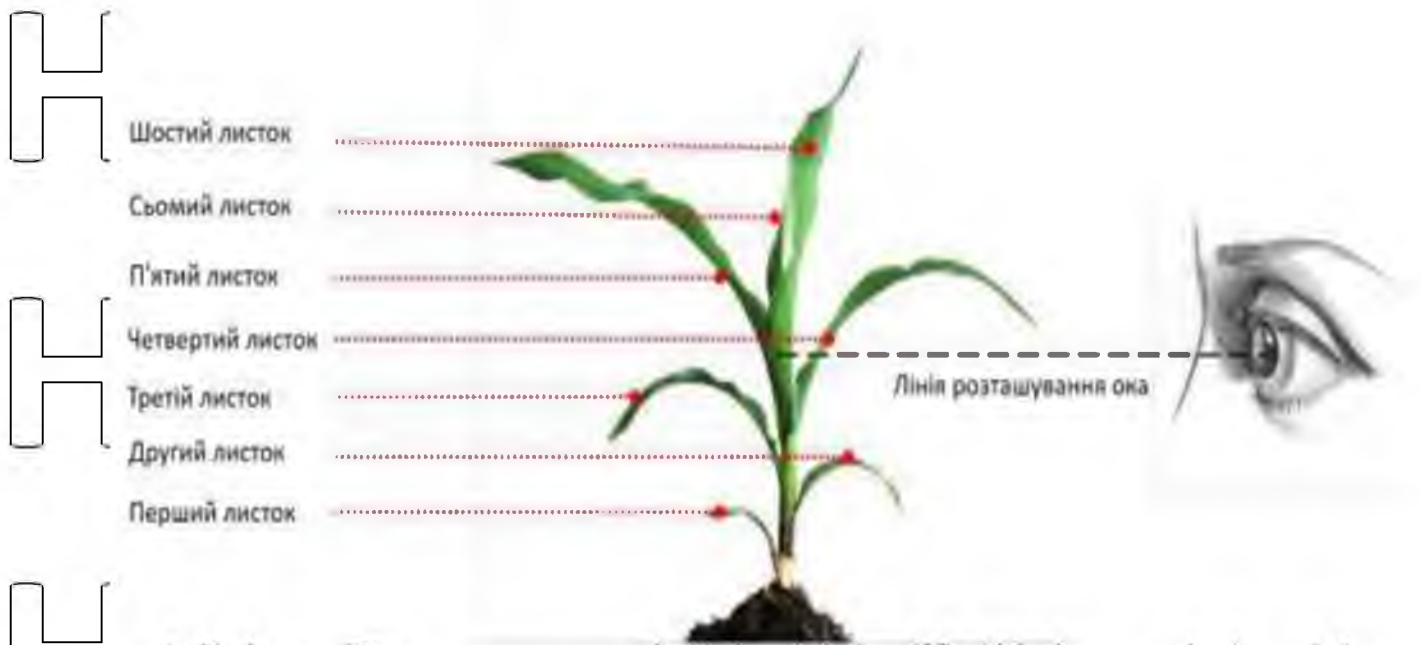


Рисунок 2.2. Визначення стадій вегетативного розвитку рослини кукурудзи за підрахунком листків.

Джерело: [48].

Гранзйентну трансформацию проводили модифікованим методом вакуумної агробактеріальної інфільтрації [49]. Він мав такі етапи.

1. Культури *A. tumefaciens* №1-6, та *A. tumefaciens* без маркерного гену наросували за температури 28 °С протягом 18 годин в стерильному рідкому поживному середовищі LB, pH 7,0.

2. Готову бактеріальну суспензію з оптичною щільністю $OD_{600} = 1$, об'ємом 10 мл центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв.

3. Потім слід обережно злити надосад та до білого аморфного осаду – бактеріальних клітин, додавали 10 мл 0,01 М розчину сульфату магнію.

4. Готовий розчин ресуспендували, до утворення бактеріальної суспензії.

5. Рослини кукурудзи повністю занурювали в суспензію та ставили в ексканатор. Вакуум вмикали 3 рази по 3 хв, між кожним увімкненням спускали вакуум, для кращого поступового проникнення в міжклітинний простір органів кукурудзи.

