

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

«_____» _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Створення генетичних конструкцій з генами стійкості до гербіцидів та їх
перевірка на модельному об'єкті арабідопсис»**

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної
роботи**

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Катерина ГРИНЧУК**
(підпис)

Виконала

_____ **Аліна НЕКРУТЕНКО**
(підпис)

КИЇВ – 2025

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

«_____» _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

_____ **Некрутенко Аліни Ігорівни**

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Створення генетичних конструкцій з генами стійкості до гербіцидів та їх перевірка на модельному об'єкті арабідопсис

затверджена наказом ректора НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. № 1880 «С»

Термін подання завершеної роботи (проекту) на кафедру 20 травня 2025 року

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: наукова література щодо молекулярного клонування рекомбінантних векторів, огляд агробактеріальної трансформації рослин, характеристики генів стійкості до гербіцидів, протоколи та методи молекулярної біології, опис модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana*.

Перелік питань, які потрібно розробити: 1) огляд літературних джерел щодо генетичних основ стійкості рослин до гербіцидів та принципів створення рекомбінантних векторів; 2) характеристика модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana* як об'єкта для перевірки функціональності векторною ДНК; 3) методи створення генетичних векторів шляхом модульного клонування Golden Gate; 4) трансформація бактеріальних штамів *E. coli* та *A. tumefaciens*; 5) проведення стабільної генетичної трансформації *Arabidopsis thaliana*.

Консультація розділів бакалаврської кваліфікаційної роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видала	завдання прийняла
Перший	Гринчук К.В., доцент кафедри	20.11.2024	15.02.2025
Другий	Гринчук К.В., доцент кафедри	20.12.2024	17.02.2025
Третій	Гринчук К.В., доцент кафедри	10.03.2025	02.04.2025
Вступ та висновок	Гринчук К.В., доцент кафедри	25.04.2025	15.05.2025

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів бакалаврської кваліфікаційної роботи	Термін виконання роботи	Примітка
1	Вибір теми та її затвердження	вересень-жовтень 2024 р.	
2	Отримання завдання для виконання роботи	листопад 2024 р.	
3	Пошук та вивчення наукової літератури	грудень 2024 р.	
4	Написання огляду літератури	січень-лютий 2024 р.	
5	Виконання практичної частини завдання	грудень 2024 р. – квітень 2025 р.	
6	Аналіз та структурування отриманих результатів	березень-квітень 2025 р.	
7	Остаточне оформлення готової бакалаврської кваліфікаційної роботи та надання на перевірку науковому керівнику	травень 2025 р.	
8	Перевірка бакалаврської кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату	травень 2025 р.	
9	Підготовка матеріалів доповіді	червень 2025 р.	
10	Захист бакалаврської кваліфікаційної роботи	червень 2025 р.	

Дата видачі завдання «10» листопада 2024 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи _____ Катерина ГРИНЧУК
(підпис) (ПІБ)

Завдання прийняла до виконання _____ Аліна НЕКРУТЕНКО
(підпис) (ПІБ студента)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Гербіциди: різновиди та механізм дії	11
1.2 Світове виробництво стійких до гербіцидів агрокультур.....	13
1.3 Система державного регулювання ГМ-рослин в Україні.....	16
1.4 Перспективи та виклики використання гербіцидостійких культур.....	18
1.4.1 Актуальність та стратегічна роль біотехнологічних рослин.....	18
1.4.2 Огляд ключових переваг та ризиків.....	19
1.5 Генетичні основи стійкості до гербіцидів	20
1.6 Технологія рекомбінантної ДНК	21
1.6.1 Поняття генетичної конструкції та її клонування	21
1.6.2 Система модульного клонування MoClo.....	23
1.7 Модельний об'єкт <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
1.7.1 Біологічний опис рослини та її значення	24
1.7.2 Генетична трансформація <i>A. thaliana</i>	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	27
2.1 Збирання генетичної конструкції методом модульного клонування (Golden Gate).....	27
2.2 Підготовка бактерій до події трансформації	31
2.2.1 Індукція компетентного стану клітин <i>Escherichia coli</i>	31
2.2.2 Індукція компетентного стану клітин <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.3 Хімічна трансформація <i>Escherichia coli</i>	34
2.4 Електропорація <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
4.5 Перевірка структурної організації та коректності зібраної конструкції.....	36

	6
4.5.1 Накопичення та виділення плазмідної ДНК	37
4.5.2 Рестрикція векторних молекул ДНК	39
4.5.3 Проведення ампліфікації цільових вставок генетичної конструкції методом ПЛР	40
4.5.4 Розділення продуктів реакції ПЛР та рестрикції.....	42
4.6 Робота з модельним об'єктом <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
4.6.1 Вирощування рослин.....	44
4.6.2 Стабільна трансформація <i>Arabidopsis thaliana</i> методом «Floral dip» ...	44
4.6.3 Відбір трансформантів	46
4.6.4 Детекція ГМ білків за допомогою тест-смужок	48
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ	50
3.1 Модульне клонування генетичних елементів у транскрипційні одиниці .	50
3.2 Збирання мультигенного плазмідного вектору з конструкцій першого рівня	54
3.3 Формування векторної системи з цільовими генами стійкості до гербіцидів на основі бактерії <i>A. tumefaciens</i>	57
3.4 Отримання рослин-трансформантів <i>A. thaliana</i> , що мають стійкість до гербіцидів.....	58
3.5 Детекція рекомбінантного білку як маркеру експресії генетичної конструкції.....	61
ВИСНОВОК.....	63
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	64
ДОДАТОК А.....	73
ДОДАТОК Б.....	75

РЕФЕРАТ

У межах роботи створено функціонально активні генетичні вектори із генами стійкості до різних гербіцидів, зокрема до групи гліфосату, синтетичних ауксинів, сульфонілсечовини. Рекомбінантні вектори зібрані методом модульного клонування Golden Gate та трансформовані у бактеріальний штам *Agrobacterium tumefaciens*. Ефективність роботи сконструйованих векторів оцінювалася на модельній рослині *Arabidopsis thaliana*, яка була використані для трансформації методом Floral dip. Відбір трансформантів проводився на живильному середовищі з вмістом селективних агентів. Створені рекомбінантні вектори продемонстрували стабільну роботу в модельному об'єкті, в якому відбулася експресія цільових генів. Отримані результати можуть бути використані для оптимізації векторних ДНК і створення трансгенних рослин зі ознакою стійкості до гербіцидів.

Бакалаврська кваліфікаційна робота представлена у вигляді 75 сторінок машинописного тексту формату А4. Містить вступ, три розділи, висновок, перелік використаних джерел та два додатки. Робота оформлена з використанням 86 літературних джерел. У вигляді графічного матеріалу подано 17 рисунків та 9 таблиць.

Ключові слова: ГМО, трансгенні рослини, рекомбінантна ДНК, плазміда, генетичний вектор, молекулярне клонування, гени стійкості до гербіцидів, *Arabidopsis thaliana*, модульна збірка Golden Gate, система MoClo, агробактеріум-опосередкована генетична трансформація рослин, Floral dip, *Agrobacterium tumefaciens*,

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГМО – генетично модифікований організм;

5'-UTR – 5'-нетрансльована ділянка;

3'-UTR – 3'-нетрансльована ділянка;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

п.н. (bp) – пар нуклеотидів;

кб (kb) – кілобаза – одиниця вимірювання довжини нуклеїнових кислот (1кб = 1000 п.н.);

ВТМ (VTM) – вірус тютюнової мозаїки;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

mQ H₂O – деіонізована вода;

ААД – арилоксиалканоат-діоксигеназа;

ALS – ацетолактатсинтаза;

GOX – гліфосатоксидаза;

ZMEPSPS – мутований кукурудзяний фермент 5-енолпіруватшкімат-3-фосфатсинтаза;

DMO – монооксигеназа дикамби;

BAR (bialaphos acyltransferase resistance) – фермент фосфінотрицин-N-ацетилтрансфераза, що є продуктом гена *bar* (отриманий з *Streptomyces hygroscopicus*).

ВСТУП

Боротьба з бур'янами є одним з ключових викликів сучасного рослинництва, оскільки їхня конкуренція за ресурси значною мірою знижує врожайність агрокультур. Широке застосування гербіцидів у сільському господарстві дозволяє ефективно контролювати небажану рослинність, однак неконтрольоване та ненормоване використання хімічних засобів захисту спричинило формування популяцій резистентних бур'янів. Одним із біотехнологічних рішень цієї проблеми є впровадження генетично модифікованих рослин із ознакою стійкості до гербіцидів. Такі культури не є кардинальним вирішенням питання контролю бур'янів, проте можуть бути корисним інструментом у системі інтегрованого захисту.

Актуальність теми. Створення трансгенних рослин із цільовими ознаками, зокрема стійкістю до гербіцидів, передбачає отримання функціональних векторів, що зумовлює потребу в конструюванні рекомбінантної ДНК, що забезпечує ефективну експресію в організмі реципієнта. Для цього використовують стратегію молекулярного клонування, що відкриває можливість точного і модульного збирання складних генетичних векторів. За допомогою такого підходу можна формувати комбіновану толерантність у рослинних організмах до дії різних видів гербіцидів. Це дає змогу почергового використання декількох гербіцидів, що знижує ризик розвитку резистентності. У біотехнології рослин цей підхід широко використовується для розробки нових стратегій у сільському господарстві, спрямованих на підвищення ефективності й адаптивності культурних сортів.

Мета роботи. Створити генетичні конструкції для гетерологічної експресії генів, що несуть стійкість до різних груп гербіцидів: гліфосатної, синтетичних ауксинів, сульфонілсечовини. Перевірити зібрані вектори, трансформовані в бактерію *Agrobacterium tumefaciens*, на модельному об'єкті *Arabidopsis thaliana*. Підтвердити функціональну активність створених векторних молекул.

Завдання роботи:

- ✓ Вивчити гени стійкості до гербіцидів, що включає підбір та компонування генетичних та регуляторних елементів;
- ✓ Створити генетичні карти для визначення структури цільових векторних молекул;
- ✓ Створити плазмідні вектори із генами стійкості до гербіцидів за допомогою модульного клонування;
- ✓ Накопичити рекомбінантну ДНК та перевірити коректність збірки генетичного вектора;
- ✓ Здійснити генетичну трансформацію *Agrobacterium tumefaciens* зібраними векторами;
- ✓ Провести агробактеріум-опосередковану трансформацію модельних рослин *Arabidopsis thaliana*;
- ✓ Підтвердити ефективність роботи генетичних векторів та експресію цільових білків.

Об'єкт дослідження – гетерологічна експресія генів у рослинних організмах з використанням рекомбінантних генетичних векторів для формування стійкості до гербіцидів.

Предмет дослідження – створення рекомбінантних генетичних векторів із генами стійкості до гербіцидів та їх функціональна активність у трансформованих рослинах *Arabidopsis thaliana*.

Методи дослідження: модульне клонування генетичних векторів методом Golden Gate, хімічна трансформація *E.coli*, електропорація *A.tumefaciens*, ПЛР, рестрикційний аналіз, електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі, виділення плазмідної ДНК спін-колонками, трансформація рослин методом «Floral dip», відбір рослин-трансформантів на селективному середовищі, детекція рекомбінантних білків за допомогою експрес-тестів на основі імунохроматографічного аналізу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Гербіциди: різновиди та механізм дії

Вирощування сільськогосподарських рослин у польових умовах постійно супроводжується несприятливими факторами, які прямо чи опосередковано впливають на урожайність та якість самої продукції. Суттєвою проблемою в рослинництві є бур'яни, а їх вплив на посіви агрокультур — найбільш економічно важливий фактор порівняно із впливом усіх інших чинників [1]. Дикорослі трав'янисті рослини проявляють конкурентну дію по відношенню до культур через ресурси для існування. Однак, через еволюційно набуту здатність до виживання, бур'яни пригнічують розвиток культури, особливо на ранніх етапах вегетативного росту. Слід зазначити, що втрати врожаю через бур'яни коливаються від 16 до 68 відсотків у вирощуваних культур в різних кліматичних умовах [2]. Тому боротьба з бур'янами є однією з важливих стратегій мінімізації втрат врожаю. З цією метою, у світовій практиці агропромисловості застосовують гербіциди.

Гербіциди – це хімічні речовини, що належать до класу пестицидів, та є засобами контролю небажаної рослинності в сільському господарстві. На частку речовин з гербіцидною дією припадає близько 50 відсотків від усіх пестицидів [3]. Чутливість бур'янів до цих речовин зумовлена направленістю їхньої дії на пригнічення процесів метаболізму всередині рослини завдяки блокуванню життєво необхідних процесів. Контакт гербіциду з рослиною (через корені, стебла, листя) стимулює його транспорт по судинно-провідній системі або накопичення в ділянках проникнення, що характеризує його системну або контактну дію відповідно. Далі хімічна речовина пестициду діє на клітинному рівні і спричиняє незворотні перетворення білкових компонентів клітини або змінюють активність ензимів, що призводить до порушення фізіологічних функцій.