6. Після інфільтрації рослини культивували в тепличних умовах мінімум 10 днів перед заборою проб.

НУБІП УКРАЇНИ

Інфільтрація однієї рослини відбувалась суспензією агробактерії з одним штамом. Тому було проінфільтровано сім рослин. Дослідження було проведено в трьох кратній повторності.

2.2.1. Аналіз експресії маркерного гену GUS в рослинах кукурудзи

НУБІП УКРАЇНИ

Маркерний GUS ген, що кодує послідовність β-глюкуронідази зручний для аналізу успішності трансформації, адже фарбує затрансформовані клітини в синій колір без використання складного обладнання. Дослідження експресії

НУБІП УКРАЇНИ

маркерного гену GUS в рослинах кукурудзи відбувалось за методикою гістохімічного аналізу [50]:

1. Через 10 днів після інокуляції рослини відділяли від ґрунту та занурювали в буфер №1, так щоб він повністю покривав рослину. Щоб приготувати буфер №1 потрібно додати 50 мМ Na₂HPO₄ (приблизно 500 мл) до 1000 мл 50 мМ NaH₂PO₄, доки рН не досягне 6,8. Стерилізувати за допомогою целюлозо-ацетатного фільтра 0,22 мкм і зберігати при кімнатній температурі. Перед використанням змішати 9,9 мл цього буфера з 0,1 мл Triton X-100.

2. Потім потрібно було повністю видалити буфер №1 та залити буфер №2, так, щоб він повністю покривав рослину. Для приготування буферу №2 потрібно змішати 8 мл буфера №1, 0,1 мл 100 мМ X-gluc і 2 мл метанолу безпосередньо перед використанням.

3. Рослини занурені в буфер поміщали в ексікатор і створювали вакуум на 5 хв.

4. Потім їх поміщали в термостат і інкубували протягом 18 годин при 18 °С.

5. Після цього слід злити буфер, зайву рідину відібрати за допомогою фільтрувального паперу. Експресію GUS гену можна оцінити візуально, так як ті ділянки, в які вбудувався цей ген будуть забарвлені в синій колір.

НУБІП УКРАЇНИ

Для приготування поживного середовища, буферів використовували хімічні реактиви реактиви торгової марки Duchefa Biochemie, Нідерланди, лабораторне обладнання, насіння рослинного матеріалу кукурудзи та тютюну,

бактеріальні культури *A. tumefaciens* №1-6, та *A. Tumefaciens* без маркерного гену були люб'язно надано відділом біотехнології та генетичної інженерії рослин ТОВ «ВНІС», м. Київ.

Робота з бактеріальною культура проводилась в умовах стерильності в ламінарних боксах. Робота з рослинними матеріалами проводили в теплиці типу закритого ґрунту. Для роботи з хімічними речовинами використовували індивідуальні засоби захисту та здійснювали її в витяжній шафі.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 3

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Аналіз літературних даних свідчить про можливість використання транз'єнтної трансформації рослин для синтезу рекомбінантних білків, а також для перевірки експресії генетичних конструкцій для пришвидшення процесу генетичної трансформації рослин.

Трансгеноміка рослин займається галуззю омїки, за допомогою якої вставка чужорідного гена в геном рослини може забезпечити відповідну трансляцію білка. Явище зараз широко використовується у фармацевтиці, ліках

і розробці вакцин шляхом використання генної конструкції рослин і системи експресії. Зараз активно використовується стратегія молекулярного землеробства для створення транз'єнтних рослин з потенціалом для експресії білків з біофармацевтичними властивостями для виробництва ліків, антитіл і

вакцин. Біофармацевтика та розробка ліків можуть бути революційними за допомогою трансгеноміки рослин у майбутньому. Антитіла, терапевтичні білки та біоактивні продукти, отримані з трансгенних рослин, досліджуються на широкому рівні. Вакцини, отримані з рослин, особливо істивні вакцини, мають великий потенціал у програмах масової імунізації. Однак, незважаючи на

прогрес у галузі трансгеноміки рослин для розробки ліків, неминуче буде проведено багато досліджень щодо ефективності, безпеки та комерціалізації [43].

Для виробництва та використання рослин кукурудзи метод транз'єнтної генетичної трансформації вирішить такі важливі проблеми:

1. Успішне створення генетично трансформованих рослин, які зможуть передавати стабільно свою редаговану генетичну інформацію займає від трьох до п'яти років [51]. Однак, багато випадків, коли не вдається створити ГМО рослину кукурудзи. Однією з причин є відсутність експресії тієї чи іншої генетичної конструкції в даній рослині. Для економії часу дієвим методом є перевірка експресії генетичних конструкцій у рослинах методом транз'єнтної генетичної трансформації.

2. Збільшення врожаю кукурудзи можливе за тимчасової експресії гену *zmm 28*, що призводить до збільшення росту рослини кукурудзи, фотосинтетичної здатності та використання азоту [52].

3. Створення істівних вакцин у рослинах кукурудзи для тваринництва [43].

Для проведення транзійтної генетичної трансформації рослин найбільш доцільно використовувати агробактеріальну інфільтрацію. Вона в порівнянні з іншими методами, такими як електропорація та біобалістика являється безпечнішою для рослинного організму та дешевішою у використанні.

Лабораторією відділу біотехнології і генетичної інженерії рослин ТОВ «ВНС» було обов'язно надано бактеріальні культури *Agrobacterium tumefaciens*, які мали шість генетичних конструкцій, три з яких було штаму GV3101 (кодові назви: №1, №2, №3), інші три – LBA4404 (кодові назви: №4, №5, №6), які містили маркерні гени – GFP та GUS, та в якості негативного контролю – культуру *A. Tumefaciens* без маркерних генів.

3.1. Перевірка експресії генетичних конструкцій у транзійтно трансформованих рослин *Nicotiana rustica* L.

Модельним рослинним організмом для агробактеріальної транзійтної трансформації є тютюн *Nicotiana rustica*. Вони мають високий рівень експресії цільового гена та великий розмір листкових пластин, тому можливо проаналізувати 12-14 генетичних конструкцій одночасно [53]. Також ці рослини не вибагливі при вирощуванні в теплиці, що полегшує роботу з ними. Саме тому цю рослину було обрано, як об'єкт для перевірки експресії генетичних конструкцій.

Транзійтну трансформацію було проведено методом агробактеріальної інфільтрації листкової пластини рослини тютюну. Бактеріальні культури *Agrobacterium tumefaciens* містили в собі генетичні конструкції з маркерними генами GFP та GUS.

Для детекції експресії генетичних конструкцій інфільтрували одну листкову пластину 7 генетичними конструкціями, одна з яких була без маркерних генів та використовувалась як негативний контроль. Бактеріальну суспензію вводили за допомогою шприца без голки в листок, на рис.3.1. можна побачити сліди від інфільтрації. Для всіх генетичних конструкцій використовували один і той самий листок для забезпечення однакових умов експресії маркерного гену. Хоч, у всіх генетичних конструкціях №1 - №6 присутні обидва маркерних гени GFP та GUS в рослинах тютюну при створенні транзйентної трансформації агробактеріальною інфільтрацією, успішно та якісно детектувати можливо лише експресію маркерного гену GFP, адже для виявлення гену GUS потрібно інфільтувати окремо різні листкові пластини, що не надасть точної інформації.



Рисунок 3.1. Листок тютюну після агробактеріальної інфільтрації, червоним обведено сліди від введення бактеріальної суспензії.

Перевірено експресію *Agrobacterium tumefaciens*, які мали цію генетичних конструкцій, три з яких було штаму GV3101 (кодові назви: №1, №2, №3), інші три – LBA4404 (кодові назви: №4, №5, №6), які містили маркерні гени – GFP та GUS. Її детектували візуально за допомогою флуорисценції під ультрафіолетовим світлом зеленого флуорисцентного білку, виділеного з медузи *Aequorea victoria*, який кодується в генетичних конструкціях маркерним геном GFP.

Експресія генетичних конструкцій №1, №2, №3 *A. tumefaciens* штаму GV3101 візуально була більш виражена, адже під дією ультрафіолетового випромінювання синтезований GFP білок яскравіше флуорисцентував ніж генетичні конструкції №4, №5, №6 штаму LBA4404, про що свідчить рис. 3.2.