Насьогодні існує велика кількість гербіцидів, які різняться між собою за природою діючого агенту, способом проникнення в рослину, спектром та механізмом дії, ступенем ураження. Загалом, вони поділяються за характером дії

на суцільні та вибіркові [4]. До першої категорії належать препарати, які знищують всі рослинні організми і доречні у передпосівному обробітку ґрунту або не сільськогосподарських угідь (гліфосат). До другої відносяться засоби, які інгібують ріст певних рослин і водночас не впливають на розвиток інших. Причиною направленою характеру дії таких пестицидів є морфологічні і фізіологічні відмінності окремих видів рослин, що спричиняє сприйнятливність до специфічних хімічних сполук, а також фаза росту культурних рослин і бур'янів. Також виділяють гербіцидні сполуки системної дії, які здатні до переміщення по судинній системі з током води до місця призначення, та контактної дії, які уражують рослину лише в місці потрапляння (бромексініл, бентазон) [3].

За сучасною системою поділу, розробленою Комітетом з гербіцидної резистентності (HRAC), гербіциди поділяють за місцем дії на молекулярному рівні на такі групи: (1) вплив на світлоіндуковане утворення реактивних форм кисню; (2) вплив на клітинний метаболізм; (3) вплив на поділ і ріст клітини [5]. До першої відносять: інгібітори процесу фотосинтезу на рівні фотосистеми II по сайту зв'язування Ser264 (атразин, діурон, бромацил, лінурон, метрибузин) та His215 (бентазон, бромексініл); блокатори ферменту глютамінсинтитази (глюфосинат амонію); інгібітори 4-гідроксифенілпіруват діоксигенази (HPPD) (мезотріон, топрамезон, ізоксафлутол) тощо [6]. До другої входять інгібітори: ацетолактатсинтетази (ALS) (імазамокс, імазосульфурон, хлорсульфурон, метосулан); енолпірувіл шикімат-3-фосфат синтази (EPSPS) (гліфосат); ацетил-CoA карбоксилази (ACCase) (клетодим, піноксаден, флуазіфоп-бутил); синтезу целюлози (дихлобенін, хлортіамід, індазіфлам); синтезу та метаболізму жирних кислот (диметенамід) тощо [7]. До третьої належать: інгібітори утворення мікротрубочок (бутралін, продіамін, дитіопір); синтетичні ауксини (2,4-D, дикамба, клопіралід, флуоксипір); інгібітори транспортування ауксину (напталам, дифлуфензопір) тощо.

1.2 Світове виробництво стійких до гербіцидів агрокультур

Гербіциди застосовуються у сільськогосподарській практиці від середини минулого століття. Їх включення до програми управління бур'янами є світовою тенденцією і важливою частиною вирощування багатьох агрокультур. Гербіциди використовуються фермерами для контролю чисельності небажаної рослинності, що дозволяє значно зменшити втрати врожаю. На сьогодні серед усіх пестицидів, які використовуються у світі, значну частину займають саме гербіциди, що підкреслює значний попит серед аграрних комплексів [8].

Однак тривале і ненормоване внесення гербіцидних речовин стало причиною появи резистентних бур'янів, що створило нові виклики для сільського господарства. Ситуацію частково вдалося покращити завдяки досягненням сучасної біотехнології та створенню генетично модифікованих рослин з ознакою стійкості до гербіцидів [9]. Такі культури стали важливим інструментом у глобальній стратегії боротьби з бур'янами і активно вирощуються в багатьох країнах світу, забезпечуючи підвищення врожайності, спрощення системи контролю та зменшення витрат на обробіток полів [10].

Основними комерційними культурами, що мають стійкість до гербіцидів, є кукурудза (*Zea mays*), ріпак (*Brassica napus*) соя (*Glycine max*) і бавовна (*Gossypium hirsutum*) [8]. Іншими сільськогосподарськими рослинами, що мають таку властивість, але менш активно вирощуються, є люцерна (*Medicago sativa*), картопля (*Solanum tuberosum*), рис (*Oryza sativa*), цукровий буряк (*Beta vulgaris subsp. vulgaris*) та пшениця (*Triticum aestivum*) [10]. Така статистика в основному пояснюється попитом на світовому ринку та економічним критерієм.

Впроваджені ГМ сорти характеризуються стійкістю до певних діючих речовин різних гербіцидів. Сюди можна віднести хімічні засоби захисту на основі гліфосату, глюфосинату, дикамби, 2,4-D, сульфонілсечовини, інгібіторів HPPD (4-гідроксифенілпіруват-диоксигенази), ALS-інгібіторів (інгібітори ацетолактатсинтази) [11]. Подія модифікації може включати ознаку резистентності до однієї цільової речовини чи декількох, або бути комбінованою, тобто поєднувати окремі різномірні властивості. Наукові установи різних країн

розробляють нові ГМ культури, у яких стійкість до гербіцидів поєднують з ознаками стійкості до комах, хвороб, стресостійкості, підвищення врожайності тощо. Таких підхід дозволить комплексно вирішувати кілька агротехнічних проблем одночасно, підвищити ефективність виробництва та зменшити екологічне навантаження.

У 2023 році дослідження та розробки в сфері ГМ-технологій проводилися в 76 країнах світу, з яких 27 дали згоду на вирощування модифікованих рослин [12]. Загалом, під ГМ культури було зайнято 206,3 мільйона гектарів, що становить приблизно 13,38% від загальної площі сільськогосподарських угідь світу [13]. Станом на жовтень 2024 року кількість країн, в яких дозволено культивувати ГМ посіви, зросла до 32 одиниць [14].

Виробництво модифікованих агрокультур здійснюється в більшості регіонах світу (Рис. 1.1). У 2023 році площа ГМ посівів у світі склала, млн га: 97,3 - Центральна і Південна Америка; 85,9 - Північна Америка; 19,5 - Азіатсько-Тихоокеанський регіон; 3,5 - Африка [12]. Країнами лідерами є США (74,4 млн га), Бразилія (66,90 млн га), Аргентина (23,10 млн га), Індія (12,10 млн га) та Канада (11,50 млн га), сумарно на площу їхніх посівів припадає 91% усіх ГМ рослин у світі [10]. Найменша у світі площа ГМ-посівів у 2023 році, лише 48 066 гектарів, належить Європі. При цьому офіційно зареєстрованими регіонами, де можна саджати ГМ-рослини, є Іспанія та Португалія [13]. Варто зазначити, що більша частина культивованих комерційних біотехнологічних сортів мають ознаки стійкості гербіцидів [11]. У 2023 році у Центральній та Південна Америці площа ГМ-культур збільшилася на 4,1% за рахунок ГМ-кукурудзи, сої та бавовнику з комбінованою стійкістю до комах і гербіцидів комбінованими властивостями. У Північній Америці більше 80% ГМ-кукурудзи та бавовни мають ознаки стійкості до комах і гербіцидів, а ГМ-соє та ріпак лише ознаки стійкості до гербіцидів [12]. На теренах Південної Африки кукурудза з комбінованими генами займає 60,4% загальної площі під зазначену культуру, а кількість сортів зі стійкістю до гербіцидів становить 18,7%. При цьому серед насаджень ГМ сої домінують лише сорти Roundup Ready [13].

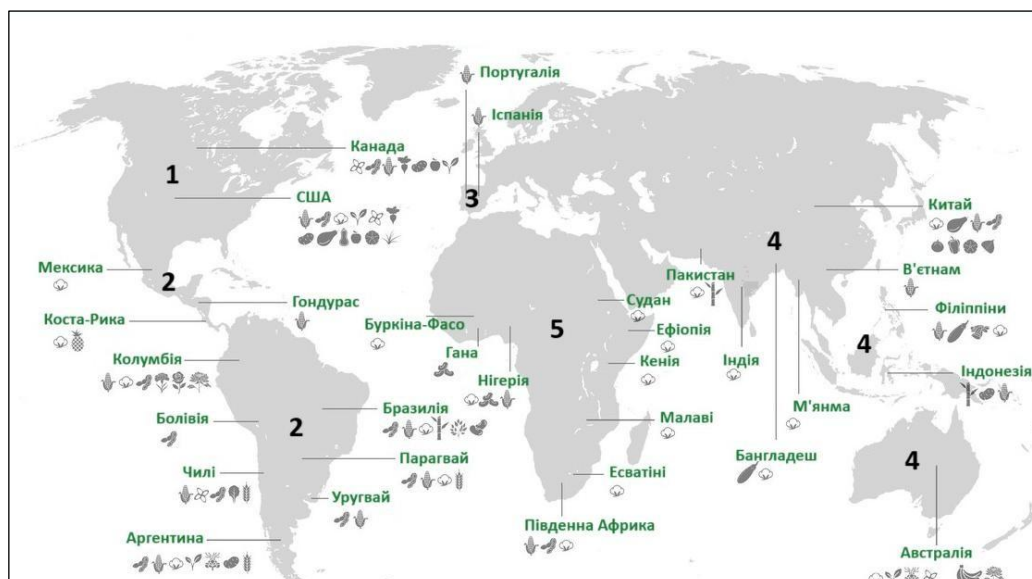


Рис. 1.1 Країни світу по вирощуванню ГМ культур з розподілом по регіонах: 1 - Північна Америка; 2 - Центральна і Південна Америка; 3 – Європа; 4 - Азіатсько-Тихоокеанський регіон; 5 – Африка [14].

У період 2023 року було розроблено нові ГМ-сорти різних культур, які було схвалено на рівні окремих держав для вирощування та переробки, використання в харчових продуктах і кормах. Загальна кількість склала 65 трансформантів, з різною часткою внеску таких країн: Китай - 36,92%, Європейський Союз - 20,00%, Австралія та Нова Зеландія - 15,38 %, Аргентина - 9,23 %, США - 6,15 % та інші [12]. На подію модифікації за ознакою стійкості до гербіцидів припало 16,92% від зазначеної кількості, а в поєднанні з іншими ознаками - 58,46% відповідно [12].

Сфера генетично модифікованих культур наразі досить стрімко зростає і зазнає глобального розвитку. Комерційні ГМ-рослини стали частиною системи імпорту та експорту продуктів харчування у деяких країнах світу. США, Бразилія та Аргентина, які вважаються великомасштабним виробниками ГМ-культур, є експортерами продовольства з вмістом ГМО. При цьому певні країни та регіони в Азії, включаючи Республіку Корея, Японію та Китай, здійснюють імпорт ГМ-рослинництва через високий попит на продукти харчування [12].

1.3 Система державного регулювання ГМ-рослин в Україні

Центральним нормативно-правовим актом, що регулює статус ГМО та його застосування у будь-якій сфері є закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 2007 року [15]. Основними цілями цього документу є: забезпечення національної безпеки; охорона здоров'я людини, тварин і довкілля; створення засад для безпечного застосування у господарській діяльності; формування механізму державного нагляду та контролю; встановлення відповідальності за умови порушення. Загалом, чітко окреслений той факт, що використання ГМО у відкритій системі дозволене лише за умови офіційного ухвалення трансгенної події з боку держави. При цьому законом передбачена певна процедура отримання дозволу на вирощування ГМО в господарських цілях, що включає процес апробації, оцінки впливу на довкілля та державної реєстрації.

Додатковими регуляторними документами в сфері поводження з ГМО виступають такі підзаконні акти: постанова КМУ від 28 квітня 2009 р. № 423, постанова КМУ від 2 квітня 2009 р. № 308, наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 07.02.2011 № 36 [16]. Слід зазначити, що Україна також визнає міжнародні цінності та підтримує принцип обережності щодо ГМО, тому як Сторона Конвенції про біологічне різноманіття, приєдналась до Картахенського протоколу про біобезпеку (закон від 12 вересня 2002 року) [17]. Цим кроком Україна продемонструвала намір забезпечення гарантії належного використання ГМО, його передачі та обробки, з метою збереження і захисту системи біорізноманіття [18].

Попри те, що в Україні присутній нормотворчий процес та існує відповідне законодавство щодо ГМО, реальний стан використання трансгенних рослин у виробництві продовольства має тіньовий характер і перебуває поза рамками закону [19]. За увесь період незалежності, в Україні не відбулося жодного акту реєстрація будь-якого ГМ-сортів рослин. Але вітчизняні суб'єкти

господарювання на нелегальній основі вирощують ГМ-культури з ГМ-насіння закордонного походження, і за неофіційними даними, в Україні культивується близько 50-80% сої, 30% ріпаку та 10% кукурудзи з ГМ-насіння [20]. Наприклад, у Дніпропетровській області в період з 2018 по 2021 рік акредитована лабораторія (ISO 17025) встановила, що ГМО було наявне в 42,8% досліджених зразків соєвих бобів; 87,5% зразків змішаних кормів; 15,0% зразків соняшнику (у зразках були виявлені 35S промотор кольорової мозаїчної вірусу цвітної капусти, термінатор NOS *A.tumefaciens* та 34S промотор FMV) [21]. Така тенденція свідчить про відсутність механізму управління та наявність недоліків у державному контролі ГМО [20, 22].