Рисунок 3.2. Візуальна детекція експресії транзійтної трансформації методом агробактеріальної інфільтрації

Це означає, що для транзійтної трансформації більш доцільно використовувати генетичні конструкції штаму GV3101, адже в них більший рівень експресії маркерних генів і відповідно більший рівень синтезу білку, який кодується цими генами

Таким чином, використовуючи модельний рослинний об'єкт тютюн *Nicotiana rustica* та метод генетичної транзійтної трансформації можна швидко

та якісно перевірити експресуючу здатність тих чи інших генетичних конструкцій. Бактеріальні культури, яких детектували експресію маркерних генів, можна використовувати для успішного створення стабільних трансформантів або для синтезу фармацевтично важливих речовин. В нашому випадку, перевірені генетичні конструкції використовували для проведення транзійтної трансформації кукурудзи.

3.2. Транзійтна трансформація кукурудзи та детекція експресії маркерного гену GUS

Проаналізувавши літературні дані досліджень транзійтної трансформації кукурудзи, найкращими методами для її проведення є електропорація, біобалістика та агробактеріальна інфільтрація. Найдешевшим та найпростішим методом трансформації є використання *Agrobacterium tumefaciens* з генетичними конструкціями. Налагодження методики створення транзійтних рослин кукурудзи зможе вирішити ряд питань, таких як:

1. Пришвидшення створення стабільно генетично трансформованих рослин.
2. Збільшення врожайності кукурудзи методом транзійтної експресії гену нативного *zmt 28*, який відповідає за вегетативний та репродуктивний ріст, а тому і за врожайність. Покращення цих параметрів відбувається лише в момент транзійтної, тобто не стабільної трансформації, це означає, що такий метод можна використовувати без створення ГМО продукту і що цілком відповідає продовольчій безпеці [52]. Нашадки рослин, отримані шляхом агроінфільтрації в строгому розумінні та агроінфекції, не містять чужорідної ДНК і, отже, можуть не підпадати під дію правил, які вимагають виявлення «стабільної події інтеграції», як, наприклад, вимагається Директива ЄС 2001/18/ЄС. Оскільки потомство цих рослин не містить трансгенів і векторних послідовностей, їх не можна вважати ГМО. Крім того, зона інфільтрації і, отже, будь-яка вставлена ДНК, ймовірно, буде втрачена через природне старіння [54].

3 Створення ієтивних фармацевтично важливих речовин для тварин. В рослинах кукурудзи, використовуючи метод транз'єнтної трансформації, можливо синтезувати рекомбінантні бїлки, вакцини для тваринництва. Худобу можна годувати такою кукурудзою, яка вже має в собі синтезовані потрібні речовини, без додавання їх з-зовні [43].

Для створення транз'єнтно трансформованої кукурудзи потрібно вдпрацювати методику агробактеріальної трансформації. Для впевненості, що генетичні конструкції бактеріальних культур «працюють», тобто експресують потрібний ген, їх спершу слід перевірити на модельному рослинному

організмові. В цьому випадку це рослини тютюну *Nicotiana glauca*. Всі шість генетичних конструкцій експресували блок GFP, отже, їх можна використовувати для проведення транз'єнтної трансформації кукурудзи.

Методики агробактеріальної інфільтрації тютюну та кукурудзи мають лише одну відмінність. Якщо, бактеріальну суспензію в рослини *Nicotiana glauca* вводили в міжклітинний простір за допомогою шприца без голки, то для кукурудзи, використовуючи цю техніку, сильно пошкоджується листкова пластина. Тому використовували метод вакуумної агробактеріальної інфільтрації всієї рослини.

Про успішність транз'єнтної трансформації рослин кукурудзи свідчила експресія гену GUS, адже експресію GFP візуально складно зафіксувати. GUS кодує фермент β -глюкуронїдазу, який під час інкубації зі специфічними безбарвними або нефлуоресцентними субстратами може перетворювати їх у стійкі кольорові або флуоресцентні продукти. Наявність GUS-індукованого кольору вказує на те, де ген активно експресувався. Існують різні можливі глюкуронїди, які можна використовувати як субстрати для β -глюкуронїдази, залежно від типу необхідного виявлення (гістохімічне , спектрофотометричне, флуориметричне). Найпоширенішим субстратом для гістохімічного фарбування GUS є 5-бром-4-хлор-3-індолїлглюкуронїд (X-Gluc). Він гідролїзується GUS у продукт 5,5'-дїбром-4,4'-дїхлор-їндиго (DiX-indigo). Він виглядатиме синім, і його можна буде побачити за допомогою світлової мікроскопії. Цей процес

аналогічний гідролізу X-gal бета-галактозидазою для отримання синіх клітин, як це зазвичай практикується в аналізах бактеріальних репортерних генів.

Після вакуумної агробактеріальної трансформації та гістохімічного аналізу експресії гену GUS клітини лише листя кукурудзи мали блакитне забарвлення, негативний контроль не мав забарвлення як зображено на рис. 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8., 3.9., а решта органів рослини не експресували даний ген, як зображено на рис. 3.10..



Рисунок 3.3. Гістохімічний аналіз експресії гену GUS в листках рослини

кукурудзи після транз'єнтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією M1



Рисунок 3.4. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транзійтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією №2



Рисунок 3.5. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транзійтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією №3

Бактеріальні культури *Agrobacterium tumefaciens* з генетичними конструкціями №1, №2, №3 мала штам GV3101.



Рисунок 3.6. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транзійтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією №4



Рисунок 3.7. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транз'єнтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією №5



Рисунок 3.8. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транз'єнтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією №6

Бактеріальні культури *Agrobacterium tumefaciens* з генетичними конструкціями №1, №2, №3 мала штам LBA4404



Рисунок 3.9. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транз'єнтної агробактеріальної інфільтрації генетичною конструкцією без маркерного гена, використовували як негативний контроль



Рисунок 3.10. Гістохімічний аналіз експресії гена GUS в листках рослини кукурудзи після транз'єнтної агробактеріальної інфільтрації

Отже, аналізуючи результати відпрацювання методики транз'єнтної трансформації кукурудзи, гістохімічний аналіз гену GUS показав, що не у всіх органах кукурудзи він експресується, а лише у клітинах листків. Після візуального аналізу утворення блакитного кольору в листках рослин, внаслідок взаємодії ферменту β -глюкуронідази з хімічною речовиною X-Gluc, можна вважати, що використовуючи штам GV3101 рівень експресії маркерного гену збільшується, адже площа забарвлених в блакитний колір листків більша аніж за використання генетичних конструкцій агробактерій штаму LBA4404. Тому для транз'єнтної генетичної трансформації доцільніше використовувати генетичні конструкції *A. tumefaciens* штаму GV3101.

3.3. Рекомендації щодо практичного використання транз'єнтної трансформації кукурудзи

В даній роботі описано відпрацювання методу транз'єнтної генетичної трансформації та її аналіз. Такий вид трансформації можна використовувати в своїх дослідженнях для перевірки експресії генетичних конструкцій перед створенням стабільних генетично трансформованих рослин кукурудзи. В цій роботі рослини кукурудзи були лінії A188, яка являється модельним організмом при створенні ГМО рослин цієї культури, тому для перевірки генетичних конструкцій рекомендуємо використовувати саме цю лінію.

Також, метод транз'єнтної генетичної трансформації можна використовувати у польових дослідженнях на території України, адже транз'єнтні рослини не є генетично модифікованими організмами. Таким чином, без створення стабільно генетично трансформованої кукурудзи, на яку діють певні обмеження при вирощуванні, можна за допомогою біотехнологічних методів збільшити врожайність кукурудзи. Прикладом є дослідження американських вчених про збільшення урожайності кукурудзи методом

транз'єнтної трансформації у польових умовах. Використовуючи агробактеріальну інфекцію рослин, шляхом обприскування бактеріальної культури з генетичною конструкцією, вони збільшували рівень експресії нативного гену кукурудзи *zmt 28*, який кодує інформацію щодо збільшення вегетативної маси та урожайності [52]. Використання вакуумної інфільтрації в польових умовах не можливе, тому слід проводити дослідження щодо використання хімічних речовин для подішки проникнення бактерій в міжклітинний простір листків кукурудзи.