Наразі Україна здійснює активне реформування системи біобезпеки [18]. Причиною цього є виконання умов Угоди про асоціацію з ЄС, серед яких обов'язковою є процедура гармонізації вітчизняного законодавства із нормами Євросоюзу у питаннях поводження з ГМО [20]. Як наслідок, відбулося ухвалення Закону України від 23.08.2023 № 3339-IX «Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції», який набуде чинності 16.09.2026 [23]. До основних аспектів слід віднести зобов'язання України удосконалити законодавство щодо обігу ГМО серед харчових продуктів і його поширення на ринку, а також щодо безпечного використання ГМО у відкритих системах та створення відповідних умов захисту [20]. У цілому, нововведення більшою мірою направлені на оптимізацію наявної нормативної бази, деталізацію окремих моментів, уточнення певних аспектів, ширше тлумачення існуючих правових механізмів [19]. Правові основи управління і поводження з ГМО так само включають державну реєстрацію, поділ на закриті та відкриті системи, багаторівневий інституційний підхід і обов'язкове маркування. При цьому, до запозичених механізмів підпадає створення мережі після реєстраційного моніторингу і проведення розподілу повноважень органів державної влади для запобігання дублюванню функцій у сфері регулювання

ГМО [19, 22]. Таким чином, цей нормативно-правовий акт сприятиме процесу євроінтеграції, і стане запорукою якісного та прозорого забезпечення екологічної, генетичної, біологічної та продовольчої безпеки України.

1.4 Перспективи та виклики використання гербіцидостійких культур

1.4.1 Актуальність та стратегічна роль біотехнологічних рослин

У сучасних реаліях глобального сільського господарства продовжується впровадження біотехнологічних рослин, серед яких лідерами залишаються культури з такими ознаками, як толерантність до гербіцидів і стійкість до шкідників [24]. Такий розвиток подій зумовлений впливом багатьох чинників. Зокрема, населення світу невідомо зростає і досягне позначки майже 10 мільярдів до 2050 року, з чого виникає потреба у збільшенні продуктивності агрокультур, і при цьому важливо знизити вплив сільського господарства на навколишнє середовище [25, 26, 24]. В умовах браку орних земель, водних ресурсів і зміни клімату методи традиційної агрономії не усунуть питання дефіциту, натомість технологія генетичної інженерії відкриває можливості подолання цих викликів, підвищуючи ефективність і стійкість сільськогосподарських культур і досягнення сталого розвитку [25, 27, 28].

Наразі існує твердження, що рівень світового збільшення врожайності агрокультур має позначку менше 1,7%, а за розрахунками він має становити 2,4%, щоб покривати світові потреби та покращити якість харчування [29]. Варто зазначити, що за період двох попередніх десятиліть вирощування ГМ-культур показало позитивну динаміку, зокрема валовий обсяг виробництва агропродукції у світі зріс на 22% відповідно до глобального мета-аналізу [30]. Загалом, у наукових джерелах зазначається, що: «У 2020 році світовий ринок генетично модифікованих культур і насіння оцінювався приблизно в 28 мільярдів доларів США, а до 2027 року очікується, що він досягне 45 мільярдів доларів США» [26]. Таким чином, модифіковані культури стають важливим інструментом у сфері агропромисловості, і потреба серед фермерів і виробників у інноваційних засобах боротьби залишається високою [31].

1.4.2 Огляд ключових переваг та ризиків

Серед основних вигод культур з ознаками стійкості до гербіцидів виділяють: збільшення врожайності, зменшення обсягу пестицидів, зниження викидів CO₂, покращення структури ґрунту, оптимізація вартості виробництва сільськогосподарських культур [10, 32, 33]. У середньому ознака стійкості до гербіцидних сполук дозволила підвищити рівень врожайності до 10% за рахунок більш ефективного управління бур'янами і меншого пошкодження посівів [34]. У наукових джерелах також зазначається, що у період з 1996 по 2020 роки вирощування ГМ насіння, стійкого до комах і гербіцидів, супроводжувалося меншим застосуванням пестицидів порівняно з не ГМ-еквівалентами на 748,6 мільйонів кг (-7,2 %) активного інгредієнта [9]. Слід відмітити, що ГМ-технології пов'язують із певним зниженням викидів парникових газів в зонах вирощування, що відповідало скороченню на 23 631 млн кг вуглекислого газу в 2020 році, що обумовлене зниженим механічним обробітком ґрунту [35].

Разом з тим, виробництво рослинництва з подіями модифікації, орієнтованих на стійкість до гербіцидів, не позбавлене ризиків [33]. Основні занепокоєння пов'язані з наступними питаннями: потенційна токсичність та алергенність для людей, певні екологічні ризики, ймовірність горизонтального потоку генів, негативні наслідки для нецільових організмів, еволюційна стійкість у бур'янів тощо [10, 32]. Серед досліджень безпечності ГМ-культур, не зафіксовано підтверджених випадків шкочинного впливу на людей або худобу, які споживають ГМ-продукцію, або довкілля, в якому вона культивується [36]. Слід підкреслити, що проблема існування бур'янів толерантних до гербіцидів є глобальною та довготривалою, і не зводиться лише до використання модифікованих агрокультур [10]. Для цього рекомендується створювати комплексні ГМ-ознаки, щоб комбінувати окремі гербіциди з різними механізмами дії, наприклад, дикамба у поєднанні з гліфосатом [10]. Таким чином, насамперед потрібно покласти в основу боротьби з бур'янами інтегровані підходи, чергування різних гербіцидів і контроль їх внесення, заходи

моніторингу, щоб пом'якшити проблеми резистентності до гербіцидів та екологічні наслідки [37, 38].

1.5 Генетичні основи стійкості до гербіцидів

Ознака стійкості до гербіцидів як одинична, так і комбінована, є рисою, що переважає серед подій модифікації різних агрокультур [39]. Процес отримання рослини, що має відповідну стійкість, може бути реалізований шляхом: (1) селекції культури методом мутагенезу, (2) трансгенної технології або (3) генетичних маніпуляцій через систему CRISPR/Cas [40]. У цілому більша частина комерційних культур зі стійкістю до гербіцидів отримані саме методом трансгенезу, що пояснюється застарілим підходом першого і недостатньою вивченістю третього відповідно.

Існує три стратегії проведення трансгенних маніпуляцій, що включають гетерологічну експресію екзогенних генів, надмірну експресію ендегенних генів або вимкнення небажаних генів [41]. У першому випадку для отримання бажаної ознаки здійснюють модифікацію геному рослини з використанням екзогенних генів віддалених видів, у другому - ендегенних генів того самого виду (цисгенез) або гомологічних генів статево сумісних видів (інтрагенез), у третьому – блокування небажаних генів через введення синтетичних послідовностей антисмислових або дволанцюгових РНК. У 2022 році більшість окремих трансгенних явищ (227 з 265 одиниць), у тому числі і стійкість до гербіцидних сполук, були розроблені за першою стратегією [42].

Формування стійкості до гербіцидів як агрономічної ознаки, передбачає введення в рослинний геном специфічної ділянки чужорідної або модифікованої нативної нуклеїнової кислоти [43]. Така процедура здійснюється через ряд маніпуляцій: клонування «корисних» генів, конструювання векторів експресії, генетична трансформація культур-реципієнтів, скринінг та ідентифікація трансформованих ліній [41]. При цьому мета полягає в наданні модифікованому організму цільової характеристики, яка йому не притаманна в цілому [44].

Основою генетичного фактору витривалості до дії гербіцидів є гени, знайдені в певних видах і організмах, що виявляють таку здатність [40, 43, 45]. Гени, що відповідають за стійкість до гербіцидів, ідентифікуються та вивчаються на структурному та функціональному рівнях у відповідних ділянках хромосом [46]. У подальшому проводиться молекулярно-генетичний аналіз, цільовий ген секвенується та заноситься до генетичної бази даних. Загалом, усі відомі на сьогодні гени стійкості до гербіцидів виділені з різних царств, а основними осередками є: бактерії, водорості, грибки і дріжджі, статевого несумісні види рослин [41]. Перелік деяких генів, що активно використовуються при створенні гербіцидостійких рослин, наведено в додатку А.

Таким чином, трансгенна технологія дозволяє передавати цільові ознаки від генетично віддалених видів на противагу класичній гібридизації з обмеженим числом варіацій [41, 47]. Такий підхід долає бар'єр традиційної селекції рослин, за якого схрещування можливе лише за умови видової сумісності [43, 48].

Відомо два центральних шляхи надання стійкості до гербіцидів ГМ рослинам: (1) видозміна мішені (ферменту) до гербіцидної дії з метою зниження чутливості або індукція надсинтезу немодифікованого білка-мішені, що зберігає оптимальний метаболізм у присутності гербіциду; (2) інтеграція білка або цілої ензимної системи для дезактивації діючої речовини гербіциду шляхом розкладу до його дії [49, с. 321].

1.6 Технологія рекомбінантної ДНК

1.6.1 Поняття генетичного вектору та його клонування

Генетичний вектор представляє собою молекулу ДНК, що створена шляхом штучної рекомбінації генів разом із необхідними регуляторними елементами та вектором для їхньої експресії в клітинах організму-реципієнта. Вона є основним інструментом у біотехнології та генетичній інженерії для формування бажаних ознак при генетичній трансформації цільової системи. Клонування функціонально активної генетичної конструкції має вирішальне значення для успішного отримання оптимальної трансгенної лінії [50].

Базова одиниця конструкції містить один цільовий ген, який знаходиться під контролем промотору на початку і термінатора в кінці, а також додаткові регуляторні елементи для контролювання рівня експресії за потреби (5'-UTR, 3'-UTR, енхансери). Генетична конструкція може містити декілька базових одиниць, об'єднаних в один вектор. Крім того, в окремих випадках генетичні конструкції можуть містити специфічні послідовності для детекції або відбору трансформантів, такі як репортерні гени (β -глюкуронідаза, зелений флуоресцентний білок, люцифераза) або селективні маркерні гени (стійкість до антибіотиків, гербіцидів) [45, 50]. При цьому експресійна касета повинна забезпечувати оптимальний рівень синтезу гену у тканинах і у відповідних часових проміжках розвитку або в умовах навколишнього середовища [26].

Для отримання рекомбінантної ДНК, проводиться клонування генетичної конструкції у вектор. Векторна молекула відповідає за перенесення ДНК від одного організму до іншого, і може бути різної природи: вірусна, бактеріальна, дріжджова тощо [51]. Найчастіше в якості векторів використовують бактеріальні плазміди, що представляють собою автономні кільцеві молекули ДНК, що містять такі компоненти: сайти реплікації (точка Ori), T-регіон для клонування цільових конструкцій, сайти множинного клонування (MCS) для рестрикційних ферментів, селективний маркер для ідентифікації та відбору трансформантів [52]. Вектор є ключовим і одним з найважливіших складовою у системі рекомбінантної ДНК [51].

У подальшому отриманий вектор застосовується для генетичної трансформації рослин, яка поділяється на два типи – непряма та пряма [53]. До прямої генетичної трансформації відносять процедуру хімічної індукції (ПЕГ, хлорид кальцію) або фізичні методи (біобалістика, мікроін'єкція, електропорація тощо). До непрямої, в свою чергу, належить трансформація опосередкована вірусами, а також бактеріями виду *Agrobacterium rizogenes* або *tumefaciens*.

1.6.2 Система модульного клонування MoClo

MoClo – це сучасний метод молекулярного клонування функціональних фрагментів ДНК в галузі синтетичної біології для отримання рекомбінантної ДНК, що придатна для експресії в цільовій системі. Найбільш відомим різновидом методу MoClo є підхід Golden Gate. Суть технології полягає у проведенні рестрикції цільових елементів з молекули ДНК, з подальшим їх лігуванням в єдину конструкцію. Субстратом для клонування може бути як лінійна, так і кільцева молекула ДНК [54]. Особливістю при цьому є використання ендонуклеаз типу II, сайт рестрикції у яких знаходиться поза межами послідовності розпізнавання [55, 56]. Слід зазначити, що між сайтом розпізнавання та розрізання може міститися нуклеотидна спейсерна ділянка [54]. Після рестрикції утворюється одноланцюговий виступ із 4 нуклеотидів, що називається ф'южн сайтами (злиття), які не є симетричними і утворюють «липкі» кінці, що строго компліментарні для конкретних компонентів [57]. Така стратегія дозволяє послідовно у визначеному порядку поєднувати генетичні одиниці в одній реакції із застосуванням рестриктази та ДНК-лігази T4 [55, 58].

Іншим важливим аспектом методу є ієрархічна модель збирання окремих генетичних складових, що містяться у відповідних модулях, в єдину конструкцію [54, 55]. Кожен базовий модуль (рівень 0) несе окремі генетичні елементи (промотор, 5'-UTR, структурний ген, 3'-UTR, термінатор тощо), які на наступному етапі утворюють транскрипційну одиницю (рівень 1), що, у свою чергу, можуть бути об'єднані в мультигенні конструкції (рівень 2) [59]. При цьому, для кожного рівня клонування існує відповідний вектор призначення, що слугує основою для генетичної конструкції, тому їх можна зберігати в плазмідах, які можна напрацьовувати в бактеріях з подальшим виділенням і використанням [54]. Акцепторний вектор містить: відповідні сайти рестрикції; плазмідний початок реплікації (точка Ori); селективний маркер; маркерний ген, який розташований між сайтами рестрикції та призначений для скринінгу [54]. Варто зазначити, що відповідні елементи кожного рівня відрізняються між собою

фланкуючими сайтами рестрикції (сайти розпізнавання яких щоразу вирізаються), тому для кожного наступного етапу потрібне чергування різних рестриктаз (наприклад, *BpiI* та *BsaI*) [57, 60].

1.7 Модельний об'єкт *Arabidopsis thaliana*

1.7.1 Біологічний опис рослини та її значення

Arabidopsis thaliana ($2n = 10$) - трав'яниста квіткова рослина, яка належить до класу дводольних, відділу судинних, сімейства капустяних (*Brassicaceae*), самозапильна, досягає 20–25 см у висоту [61, 62]. Геном містить 5 ядерних хромосом, його розмір складає ~132 Mbp і ~38 000 локусів, включаючи близько 27 600 і 6 500 тис. генів, що кодують білки та мають некодуючі функції відповідно [61, 63]. Геном *A. thaliana* екотипу Col-0 був повністю секвенований у 2000 році, що значно підвищило кількість молекулярних досліджень цього організму [64]. Арабідопсис має численні генетичні варіації і поширений у різних середовищах існування, демонструючи значне екологічне різноманіття по всій території Євразії, Африки та Північної Америки [65].

A. thaliana не має агрономічного значення, а більше відомий як модельний організм. Уже більше 40 років його використовують для інтенсивних генетичних, біохімічних та фізіологічних досліджень [66]. Зазвичай цей індивід є центральним об'єктом вивчення в області біології рослин, молекулярних механізмів, еволюційних процесів, популяційної генетики та основ росту рослин тощо [61]. Суть застосування арабідопсису як моделі полягає в отриманні наукових даних про основи функціонування живої системи, і можливе подальше перенесення результатів у прикладні галузі - від покращення властивостей агрокультур до біомедицини [67].

Арабідопсис вважається золотим стандартом серед рослинних моделей. Варто зауважити, що до 2015 року було опубліковано понад 50 000 статей про *A. thaliana*, а кількість публікацій за попередні 10 років була більшою за ті, де використовували класичну модель *Drosophila melanogaster* [63]. Однією з переваг є порівняно короткий життєвий період, який триває від розвитку насіння

до рослини, що несе зріле насіння, і складає приблизно 6 тижнів залежно від умов [61, 63]. Іншими важливими характеристиками є: компактний розмір рослини, невибагливість до умов культивування, швидкий репродуктивний цикл, компактний геном та його проста організація, великий вихід насіння, самозапилення, придатність до генетичної трансформації [67]. Слід зазначити, що природні види є в основному інбредними лініями, що сприяє дослідженню генетичних механізмів різних ознак, багато з яких є цікавими в аспекті їх застосування у рослинах агрономічного значення [62].

Фундаментальні знання про функції генів, отримані в ході досліджень *Arabidopsis*, здебільшого використовуються для вивчення цільових ознак і покращення агрокультур [67]. Секвенування та скринінг генетичних мішеней в *A. thaliana* сприяють виявленню окремих генів-кандидатів, що відповідають за бажану характеристику. З арабідопсису клонують різні генетичні елементи, такі як: функціональні гени, промотори, енхансери та інші регуляторні послідовності, які в подальшому можуть бути екстрапольовані на окремі види сільськогосподарських рослин [68]. Наприклад, відкриття деяких генів арабідопсису, поклало початок встановлення наступних ознак у культурах: картопля (бульбоутворення, ген «*co*»), цукрова тростина (ріст рослин, ген «*suc*»), помідори (злиття органів і ріст рослин, ген «*hws*»), бавовна (трансформація, ген «*wus*»), соя (урожайність насіння, ген «*bbx32*»), кукурудза (цвітіння, ген «*elf3*»), рис (абіотичний стрес, ген «*sdirl*») [67].

Також *A. thaliana* є популярною модельною системою у дослідженнях молекулярних і системних реакцій рослин на хімічний стрес [66]. *A. thaliana* використовують з метою перевірки генетичних мішеней, пов'язаних з відповідними ознаками. У подальшому отримані наукові дані застосовують для коригування процесу покращення генетично складних, стійких до трансформації с/г культур, у тому числі для розробки сортів із підвищеною стійкістю до гербіцидів [67]. Загалом, арабідопсис часто виступає головним об'єктом в хімічних генетичних перевірках для встановлення активності різних хімічних

ефекторів або інгібіторів, а також для ідентифікації цікавих молекулярних шляхів метаболізму гербіцидних сполук [67].

1.7.2 Генетична трансформація *A. thaliana*

Модельний організм *A. thaliana* досить часто використовується у біотехнологічних дослідженнях для перевірки *in planta* функціональності генетичних конструкцій та векторів [61]. Процедура його трансформації проста і швидка, що дозволяє випробовувати ефективність генів і аналізувати рівень їх експресії у максимально наближених до нативних фізіологічних умов [69]. Застосування цієї моделі спрощує і прискорює процес перевірки успішності акту генетичної модифікації або тестування нових молекулярних векторів [67].

Найбільш поширеним підходом для генетичної трансформації *A. thaliana* є метод «Floral dip» (квіткове занурення), що виключає процедуру введення рослини в культуру *in vitro* [62, 67]. Технічна реалізація цього методу передбачає занурення суцвіття живої рослини арабідопсису у суспензію компетентних клітин бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (містить вектор із цільовими генами) у поєднанні з вакуумною інфільтрацією у більшості випадків. Процедуру здійснюють на етапі початкової фази цвітіння, що настає на 3-4 тиждні від появи сходів. Потенційними об'єктами трансформації виступають тканини-попередники гаметофітів, зрілі гаметофіти або зиготи на ранніх етапах розвитку. Після трансформації, рослина продовжує свій життєвий цикл та формує насіння (в умовах самозапилення). Варто зазначити, що ефективність трансформації становить від 1 до 10 відсотків за літературними даними, що залежить від штаму бактерії та фізіологічних особливостей різних екотипів рослин [70]. Отримане насіння висівають на живильне середовище, доповнене селективним агентом для ідентифікації та відбору потенційних трансформантів [71]. До переваг відносять отримання трансформантів за короткий проміжок часу (до 3 місяців), оптимальні затрати ресурсів, нехимерність потомства, мінімальна соматональна мінливість. Детальні протоколи трансформації та їх модифіковані варіанти доступні у відкритих наукових джерелах [72, 73, 74].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Практична частина дипломної роботи була виконана на базі лабораторії організації ТОВ «ВНІС ГЕНЕТИКС», яка сприяла здійсненню усієї діяльності та люб'язно надала необхідні матеріали, реактиви та обладнання.

2.1 Збирання генетичної конструкції методом модульного клонування (Golden Gate)

- ✓ Витратні матеріали та прилади: генетичні елементи, плазмідний вектор, лігазний буфер, розчин BSA, T4-ДНК лігаза, рестриктази BsaI та BpiI (Thermo Scientific™, США), mQ H₂O, пробірки типу «Еппендорф» 0,5 мл, піпет-дозатори; наконечники (10 мкл, 200 мкл), лабораторний термоблок (Boeckel Grant PDB-1, США), термостат (ТС-20 МІЗ-МА, Україна).

Загальна схема складання окремих генетичних елементів у цільову функціональну конструкцію передбачає виконання таких етапів:

- 1) Вивчення цільового гену, встановлення його функціональних властивостей, підбір регуляторних елементів для забезпечення відповідного рівня експресії у цільовому організмі.
- 2) Вибір базових модулів нульового рівня, що містять нуклеотидну послідовність відповідного генетичного елемента (структурного або регуляторного призначення), а також вектор, що акцептує цей фрагмент.
- 3) Поєднання декількох генетичних елементів між собою за допомогою реакції рестрикції та лігування з подальшим клонуванням у вектор призначення. На цьому кроці отримується модуль 1 рівня, що містить транскрипційну одиницю, яка повністю придатна до експресії у системі призначення.
- 4) Складання декількох транскрипційних одиниць у кінцевий вектор з утворенням мультигенної конструкції, що становить модуль 2 рівня. Вектор цього рівня безпосередньо використовуються для події трансформації рослини-реципієнта.

У роботі були використані стандартні модулі нульового рівня (містять регуляторні послідовності) та вектори з комерційного набору «MoClo Plant Parts Kit» №1000000047 Addgene (США) [75]. Модулі зазначеного рівня мають сайти рестрикції для ферментів ендонуклеаз *BsaI* та селективний маркер Sp^R (стійкість до антибіотика спектиноміцину) [57]. Додатково були задіяні модулі нульового рівня, що несуть необхідні генетичні елементи (цільові гени), які отримані шляхом замовного синтезу на Synbio Technologies (США) відповідно до заданих послідовностей.

З генетичних елементів, що містяться у векторах нульового рівня, збирається транскрипційна одиниця у вектор першого рівня. До складу транскрипційної одиниці входять такі основні елементи: промотор, 5'-UTR, кодуєча послідовність (CDS), 3'-UTR, сигнальна послідовність (за потреби), термінатор. Генетичний вектор другого рівня може містити одну або кілька таких транскрипційних одиниць.

Процедура збирання транскрипційної одиниці передбачає виконання наступних подій:

- 1) Проведення рестрикції та лігування в одній реакції об'ємом 15 мкл, що потребує відповідних компонентів зазначених у таблиці 2.1.
- 2) Інкубування реакційної суміші в термостаті терміном до 24 годин за температури +37⁰С.
- 3) Інактивація активності рестриктази та лігази шляхом разової інкубації реакційної суміші на термоблоці при температурі +80⁰С 10 хвилин.

Таблиця 2.1

Склад реакційної суміші для збирання транскрипційної одиниці

№	Компонент	Концентрація	Об'єм, мкл
1	Усі елементи модуля * X ¹	100 нг/мкл	1*X
2	Вектор (плазміда)	100 нг/мкл	1
3	Лігазний буфер	10X	1,5

4	Розчин BSA ²	10 мг/мл	0,2
5	T4-ДНК лігаза	5 од/мкл	0,5
6	Рестриктаза <i>BsaI</i>	10 од/мкл	0,2
7	mQ H ₂ O	-	до 15

1 – кількість генетичних елементів (вставок); 2 - Bovine Serum Albumin (BSA) – бичачий сироватковий альбумін призначений для стабілізації ферментів та запобігає неспецифічному зв'язуванню.

На етапі отримання транскрипційних одиниць було створено 6 окремих модулів 1 рівня:

- 1) pI_{BE} 5-12 (Aad) – конститутивний убіквітиновий протор кукурудзи (*Zea mays*) поєднаний з 5'-UTR (Ω) вірусу тютюнової мозаїки (*Tobacco Mosaic Virus*, *TVM*) для підсилення трансляції [76]; ген, що кодує білок арилоксиалканонат діоксигенази (*aad*); послідовність термінації гену АТФази з регіоном 3'-UTR та сигналом поліаденілування томату (*Solanum lycopersicum*).
- 2) pI_{FT4}-1 (Als) – промотор і ділянка 5'UTR з гену RbcS2 (ділянка ядерного гена малої субодиниці рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази з *S. lycopersicum*); ген, що кодує фермент ацетолактатсинтаза (*als*); термінатор гена інгібітора протеїнази II картоплі (PinII) [77].
- 3) pI_{GEG1}-6-12 (Gox) – промотор гену, що кодує білок родини рибулозобісфосфаткарбоксилази (малий ланцюг) RbcS2B (AT5g38420) з *A. thaliana* [78]; ділянка 5'-UTR (Ω) *TVM* у комбінації з геном транзитного білка хлоропластів малої субодиниці Rubisco (RbcS) та полігістидинового хвоста (HIS tag) [76, 79]; ген гліфосатоксидази (*gox*); гістоновий H4 термінаторний регіон з 3'-UTR та полі-А послідовностями картоплі (*Solanum tuberosum*).
- 4) pI_{BEG2}-6-11 (ZmEpsps) – промотор гену *LHB1B1* - світлозбирального хлорофіл-білкового комплексу II субодиниці B1 (локус AT2g34430) *A. thaliana* [80]; ділянка 5'-UTR (Ω) з *TVM* у комбінації з геном транзитного білка хлоропластів малої субодиниці Rubisco (RbcS) та полігістидинового

хвоста (HIS tag) [76, 79]; ген, що кодує фермент фермент 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтаза (*zmepps*); термінатор гена *Atug7* разом з послідовністю 3'-UTR та сигналом поліаденілування *A. tumefaciens* [81].