Тому, проаналізувавши літературу та метод створення транз'єнтних рослин методом агробактеріальної трансформації, можна сказати, що він є дешевим, швидким та простим у виконанні. Такі рослини є безпечними для промислового виробництва та корисними для створення великої кількості фармацевтично важливих речовин, а також використовуються для покращення рослинних ознак та пришвидшення створення генетично модифікованих рослин.

Висновок до розділу 3

Для проведення транз'єнтної трансформації кукурудзи використовували модельний об'єкт в створенні генетично трансформованих рослин цієї культури лінію A188. Для впевненості в експресії генетичних конструкцій транз'єнтну трансформацію методом агробактеріальної інфільтрації використовували модельний об'єкт, який використовують для створення генетично трансформованих рослин тютюну *Nicotiana rustica*. Генетичні конструкції містили два маркерних гени GFP та GUS, які використовували для здійснення детекції експресії цих генів, її проводили візуально. В рослинах тютюну детектували експресію гену GFP, адже для експресії гену GUS потрібно було пошкоджувати цілісність листкової пластини рослини, а якщо б використовували різні листкові пластини не було б однакових умов для експресії маркерного гену. Успішність трансформації кукурудзи детектували за допомогою експресії гену GUS, адже маркерний ген GFP візуально в цих

рослинах не проявлявся. Також, генетичні конструкції *A. tumefaciens* використовували двох штамів GV3101 та ЦВА4404. Провівши візуальний аналіз експресії маркерних генів можна зробити висновок що більший рівень експресії мав штам GV3101, тому його доцільніше використовувати для транз'єнтної генетичної трансформації рослин кукурудзи лінії А188.

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано літературні дані, щодо методів транз'єнтної трансформації рослин, а саме кукурудзи. Вибір системи експресії рослин залежить від кількох факторів, таких як ефективність синтезу генетично модифікованих рослин, вартість розробки, необхідна кількість рекомбінантного білка та вимоги до виробництва. Для дводольних, таких як кукурудза, тютюн і горох, і деяких однодольних, таких як рис, конверсія, трансформація опосередкована *Agrobacterium*, залишається найкращим методом для транз'єнтної експресії генів. Метод балістичної трансформації також використовується для отримання трансгенних рослин, де є генетичний матеріал нанесений на невеликі металеві гранули, вводиться безпосередньо всередину рослинних клітин і включається в генетичний матеріал рослини або експресується транз'єнтно. Для проведення транз'єнтної генетичної трансформації кукурудзи найбільш доцільно використовувати агробактеріальну інфільтрацію. Вона в порівнянні з іншими методами, такими як електропорація та біобалістика являється безпечною для рослинного організму та дешевішою у використанні.

2. Практично відпрацьовано метод транз'єнтної трансформації кукурудзи.

Аналізуючи результати відпрацювання методики транз'єнтної трансформації кукурудзи, гістохімічний аналіз гену GUS показав, що не у всіх органах кукурудзи він експресується, а лише у клітинах листків. Після візуального аналізу утворення блакитного кольору в листках рослин, внаслідок взаємодії ферменту β -глюкуронідази з хімічною речовиною X-Gluc, можна вважати, що використовуючи штам GV3101 рівень експресії маркерного гену збільшується, адже площа забарвлених в блакитний колір листків більша ніж за використання генетичних конструкцій агробактерій штаму LBA4404. Тому для транз'єнтної генетичної трансформації доцільніше використовувати генетичні конструкції *A. tumefaciens* штаму GV3101.