- 5) pPEE9-6-12 (Dmo) – конститутивний убіквітиновий протор кукурудзи (*Zea mays*) з ділянкою 5'-UTR (Ω) *TVM* у комбінації з геном транзитного білка хлоропластів малої субодиниці Rubisco (RbcS) та полігістидинового хвоста (HIS tag) [76, 79]; ген, що кодує фермент дикамба монооксигеназа (*dmo*); послідовність термінації гену АТФази з регіоном 3'-UTR та сигналом поліаденілування томату (*Solanum lycopersicum*).
- 6) pICF3-11 (Bar) – промотор з 5'-UTR регіоном вірусу венозної мозаїки маніюки (*Cassava Vein Mosaic Virus*) [82]; ген *bar*, що кодує фермент фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу виділений із *Streptomyces hygroscopicus* [83]; термінатор 35s з 3'-UTR та полі-А послідовностями вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*).

У подальшому, транскрипційні одиниці 1 рівня було використано у 2 рівні клонування для складання двох мультигенних конструкцій:

- 1) pCombi35 - pBE 5-12 (Aad) → pFT4-1 (Als) → акцепторний вектор;
- 2) pQuadRes37 - pGEG1-6-12 (Gox) → pBEG2-6-11 (ZmEpsps) → pPEE9-6-12 (Dmo) → pICF3-11 (Bar) → акцепторний вектор.

Процедура клонування проводилася у реакційній суміші об'ємом 15 мкл, склад якої наведено у таблиці 2.1. Усі етапи здійснювалися відповідно до вищенаведеного пропису. Єдиним винятком є заміна ферменту рестрикції на *BpiI*, оскільки на цьому рівні наявні сайти розпізнавання виключно для цієї рестриктази.

Роль вектора виконує човникова плазмідна ДНК, що придатна для реплікації в бактеріальних клітинах *Escherichia coli* та *Agrobacterium tumefaciens*. Сам вектор має бактеріальну частину та Т-регіон призначений для рослини-

реципієнта [84]. T-регіон представляє собою ділянку, що оточена множинними сайтами рестрикції і є місцем вставки генетичної конструкції. У T-регіоні міститься маркерний ген, що втрачається після вдалого клонування і слугує інструментом для відбору колоній. Бактеріальна частина містить дві точки Ori (A для *A.tumefaciens* та E для *E.coli*), селективні гени (стійкість до антибіотика). Проміжний вектор клонування містить сайти рестрикції для *BsaI* та селективний маркер Amp^R, кінцевий вектор має сайти рестрикції для *BpiI* та селективний маркер Kn^R.

2.2 Підготовка бактерій до події трансформації

Перед трансформацією бактерій, попередньо необхідно приготувати сток компетентних клітин. Компетентність характеризує стан клітин, що визначає ступінь їх спроможності поглинати донорну плазмідну ДНК з навколишнього середовища. Цей етап передбачає хімічну стабілізацію заряду клітинної мембрани з метою послаблення її електронегативності.

2.2.1 Індукція компетентного стану клітин *Escherichia coli*

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище LB; бактеріальна культура *E.coli*; 0,1 mM CaCl₂; 0,1 mM CaCl₂ + 10 % гліцерин; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; пробірки типу фалькон 50 мл; ємкість з льодом; спектрофотометр (DeNovix DS-11, США); піпет-дозатори; наконечники (200 мкл, 1 мл); орбітальний шейкер (S-3 MICROmed, Україна); центрифуга (MPW-352R, Польща); термостат (TC-20 МІЗ-МА, Україна); ламінарний бокс.

У роботі було використано штам бактерій *E.coli* - Top 10, який оптимізований для лабораторних досліджень і взятий з Thermo Fisher Scientific Inc. (США).

Хід виконання роботи:

- 1) Нарощування нічної культури. Попередньо розморозити на льоду сток бактерій *E.coli*. У стерильний фалькон внести 30 мл середовища LB, склад

якого вказаний у таблиці 2. Додати 30 мкл антибіотика стрептоміцину та 100 мкл бактерії. Витримати ніч при температурі +37⁰С на шейкері.

- 2) Пересівання культури. До 50 мл середовища LB додати 1 мл нічної культури та 50 мкл антибіотика стрептоміцину. Нарощувати культуру 1-3 години при температурі +37⁰С у термошейкері. Виміряти оптичну щільність, значення якої має бути OD₆₀₀ ~ 0,6 - 0,8.
- 3) Охолодити бактеріальну суспензію в холодильнику при +4⁰С 15-20 хвилин. Здійснити центрифугування протягом 15 хвилин в охолодженій до +4⁰С центрифугі при 2 тис об/хв. Злити надосадову рідину. До осаду додати 40 мл охолодженого до +4⁰С розчину 0,1 mM CaCl₂. Ретельно ресуспендувати, витримати на льоду 1 годину. Повторно виконати центрифугування. Злити надосадову рідину. Внести до осаду 2 мл охолодженого до +4⁰С розчину 0,1 mM CaCl₂ + 10 % гліцерин. Ресуспендувати та тримати на льоду. Зробити аліквоти по 100 мкл у пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл. Помістити на зберігання при температурі -70⁰С.

Усі маніпуляції здійснювалися в ламінарному боксі. Важливим моментом є дотримання температурного режиму, задля запобігання перегріву пробірок на будь-якому з етапів.

Таблиця 2.2

Склад рідкого середовища LB

№	Компонент	Кількість, г
1	NaCl	10
2	Пептон	10
3	Дріжджовий екстракт	5
4	dH ₂ O	1000
5	pH = 7,5	

2.2.2 Індукція компетентного стану клітин *Agrobacterium tumefaciens*

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище LB; бактеріальна культура *A.tumefaciens*; стерильна mQ (деіонізована) H₂O; 10 %-вий водний розчин гліцеролу; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; пробірки типу фалькон 50 мл; стерильні баночки на 250 мл; ємкість з льодом; спектрофотометр (DeNovix DS-11, США); піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); орбітальний шейкер (S-3 MICROmed, Україна); центрифуга (MPW-352R, Польща); темостат (TC-20 МІЗ-МА, Україна); ламінарний бокс.

В якості вихідної культури було залучено штам бактерій *A.tumefaciens* – GV3301, який оптимізований для подій генетичної трансформації і має комерційне походження з Goldbio (Gold Biotechnology, Inc., США).

Хід виконання роботи:

- 1) Нарощування нічної культури. Попередньо розморозити на льоду сток клітин *A.tumefaciens*. У стерильний фалькон внести 30 мл середовища LB, склад якого вказаний у таблиці 2.2. Далі додати 15 мкл рифампіцину (50мг/л) та 100 мкл розмороженого стоку. Витримати ніч при температурі +28⁰С на шейкері.
- 2) Пересів культури. До 100 мл середовища LB додати 2 мл нічної культури. Нарощувати культуру 2-4 години при температурі +28⁰С у термошейкері. Виміряти оптичну щільність, значення якої має бути OD₆₀₀ ~ 0,5-0,6.
- 3) Асептично розлити суспензію в охолоджені фалькони по 50 мл, витримати на льоду 15 хвилин. Здійснити центрифугування протягом 15 хвилин в охолодженій до +4⁰С центрифугі при 3,6 тис об/хв. Злити надосадову рідину. Розчинити осад у 50 мл охолодженої деіонізованої води. Повторити центрифугування. Злити надосадову рідину та внести 25 мл охолодженої деіонізованої води, ретельно ресуспендувати. Провести центрифугування протягом 10 хвилин в охолодженій до +4⁰С центрифугі при 3,6 тис об/хв. Злити надосадову рідину та додати до осаду 5 мл

охолодженого розчину 10 %-вого гліцеролу. Центрифугувати протягом 7 хвилин в охолодженій до $+4^{\circ}\text{C}$ центрифугі при 3,6 тис об/хв. Злити надосадову рідину. Розчинити осад у 400 мл охолодженого розчину 10 %-вого гліцеролу. Зробити аліквоти по 50 мкл у пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл. Помістити на зберігання при температурі -70°C .

2.3 Хімічна трансформація *Escherichia coli*

Генетична трансформація *E.coli* здійснювалася методом Heat shock (тепловий шок), який ґрунтується на короткочасному нагріванні з подальшим різким охолодженням клітин. Проводиться з метою утворення тимчасових пор в плазматичній мембрані та проходження крізь них донорної ДНК у вигляді плазміди.

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище LB рідке; чашки Петрі з твердим середовищем LB; шпатель Дригальського; компетентні клітини *E.coli*; плазмідна рекомбінантна ДНК; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; ємкість з льодом; піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); термошейкер (TS-100 Biosan, Латвія); термостат (ТС-20 МІЗ-МА, Україна); центрифуга (Minispin Eppendorf, Німеччина); ламінарний бокс.

Хід виконання роботи. Здійснити розморозку компетентних клітин *E.coli* на льоду до повного розмерзання. Внести рекомбінантну плазмідну з розрахунку 200 нг ДНК на 70 мкл клітин. Інкубувати пробірки на льоду 15 – 30 хвилин. Розмістити пробірки на термошейкері з температурою $+42^{\circ}\text{C}$ на 90 секунд. Швидко перекласти пробірки на лід і витримати 2 хвилини. Додати до клітин 1 мл рідкого середовища LB (таблиця 2.2). Нарощувати бактерій на термошейкері у режимі 340 rpm (об/хв), тривалістю 1 годину при температурі $+38^{\circ}\text{C}$. Осадити клітини шляхом центрифугування протягом 5 хвилини при 3 тис об/хв. Злити надосадову рідину. Втерти суспензію клітин на тверде середовище LB (таблиця 2.3) на чашку Петрі за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Живильне середовище має містити селективний антибіотик. Інкубувати чашки у

термостаті при температурі +38⁰С 15 годин. Провести скринінг та відбір трансформованих колоній.

Таблиця 2.3

Склад твердого середовища LB

№	Компонент	Кількість, г
1	NaCl	10
2	Пептон	10
3	Дріжджовий екстракт	5
4	dH ₂ O	1000
5	Агар	15
6	pH = 7,5	

2.4 Електропорація *Agrobacterium tumefaciens*

Трансформація клітин *A.tumefaciens* проводилася методом електропорації. Такий підхід дає більшу ефективність трансформації, що зумовлено особливостями структури клітинної стінки *A.tumefaciens*. При цьому утворення пор відбувається під дією електричного струму.

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище SOC; чашки Петрі з твердим середовищем LB; шпателі Дригальського; компетентні клітини *A.tumefaciens*; плазмідна рекомбінантна ДНК; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; ємкість з льодом; піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); кювети для електропоратора з проміжком 0,1 см; електропоратор (MicroPulser BioRad, США); термошейкер (TS-100 Biosan, Латвія); термостат (ТС-20 МІЗ-МА, Україна); центрифуга (Minispin Eppendorf, Німеччина); ламінарний бокс.

Хід виконання роботи. Провести розморозку компетентних клітин *A.tumefaciens* на льоду до повного розмерзання. Додати рекомбінантну плазмідну з розрахунку 200 нг ДНК на 50 мкл клітин. Залишити пробірку на льоду 10-15

хвилини. Перенести вміст пробірки в стерильну охолоджену кювету (уникати утворення бульбашок повітря). Помістити кювету в електропоратор, здійснити електричний імпульс напругою 2,2 кВ. Без зволікань внести у кювету 1 мл середовища SOC (таблиця 2.4) і ресуспендувати. Перенести бактеріальну суспензію у пробірку типу «Еппендорф» 1,5 мл. Нарощувати клітини на термошейкері у режимі 340 rpm (об/хв), тривалістю 3 години при температурі +28°C. Осадити клітини шляхом центрифугування протягом 5 хвилини при 3 тис об/хв. Злити надосадову рідину. Втерти суспензію клітин на тверде середовище LB (таблиця 2.3) на чашку Петрі за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Живильне середовище має містити селективний антибіотик. Інкубувати чашки у термостаті при температурі +28°C 48 годин. Провести скринінг та відбір трансформованих колоній.

Таблиця 2.4

Склад рідкого середовища SOC

№	Компонент	Кількість, г
1	NaCl	10
2	Пептон	10
3	Дріжджовий екстракт	5
4	Глюкоза 40 %-ва	9 мл
5	MgSO ₄ 250 мг/мл	10 мл
6	dH ₂ O	1000
7	pH = 7,0	

4.5 Перевірка структурної організації та коректності зібраної конструкції

Після трансформації бактеріальних клітин клонованими плазмідами проводиться аналіз отриманих конструкцій. Метою є підтвердження успішного збирання рекомбінантної ДНК та визначення придатності вектора для його подальшого застосування у генетичній трансформації рослини-реципієнта. Для перевірки плазміді накопичують шляхом нарощування трансформованих клітин

E.coli. Далі здійснюється рестрикційний аналіз плазмідних ДНК з метою розуміння точності збирання як проміжних векторів, так і кінцевих генетичних конструкцій. Такий аналіз дає змогу встановити наявність цільової вставки та оцінити придатність генетичних векторів для використання на наступних етапах роботи. Процедура передбачає проведення гідролізу кільцевої молекули ДНК у специфічних сайтах рестрикції за допомогою ендонуклеаз рестрикції на відомі за розміром фрагменти та їх розділення за допомогою гель-електрофорезу.