3. Надано рекомендації щодо використання методу транз'єнтної трансформації кукурудзи. В даній роботі описано вдпрацювання методу транз'єнтної генетичної трансформації та її аналіз. Такий вид трансформації можна використовувати в своїх дослідженнях для перевірки експресії генетичних конструкцій перед створенням стабільних генетично трансформованих рослин кукурудзи. В цій роботі рослини кукурудзи були лінії А188, яка являється модельним організмом при створенні ГМО рослин цієї культури, тому для перевірки генетичних конструкцій рекомендуємо використовувати саме цю лінію.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сорочинський Б.В. Біотехнологічні (генетично модифіковані) рослини. *Фітосоціоцентр*. 2007. №2. с.22.
2. Світовий ринок кукурудзи та місце України на ньому: веб сайт. URL: <https://onlinereview.com.ua/articles/svitovij-rinok-kuhkurudzi-ta-misce-ukra%20ni-na-nomu> (дата звернення: 15.04.2022)
3. Світове виробництво кукурудзи: веб сайт. URL: <https://www.vava.ua/crpn-nutrition/maize/kev-facts/world-production/> (дата звернення: 15.04.2022).
4. Matthew B.. Teosinte as a model system for population and ecological genomics. *Trends in Genetics*. 2012.
5. Hani Z. The critical period of johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in field corn (*Zea mays*). *Weed Science*. 1996.
6. Cabrera-Ponce J. Genetic modifications of Corn. *Corn. AACC International Press*. 2010.
7. Kausch P. Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Molecular Breeding*. 2021.
8. Ušák D. Regeneration and transformation of mature embryos of B73 maize line: bachelor thesis; Olomouc, Czech Republic, 2020. 53 p.
9. Манушкіна Н.М. Біотехнологія в рослинництві. Лекції навч. посіб. Миколаїв, 2014. 51 ст.
10. Lynn E.. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Bio/technology*. 1993.
11. Owczarek B. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*. 2019.
12. Besufekad, Y.. Production of monoclonal antibodies in transgenic plants. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 2017.

13. Ismagul A. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. *BMC plant biology* 18.1.2018.

14. Keshavareddy G.. Methods of plant transformation-a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018.

15. Biolistic Particle Delivery Systems. Catalog number 165-2257. 2000.

16. Jones T.. Maize transformation using the morphogenic genes Baby Boom and Wuschel2. *Transgenic Plants. Humana Press, New York.* 2019.

17. Kumar R.. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Molecular biology reports.*

2019.

18. Dai C.. An efficient Agrobacterium-mediated transformation method using hypocotyl as explants for Brassica napus. *Molecular Breeding.* 2020.

19. Fan Y.. One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation. *BMC plant biology.*

2020.

20. Bakhsh A). Development of efficient, reproducible and stable Agrobacterium-mediated genetic transformation of five potato cultivars. *Food Technology and Biotechnology.* 2020.

2020.

21. Щербак Н.П. Вивчення LOX - опосередкованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах: дис. к.б.н.: 03.00.20. Київ, 2015. 148 с.

22. Ishida Y.. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature biotechnology.* 1996.

23. Zhang Y.. A highly efficient agrobacterium-mediated method for transient gene expression and functional studies in multiple plant species. *Plant communications.* 2020.

2020.

24. Krenek P., Samajova O., Luptovciak I.. Transient plant transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens: principles, methods and applications.

Biotechnol. Adv., 33. 2015. 1024-1042 p.

25. Wu H.-Y., Liu K.-H., Wang Y.-C. Agrobacterium-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in Arabidopsis seedlings. *Plant Methods*. 2014. 19 p.

26. J.-F. Li, E. Park, A. Nebenführ. The PAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant Methods*. 2009. 6 p.

27. Provart N.J., Alonso J., Assmann S.M., Bergmann D., Brady S.M., Brkljacic J., Browse J., Chapple C., Colot V., Cutler S.. 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytol.*, 209.2016. 921-944 pp.

28. Wang Y.-C., Yu M., Shih P.-Y., Wu H.-Y., Lai E.-M.. Stable pH suppresses defense signaling and is the key to enhance agrobacterium-mediated transient expression in Arabidopsis seedlings. *Sci. Rep.*, 8. 2018. 17071 p.

29. Rosas-Díaz T., Cana-Quijada P., Amorim-Silva V., Botella M.A., Lozano-Durán R., Bejarano E.R.. Arabidopsis NahG plants as a suitable and efficient system for transient expression using Agrobacterium tumefaciens. *Molecular Plant*. 2017. 353-356 pp.