4.5.1 Накопичення та виділення плазмідної ДНК

- ✓ Матеріали та обладнання для нарощення бактеріальної суспензійної культури: живильне середовище LB рідке; трансформовані бактерії *E.coli*; пробірки типу фалькон 50 мл; пінцет; стерильні зубочистки; стерильні баночки на 250 мл; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); орбітальний шейкер (S-3 MICROmed, Україна); центрифуга (MPW-352R, Польща); ламінарний бокс.

Для накопичення плазмідної ДНК необхідно наростити бактеріальну культуру з колонії клітин, що є потенційно трансформованими. Для цього у стерильну баночку внести 30 мл рідкого середовища LB (таблиця 2) та 30 мкл селективного антибіотика. Стерильним пінцетом взяти стерильну зубочистку та її кінчиком відібрати колонію, перенести в середовище. Інкубувати у термостаті на шейкері протягом ночі при температурі +37⁰С. Нічну культуру перенести у стерильний фалькон. Провести центрифугування протягом 10 хвилин при 3,5 тис об/хв при кімнатній температурі. Злити надосадову рідину. Осад клітин перенести у пробірку типу «Еппендорф» 1,5 мл. Можливе короткострокове зберігання у морозильній камері при -20⁰С.

Подальше виділення ДНК проводилося за допомогою реагентів з комерційного набору ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit (Zymo Research, США). До складу набору входить буфер P1, P2, P3, буфер для промивання (Endo-Wash Buffer), буфер для очищення плазмід (Plasmid Wash Buffer) та колонки Zymo-Spin IIN (рис. 2.1).



Рис. 2.1 Реагенти комерційного набору ZR Plasmid Miniprep-Classical Kit для виділення плазмід

- ✓ Матеріали та обладнання для виділення плазмідної ДНК: клітини трансформованих бактерій *E.coli*; стерильна mQ (деіонізована) H₂O; буфери P1, P2, P3; буфер для промивання (Endo-Wash Buffer), буфер для очищення плазмиди (Plasmid Wash Buffer); спін-колонки; пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл; мікропробірки на 2 мл без кришки; піпет-дозатори; наконечники (200 мл, 1 мл); центрифуга (Minispin Eppendorf, Німеччина); спектрофотометр (DeNovix DS-11, США).

Хід виконання роботи. До осаду бактеріальних клітин додати 200 мкл буферу P1 та ретельно ресуспендувати (Рис. 2.2). До отриманої суміші внести 200 мкл буферу P2 і знову ресуспендувати. Додати 400 мкл буферу P3 та добре струсити до однорідного жовтого кольору. Центрифугувати протягом 2 хвилин при 11 тис об/хв. Перенести супернатант піпет-дозатором у спін-колонку, яка розміщена у мікробробірці без кришки. Центрифугувати протягом 30 секунд при 11 тис об/хв. Злити рідину з мікробробірки. Внести в колонку 200 мкл буферу для промивання та провести центрифугування протягом 30 секунд при 11 тис об/хв. Додати в колонку 400 мкл буферу для очищення плазмиди і центрифугувати протягом 1 хвилини при 11 тис об/хв. Перемістити колонку в пробірку типу «Еппендорф» на 1,5 мл та додати 40 мкл mQ H₂O, здійснити центрифугування протягом 30 секунд при 11 тис об/хв. Виміряти концентрацію

виділеної плазмідної ДНК за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 260 нм (ультрафіолетовий діапазон).

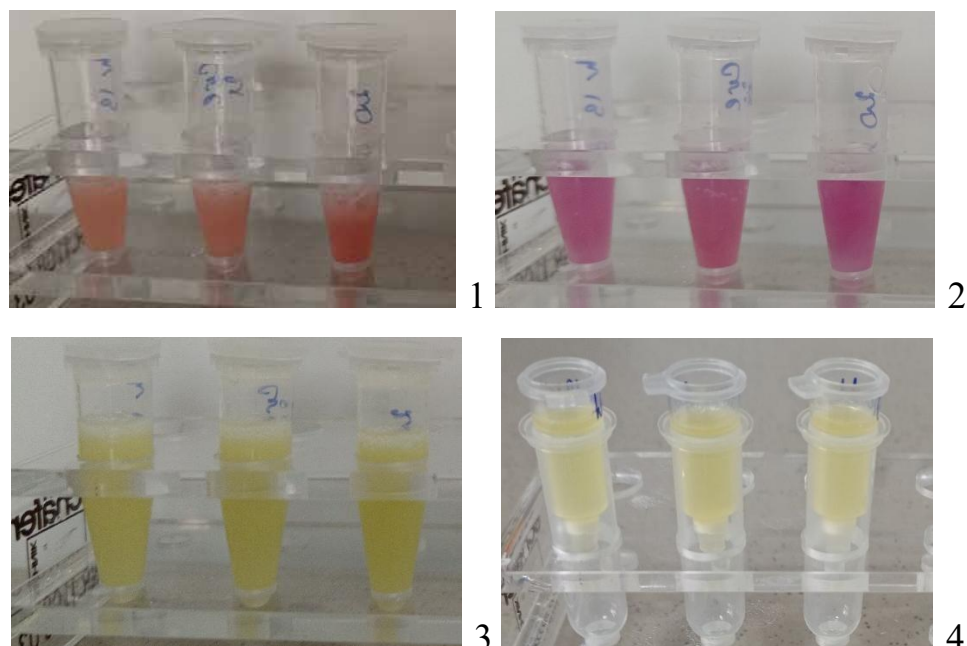


Рис. 2.2 Демонстрація зміни кольору при додаванні різних буферів. 1 – буфер P1, 2 – буфер P2, 3 – буфер P3, 4 – супернатант у спін-колонках.

4.5.2 Рестрикція векторних молекул ДНК

- ✓ Матеріали та обладнання: плазмідна рекомбінантна ДНК; реактиви; пробірки типу «Еппендорф» 0,5 мл; піпет-дозатори; наконечники (10 мкл, 100 мкл); стерильна mQ (деіонізована) H₂O; центрифуга (Minispin Eppendorf, Німеччина); термоблок лабораторний (Boeckel Grant PDB-1, США); термостат (ТС-20 МІЗ-МА, Україна).

Витратні реактиви беруться з комерційного набору FastDigest Value Pack № K1991 (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). В якості буфера для рестрикції використовується FastDigest Green Buffer (10X), що дозволяє візуалізувати продукти розділення в агарозному гелі без додаткового внесення барвника. Також з цього набору використовуються різні ферменти ендонуклеаз рестрикції, що підбираються за сайтами рестрикції, що безпосередньо містяться на аналізованій плазміді.

Підбір рестриктаз проводиться за допомогою програмного забезпечення Serial Cloner 2.6. На етапі перевірки проміжних векторів використано наступні

ферменти: EcoR I, Not I, Hind III, Sal I, BamH I, Nde I, Xba I. Для аналізу кінцевих векторів з мультигенними конструкціями використано рестриктази Hind III, BamH I, Xba I.

Замішування реакційної суміші на 15 мкл:

- 1) Буфер для рестрикції (10X) – 2 мкл;
- 2) Рестриктаза¹ (10 од/мкл) – 0,2 мкл;
- 3) ДНК матриця – X* мкл;
- 4) mQ H₂O – до 15 мкл від загального об'єму.
- 5) Здійснити центрифугування при 11 тис об/хв 10 секунд.
- 4) Інкубувати реакційну суміш в термостаті до 24 годин за температури +37°C.
- 5) Інактивувати активність рестриктази шляхом разової інкубації реакційної суміші у термоблоці при температурі +80°C 10 хвилин.
- 6) Провести розділення продуктів реакції за допомогою електрофорезу.

* - об'єм залежить від концентрації плазмідної ДНК в розчині, що береться з розрахунку 800-1000 нг на реакцію; ¹ – у разі використання більше одного виду рестриктаз, кожної береться по 0,1 мкл на реакцію.

4.5.3 Проведення ампліфікації цільових вставок генетичної конструкції методом ПЛР

Клітини *A.tumefaciens* перевіряються на подію успішності трансформації шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції окремих колоній-трансформантів, що потенційно містять цільову плазмиду. Такий підхід дозволяє виявити нуклеотидну послідовність, що відповідає певному гену і встановити його присутність в генетичній конструкції. Це допомагає підібрати колонію клітин *A.tumefaciens*, що придатна для перенесення векторної плазмиди у рослину-реципієнта під час генетичної трансформації.

- ✓ Матеріали та обладнання: клітини-трансформанти *A.tumefaciens*; стерильні зубочистки; пінцет; реактиви (праймери, DreamTaq PCR Master Mix);

пробірки типу «Еппендорф» 0,2 та 0,5 мл; піпет-дозатори; наконечники (10 мкл, 100 мкл); стерильна mQ (деіонізована) H₂O; центрифуга (Minispin Eppendorf, Німеччина); термоблок лабораторний (Boeckel Grant PDB-1, США); термоциклер (T100 BioRad, США); ламінарний бокс.

Для проведення реакції ПЛР використовується комерційна суміш DreamTaq PCR Master Mix №K1071 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Склад Master Mix: DreamTaq ДНК полімераза (5 од/мкл); 2X DreamTaq буфер; dATP, dCTP, dGTP, dTTP (0,4 mM кожного); MgCl₂ 4 mM. Праймери синтезовані на замовлення на Macrogen (Нідерланди).

Підготовка ДНК матриці для ПЛР. У пробірки типу еппендоф на 0,5 мл внести по 20 мкл стерильної mQ H₂O. У межах ламінарного боксу відібрати з чашки Петрі стерильною зубочисткою половину колонії (розміром ~ 2 мм) трансформованих клітин *A.tumefaciens* та ресуспендувати у пробірці з mQ. Провести прогрівання пробірок на термоблоці при температурі +95⁰C 10 хвилин для вивільнення плазмідної ДНК [85]. Охолодити. Відцентрифугувати протягом 30 секунд при 11 тис об/хв. Використовувати надосадову рідину для реакції ПЛР.

Замішування реакційної суміші на 20 мкл:

- 1) DreamTaq PCR Master Mix (2X) – 10 мкл;
- 2) Праймер прямий (10 мкМ/мкл) – 0,5 мкл;
- 3) Праймер зворотній (10 мкМ/мкл) – 0,5 мкл;
- 4) ДНК матриця (100-200 нг) – 2 мкл;
- 5) mQ H₂O – 7 мкл.

Аналіз генетичних конструкцій методом ПЛР проводиться з використанням праймерів для ідентифікації генів *aad*, *als*, *dmo*, *zmepps*, *gox*, *bar*. Інформація щодо програми ПЛР та продуктів ампліфікації наведено у таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Програма ПЛР та продукти ампліфікації для різних генів

Ген	<i>Aad</i>	<i>Als</i>	<i>Dmo</i>	<i>Zmepps</i>	<i>Gox</i>	<i>Bar</i>

Праймер прямий	GGA AGG GTG ATT GGT GAT G	CAA GGA CAT CCA GCA GC	CTC GAA AGG GAG GTC ATC	ATG GCC GGC GCC GAG GA GAT	ATG GCT GAG AAC CAC AAG AA	GGC TTG ACC TTG ATG GAG AGA
Праймер зворотній	GCA TGG TTG GGG ACA AG	CCA TAA GAG TAG TTG TGA CC	CTA ATA CCG TTC GCC TCA AC	TTA ATT CTT GAC GAA AGT GCT CAG C	TTA GGA TGC AGG ACC AGT TT	GGG GAT ACG TAC ACG GTT GA
Розмір продукту, п.н.	157	236	413	1338	1296	349
Програма ПЛР аналізу						
I – ПД ¹	95 ⁰ C 5хв	95 ⁰ C 5хв	95 ⁰ C 5хв	95 ⁰ C 5хв	95 ⁰ C 5хв	95 ⁰ C 5хв
II – цикл:	30 разів	30 разів	30 разів	35 разів	35 разів	30 разів
а)	95 ⁰ C 30с	95 ⁰ C 30с	95 ⁰ C 30с	95 ⁰ C 45с	95 ⁰ C 45с	95 ⁰ C 30с
б)	55 ⁰ C 30с	56 ⁰ C 30с	56 ⁰ C 30с	58 ⁰ C 45с	56 ⁰ C 45с	58 ⁰ C 30с
в)	72 ⁰ C 30с	72 ⁰ C 30с	72 ⁰ C 35с	72 ⁰ C 80с	72 ⁰ C 70с	72 ⁰ C 40с
III – KE ³	72 ⁰ C 5хв	72 ⁰ C 5хв	72 ⁰ C 5хв	72 ⁰ C 5хв	72 ⁰ C 5хв	72 ⁰ C 5хв

1 – первинна денатурація (ПД), а – денатурація, б) відпал праймерів, в) елонгація, 3 - кінцева елонгація (KE).

4.5.4 Розділення продуктів реакції ПЛР та рестрикції

Розділення нуклеїнових кислот проводиться за допомогою горизонтального електрофорезу в агарозному гелі щільністю 1,7% (для продуктів рестрикції) та 1,5% (для продуктів ПЛР). Для візуалізації фрагментів ДНК використовується інтеркалюючий барвник етидіум бромід, для завантаження в лунку - барвник DNA Loading Dye 6X № R0611 (Thermo Scientific™, США). Цей буфер містить у своєму складі бромфеноловий синій, ксилол-ціанол FF, гліцерин, EDTA. В якості молекулярного маркера застосовується GeneRuler 50 bp № SM0373 та GeneRuler 1 kb № SM0313 (Thermo Scientific™, США).