30. Mangano S., Gonzalez C.D., Petruccelli S.. Agrobacterium tumefaciens-mediated transient transformation of Arabidopsis thaliana leaves. *Arabidopsis Protocols*, Springer. 2018. 165-173 pp.

31. Sainsbury F., George P. Transient expressions of synthetic biology in plants." *Current opinion in plant biology* № 19. 2017.

32. Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E., Dorokhov Y.L.. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev Vaccines* № 9. 2020. 859-876 pp.

33. Mardanova E. Ravin. V. Transient expression of recombinant proteins in plants using potato virus X based vectors. *Methods in Enzymology*. Vol. 660. Academic Press. 2021. 205-222 pp.

34. Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E. Vaccine production in plant systems- an aid to the control of viral diseases in domestic animals: A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2018. 511-522 pp.

35. Wang, A., Ma S.. Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects. *Springer Science & Business Media*. 2017.

36. Kaloudas D., Penchovsky R. Plant-derived compounds and their potential role in drug development. *International Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCE)*. 2018. 53-66 pp.

37. Goldstein D. A., Thomas, J. A.. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 2017, 705-716 pp.

38. Sharma S., Shahzad A. Bioreactors: A rapid approach for secondary metabolite production. *Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants*. 2016. 25-49 pp.

39. Hefferon K. Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnology Journal*. 2018. 1193-1202 pp.

40. Hoffmann-Sommergruber K.. Medical issues related to genetically modified plants of relevance to Switzerland. *vdf Hochschulverlag AG*. 2018.

41. Чи збільшує генна модифікація урожайність кукурудзи? / KURKUL. веб-сайт. URL: <https://kurkul.com/svetsproekt/386-chi-zbilshuye-gmo-vroжайnist-kukurudzi> (дата звернення 10.04.2022).

42. Deep Dive Into Plant Transformation Protocols: Protoplast-Mediated, Biolistic-Mediated and Agrobacterium-Mediated Gene Transfer// Gold Biotechnology. веб-сайт. URL: <https://www.goldbio.com/articles/article/Deep-Dive-Into-Plant-Transformation-Protocols-Protoplast-Mediated-Biolytic-Mediated-Agrobacterium-Mediated-Gene-Transfer>

43. Khan F.. Advancements in plant transgenomics approach for the biopharmaceuticals and vaccines production. *Biodiversity and biomedicine*. Academic Press, 2020. 317-333 pp.

44. Sainsbury F., George P. Transient expressions of synthetic biology in plants. *Current opinion in plant biology* 19. 2014.

45. LB agar high salt // Duchefa Biochemie веб-сайт. URL: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/L1706/name/lb-agar-high-salt> (дата

звернення 10.04.2022).

46. Lin C., Guifang A. Chromosome-level genome assembly of a regenerable maize inbred line A188. *Genome biology* 22.1 26210.

47. Ge H., Fei N.. Genome assembly of the maize inbred line A188 provides a new reference genome for functional genomics. *The Crop Journal* 10.1.2022.

48. Визначення стадій росту кукурудзи при застосуванні післясходових гербіцидів // Crop science Ukraine веб-сайт

URL: https://www.cropscience.bayer.ua/Media/Publications/Determination_of_corn_stages_development дата звернення 10.04.2022).

49. Cao N., Shi-liang A. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of corn (*Zea mays* L.) multiple shoots. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28.2 2014. 208-216 pp.

50. Ishida I., Yuji D., Yukoh H., Toshihiko K.. Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nature protocols* 2.7 .2017. 1614-1621 pp.

51. Purnhagen A., Kai D., Justus W. EU regulation of new plant breeding technologies and their possible economic implications for the EU and beyond. *Applied Economic Perspectives and Policy* 43.4 2021. 1621-1637 pp.

52. Wu N. Jingrui A.. Overexpression of zmm28 increases maize grain yield in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.47 .2019. 23850-23858 pp.

53. Варченко О.І. Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена GFP в рослинах *Nicotiana rustica* L.: дис к.б.н. біол. наук 091 , Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ, 2021. 176 ст.

54. Hull R., Graham H., George T.. Genetically modified plants: assessing safety and managing risk. *Academic Press: book London*, 2021. 127 – 155 pp.