- ✓ Матеріали і обладнання: реакційна суміш після рестрикції та ПЛР; реактиви (барвник для ДНК, маркер 50 п.н. та 1 кб, етидіум бромід); буфер

TBE 1X; агароза (N605-500G AGAROSE RA TM, Amresco (США)); піпет-дозатор; наконечники (200 мкл); форма для заливки агарозного гелю та гребінки; ванна для електрофорезу (Sub-Cell Model 96 BioRad, США); блок живлення (PowerPac №1645070, BioRad (США)); УФ транслюмінатор (3UV TM LMS-26E, США).

Приготування агарозного гелю. Взяти наважку агарози. Розчинити у 100 мл буферу TBE 1X (таблиця 2.6). Розтопити у мікрохвильовій печі до повного розчинення. Трохи охолодити та додати барвник етидіум броміда у розрахунку 8-10 мкл на 100 мл розчину агарози. Залити гель у форму та встановити гребінки.

Таблиця 2.6

Склад буферу TBE 10X*

Компонент	Кількість
Тріс (2-аміно-2-(гідроксиметил)-1,3-пропандіол)	108 г
Борна кислота	55 г
ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота)	7,5 г
dH ₂ O	1 л

* - для електрофорезу використовується буфер TBE 1X, тому треба взяти 100 мл TBE 10X і довести дистильованою водою до 1л.

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот проводилося при параметрах: напруга 100 вольт тривалість 30 хвилин – для продуктів ПЛР, напруга 100 вольт тривалість 60 хвилин для продуктів рестрикції.

4.6 Робота з модельним об'єктом *Arabidopsis thaliana*

A.thaliana використовується для заключної перевірки функціональності зібраної генетичної конструкції та експресії цільових генетичних елементів. В якості модельного об'єкту використовується екотип Columbia, отриманий з Євразійського арабідопсисного стокового центру (NASC, Англія).

4.6.1 Вирощування рослин

Склад ґрунтової суміші: 5 л торфу; 2 л піску; 1,5 л перліту; 1,5 л вермикуліту; 1,5 л води.

Посів рослин було здійснено в горщики об'ємом на 0,2 л. Поверхня спеціально накривалася плівкою для запобігання пересиханню ґрунту. Протягом усього періоду росту забезпечувалися сталі умови: світловий день тривалістю 14 годин, температура +21⁰С, відносна вологість 50%, періодичний полив по мірі підсихання ґрунту.

4.6.2 Стабільна трансформація *Arabidopsis thaliana* методом «Floral dip»

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище LB; бактеріальна культура *A.tumefaciens*; живильне середовища для інфільтрації; рослини *A.thaliana*; пробірки типу фалькон 50 мл; стерильні баночки на 250 мл; ПАР «Сільвет» (Momentive Performance Materials Ink, США); спектрофотометр (DeNovix DS-11, США); піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); орбітальний шейкер (S-3 MICROmed, Україна); центрифуга (MPW-352R, Польща); темостат (TC-20 МІЗ-МА, Україна); вакуумний ексікатор; компресор; ламінарний бокс.

Підготовка бактеріальної суспензії для трансформації *A.thaliana*. Відібрати колонію *A.tumefaciens*, попередньо перевірену на предмет успішності трансформації. Помістити культуру в 30 мл рідкого середовища LB з додаванням антибіотиків: 30 мкл канаміцину (100мг/мл) та 60 мкл рифампіцину (25мг/мл). Нарощувати на орбітальному шейкері при температурі +28⁰С протягом ночі. Освіжити культуру шляхом внесення 2 мл нічної культури у 50 мл свіжого рідкого середовища LB з додаванням антибіотиків: 50 мкл канаміцину (100 мг/л) та 100 мкл рифампіцину (25 мг/л). Нарощувати на шейкері при температурі +28⁰С протягом 2-3 годин. Перелити бактеріальну культуру у фалькон та осадити у центрифугі протягом 10 хвилини при 3,5 тис об/хв за кімнатної температури. Злити надосадову рідину. Ресуспендувати осад клітин в об'ємі живильного середовища (таблиця 2.7) необхідного для досягнення OD₆₀₀ ~ 0,8-1. Внести до

отриманої суспензії поверхнево-активну речовину Сільвет у розрахунку 0,05% від об'єму. Ретельно перемішати.

Таблиця 2.7

Склад живильного середовища для інфільтрації (модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, МС)

Компонент	Концентрація	Кількість
Макро МС	10X	100 мл
Мікро МС	100X	1 мл
Вітаміни МС	1000X	1 мл
Fe-хелат*	100X	10 мл
Міоїнозитол	-	0,1 г
6-бензиламінопурин (БАП)	1 мг/мл	5 мл
Сахароза	5%	50 г
dH ₂ O	-	1 л
pH = 5,6-5,8		

* - містить Na₂EDTA•2H₂O (37,3 мг/л), FeSO₄•7H₂O (27,8 мг/л).

Проведення вакуумної інфільтрації *A.thaliana* (Рис. 2.3). Рослини *A.thaliana*, що містяться у стаканчиках з ґрунтом, перевернути та помістити наземну частину у ємність з бактеріальною суспензією настільки, щоб суцвіття та його найближчі тканини були повністю занурені. Переставити ємність у вакуумний ексикатор, під'єднаний до компресора. Здійснити інфільтрацію рослини бактеріальною суспензією при 0,6 атм, витримати під вакуумом 10 хв. Інфільтровану рослину накрити пластиковим циліндром для запобігання втрати вологи. Залишити у темному вологому місці при кімнатній температурі. Наступного дня зняти ковпак та помістити рослини у теплицю з умовами: світловий день тривалістю 14 годин, температура +21⁰С, відносна вологість 50%, припинення поливу на 15 добу від інфільтрації. Вирощувати до утворення насіння (близько 1 місяця). Зібрати насіння. Провести відбір трансформантів.

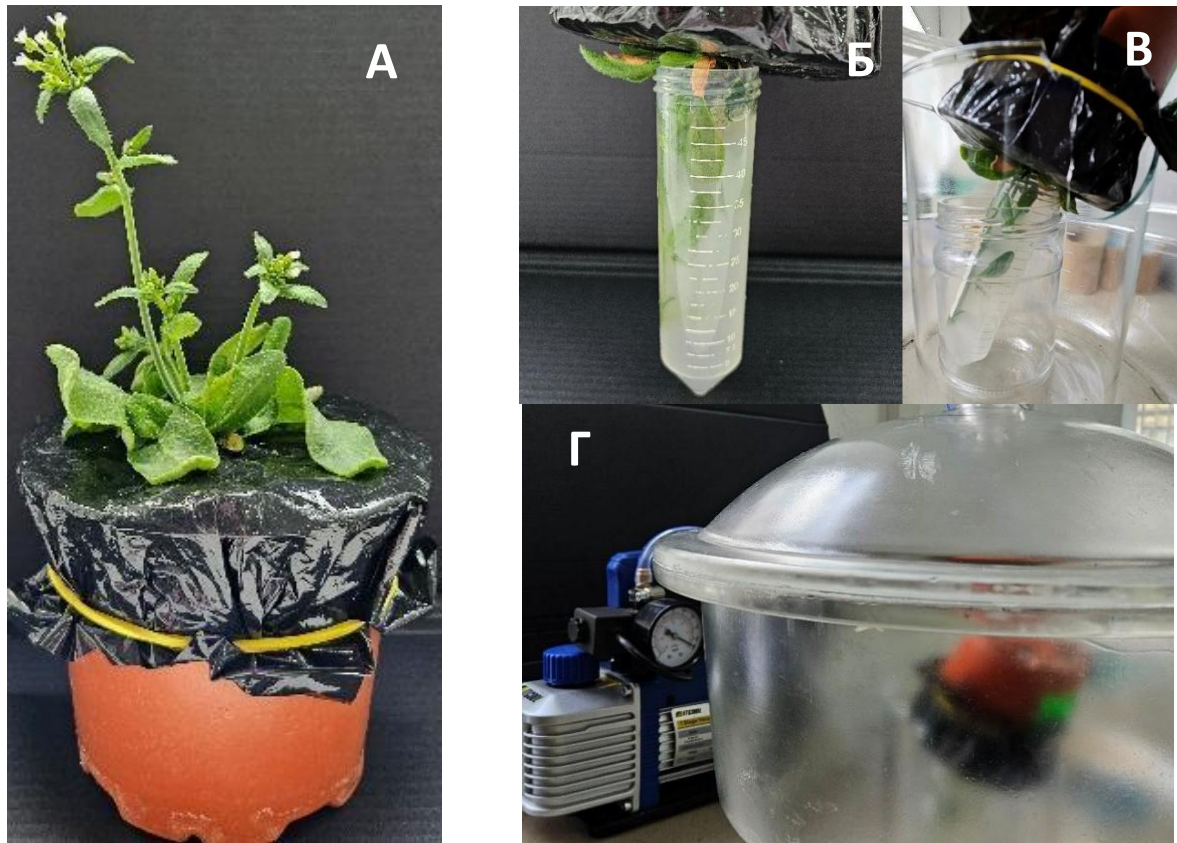


Рис. 2.3 Вакуумна інфільтрації *A.thaliana*. А – вихідна рослина; Б – занурені пагони у агробактеріальну суспензію; В – розміщення у вакуумному ексікаторі; Г – витримка під вакуумом.

4.6.3 Відбір трансформантів

Зібране насіння перевіряється на подію трансформації шляхом висіву рослин на селективне живильне середовище в умовах *in vitro*. Процедура перевірки включає стерилізацію насіння, висів на чашку Петрі із селективним живильним середовищем, відбір стійких рослин, виведення з культури *in vitro* та адаптація, пересаджування в ґрунт, самозапилення трансформантів, збір насіння, подальше тестування наступних поколінь на присутності цільової ознаки.

- ✓ Матеріали та обладнання: живильне середовище; чашки Петрі; насіння трансформованої рослини *A.thaliana*; пробірки типу фалькон 15 мл; спирт 76-%; Білизна; пінцет; піпет-дозатори; наконечники (10 мл, 200 мл, 1 мл); ламінарний бокс.

Стерилізація насіння з інфільтрованої рослини *A.thaliana*. Помістити необхідну кількість сухого насіння у стерильну пробірку типу фалькон на 15 мл.

Залити спиртом 76% на 2 хвилини так, щоб покритися все насіння. Злити спирт. Додати 50-відсотковий розчин Білизни та залишити на 10 хвилин. Злити розчин Білизни. Промити стерильною дистильованою водою у достатній кількості 3-4 рази. Максимально злити рідину.

Посів стерилізованого насіння *A.thaliana* проводився на чашки Петрі з живильним середовищем (таблиця 2.8), доповненим селективними агентами для відбору [83]. В якості селективного агента використовується діюча речовина фосфінотріцин (для відбору рослин з геном *bar*) та етаметсульфол-метил (для відбору рослин з геном *als*). Після посіву чашки Петрі розмістити в культуральній кімнаті і культивувати в умовах 16-годинного світлового дня, температури +23⁰С, відносній вологості 50%.

Таблиця 2.8

Склад живильного середовища

Компонент	Кількість
Міоїнозитол	0,1 г
Нікотинова кислота (В ₃)	0,5 мг
Тіамін НСІ	0,1 мг
Піридоксин НСІ	0,5 мг
Гліцин	2 мг
МЕС-буфер*	0,5 г
Аденін гемісульфатна сіль	0,04 г
Сахароза	20 г
Полівінілпіролідон (PVP-40)	0,5 г
Агар-агар	8 г
Нафтилоцтова кислота (NAA)	0,1 мг
6-бензиламінопурин (БАП)	1 мг
Гіберелова кислота	0,01 мг
Нітрат срібла	2 мг
Селективний агент ¹	-
dH ₂ O	1 л
pH = 5,6-5,8	

* - 2-морфолінетансульфонова кислота моногідрат; ¹ – фосфінотріцин (PPT) у концентрації 10 мг/л або етаметсульфол-метил у концентрації 0,1 мг/л.

Провести скринінг стійких рослин через 5-7 днів. Потенційно трансформовані рослини перенести на свіже живильне середовище ідентичного

складу після появи справжніх листків. Витримати *A.thaliana* на чашках Петрі протягом 1-2 тижнів для уникнення хибно позитивних результатів [86]. Після зазначеного терміну перенести рослини з живильного середовища у ґрунт (склад наведено у пункті 4.6.1) з обов'язковою промивкою експлантів дистильованою водою від залишків середовища. Накрити рослини пластиковим циліндром для створення мікроклімату. Культивувати у теплиці при умовах: світловий день тривалістю 14 годин, температура +21⁰С, відносна вологість 50%, періодичний полив по мірі підсихання ґрунту. Провести поступову акліматизацію рослин шляхом періодичного зняття пластикового циліндру зі збільшенням часу витримки до повної адаптації. Здійснити самозапилення рослин та зібрати насіння з кожного трансформанта.

4.6.4 Детекція ГМ білків за допомогою тест-смужок

Для підтвердження успішності трансформації та оцінки рівня експресії цільових генів проводиться первинне визначення наявності ГМ білків у трансгенній рослині. Перевірка відбувається за допомогою імунохроматографічного аналізу, а саме методом латерального потоку на тест-смужках. Тест-система бокового потоку складається із зони нанесення рідкого зразка, звідки він мігрує по нітроцелюлозній мембрані за рахунок капілярних сил. У кон'югатній зоні цільовий білок специфічно зв'язується зі міченими антитілами, утворюючи імунний комплекс, який далі транспортується потоком. У тестовій зоні мембрани розміщені іммобілізовані антитіла, що фіксують комплекс «аналіт-мічене антитіло», формуючи видиму смугу. Надлишкові мічені антитіла продовжують рух і зв'язуються у контрольній зоні з вторинними антитілами, які розпізнають мічені антитіла незалежно від наявності аналіту, слугуючи індикатором коректності тест-системи. До переваг цього підходу можна віднести простоту виконання, швидке отримання результатів, відсутність потреби в обладнанні, чутливість навіть до малих концентрацій білку, можливість застосування у польових умовах.

Для аналізу використовуються комерційні тест-смужки AgraStrip^R (Romer Labs, Австрія). У межах роботи проводиться виявлення білку DMO (DMO Test Strips № 10001482) з межею виявлення 0,1 %, Epsps (EPSPS Test Strips № 10001187) з якісним визначенням, Bar (TraitChek LL № 10001169).

Проведення експрес-тесту на визначення ГМ білків. Взяти наважку 50-100 мг листочків з трансформантів *A.thaliana* на 15-20 день після виведення з культури *in vitro*. Перетерти рослинний матеріал у ступці з додаванням 5 мл дистильованої води. Поставити у розчин тест-смужку. Зачекати 5-10 хвилин. Спостерігати наявність двох смужок – позитивний результат, однієї – негативний (Рис. 2.4).

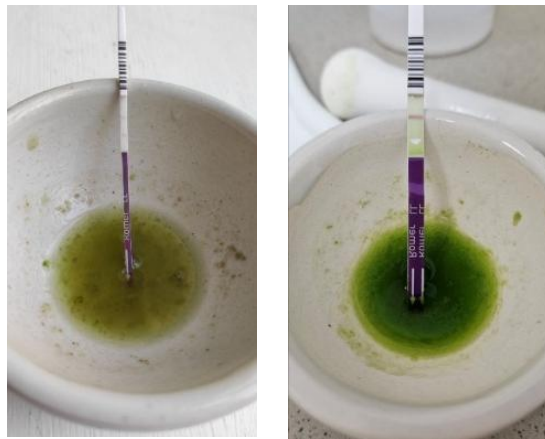


Рис. 2.4 Проведення експрес-тесту на визначення ГМ білків у *A.thaliana*.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ

3.1 Модульне клонування генетичних елементів у транскрипційні одиниці

Методом Golden Gate було здійснено збірку генетичних конструкцій першого рівня у складі проміжних векторів. Основою вектора є плазмідна ДНК, що містить бактеріальний селективний ген стійкості до антибіотика ампіциліну, точку початку реплікації у клітинах *E.coli*, сайти рестрикції та T-регіон. У ході роботи було створено шість одиниць рекомбінантної ДНК: pIBE 5-12, pIFT4-1, pIGEG1-6-12, pIBEG2-6-11, pIPEE9-6-12, pICF3-11 (Рис. 3.1).

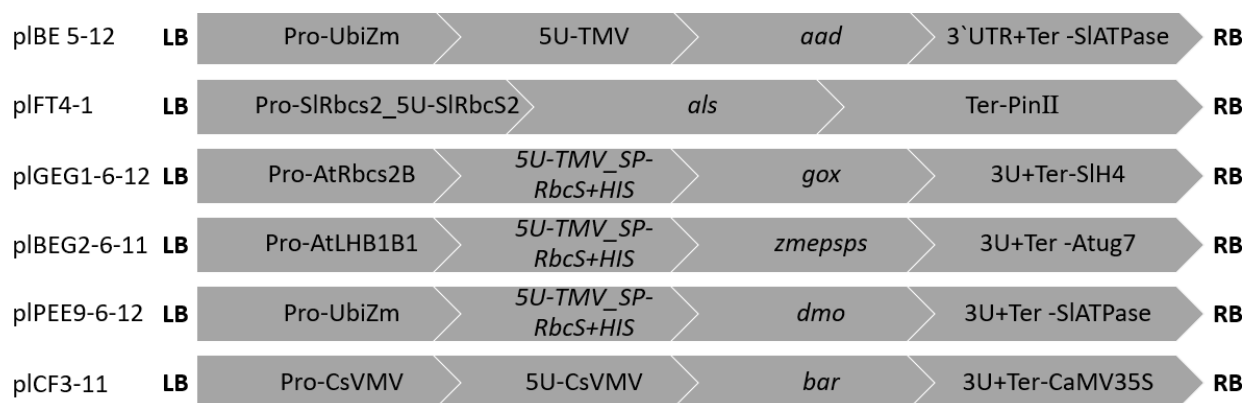


Рис. 3.1. Схема транскрипційних одиниць першого рівня клонування

Плазміда pIBE 5-12 містить транскрипційну одиницю, що несе ген арилоксиалканоат діоксигенази під убіквітиновим промотором кукурудзи (забезпечує високу транскрипцію гена в одно- та дводольних рослинах) та омега-послідовністю з ВТМ для посиленого рівня експресії білка. Ген *aad* забезпечує стійкість до гербіцидів із групи арилоксиалканоатів, зокрема до 2,4-D. До складу плазмиди pIFT4-1 входить ген ацетолактатсинтази, що призначений для формування несприйнятливості рослин до гербіцидів класу сульфонілсечовин. Знаходиться під регуляцією промотора з гену малої одиниці RuBisCO, що активний у фотосинтетичних тканинах і використовується для таргетованої експресії, та 5'-UTR для ефективною ініціації трансляції. Плазміда pIGEG1-6-12 включає ген гліфосатоксидази, що міститься під контролем промотора гену малого ланцюга рибулозобісфосфаткарбоксилази (RbcS2B) для природної активності експресії, 5'-UTR з ВТМ для ефективного утворення мРНК. Плазміда pIBEG2-6-11 має ген 5-енолпіруватшкімат-3-фосфатсинтазу, що регулюється

промотором світлозбирального комплексу (LNB1B1) і забезпечує високу активність у зелених частинах рослини. Плазмідна рlGEG1-6-12 і рlBEG2-6-11 призначена для надання стійкості проти гербіциду гліфосату. До складу плазмідної рlPEE9-6-12 входить ген дикамба монооксигеназа, що регулюється промоторною послідовністю кукурудзяного убіквітіну, та сприяє толерантності до гербіциду дикамба. Плазмідна рlCF3-11 містить ген *bar*, що кодує фермент фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу, і використовується в якості селективного маркера для відбору трансформантів з використанням фосфінотрицину (PPT).

Для накопичення плазмідних ДНК, що містять цільові генетичні конструкції, було проведено трансформацію компетентних бактеріальних клітин *E.coli* штаму Top 10. Скринінг клітин-трансформантів здійснено шляхом позитивного відбору на основі селективного маркера (антибіотик ампіцилін) і негативного відбору проти візуального маркера. Візуальним маркером у плазміді є ген *lacZ*, який розташований у T-зоні та фланкований сайтами рестрикції. При успішній події клонування, зазначений ген гідролізується та замінюється на цільову вставку, тому колонії мають білий колір. Порожні вектори містять ген *lacZ*, тому колонії мають синє забарвлення. Продуктом гену *lacZ* є β -галактозидаза, утворення якої індукує ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид (IPTG) та 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-галактопіранозид (X-gal), що є субстратом. У результаті розщеплення X-gal β -галактозидазою, утворюється синій барвник індиго, що слугує індикатором відбору. Отримані після трансформації біло-блакитні колонії *E.coli* (з проміжними векторами) зображені на рисунку 3.2.

З кожної чашки було обрано 2-3 білі колонії для нарощення суспензійної культури на рідкому середовищі LB з додаванням антибіотику ампіциліну у концентрації 100 мг/л. У подальшому було здійснено виділення плазмідної ДНК на спін-колонках та реактивами з комерційного набору ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit (Zymo Research, США).

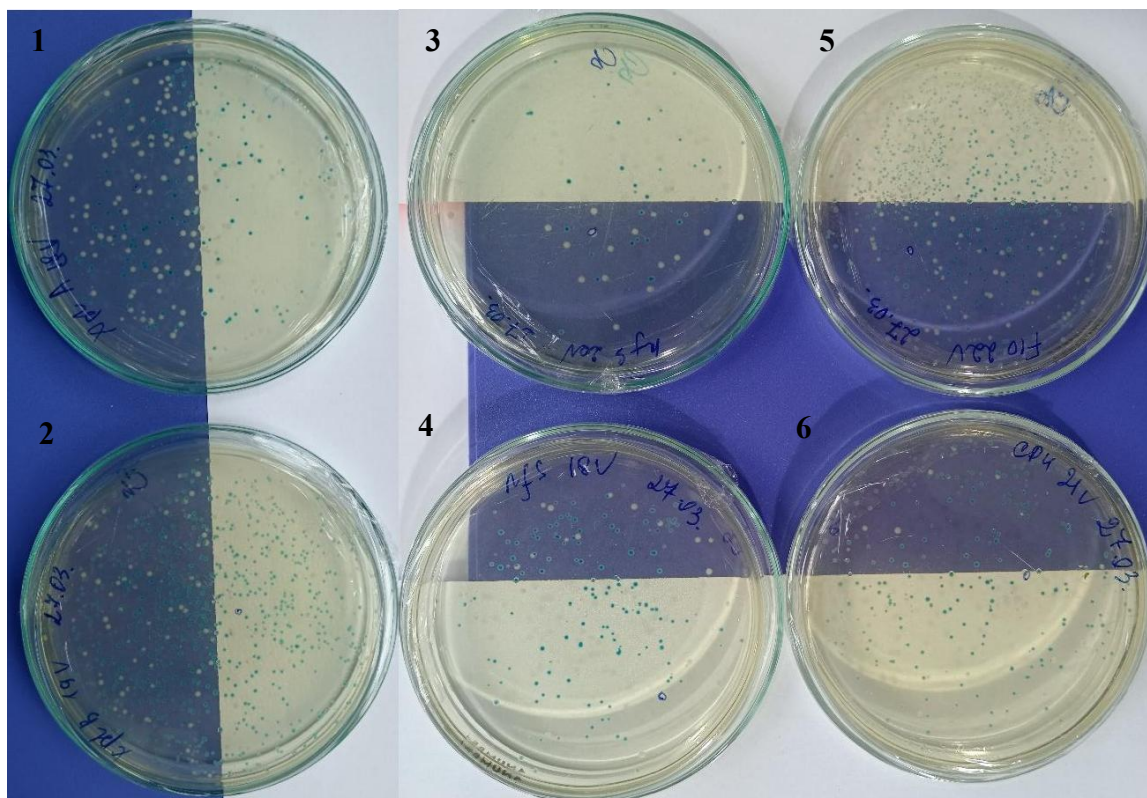


Рис. 3.2 Біло-блакитні колонії *E. coli*, що несуть генетичні конструкції: 1 - pIBE 5-12, 2 - pIFT4-1; 3 - pIGEG1-6-12, 4 - pIBEG2-6-11, 5 - pIPEE9-6-12, 6 - pICF3-11.

Перевірка плазмідної ДНК на предмет успішного клонування транскрипційних одиниць проводилася шляхом рестрикційного аналізу. Підбір ендонуклеазних ферментів рестрикції здійснювався індивідуально для кожного проміжного вектора на основі програмного забезпечення Serial Cloner 2.6.

На цьому етапі було проаналізовано 14 векторних плазмід першого рівня для ідентифікації 6 генетичних конструкцій. Перелік використаних ферментів рестрикції наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Перелік використаних ферментів рестрикції та очікувані продукти

№	Назва конструкції	Розмір, п.н.	Рестриктази	Кількість фрагментів	Очікувані розміри, п.н.
1	pIBE 5-12	6716	EcoRI, NotI	3	4399, 2005, 312

2	pLFT4-1	7270	HindIII, SaII	3	5443, 1335, 492
3	plGEG1-6-12	6941	BamHI, HindIII, NotI	3	4330, 2293, 318
4	plBEG2-6-11	6858	NdeI, NotI	3	3591, 2358, 909
5	plPEE9-6-12	7070	NdeI, SaII, XbaI	3	3946, 2561, 563
6	plCF3-11	5653	NdeI, NotI	3	3591, 1630, 432

Потім виконано електрофоретичне розділення рестриктів в агарозному гелі та спостереження продуктів за допомогою транслюмінатора (Рис. 3.3). У цілому для оцінки клонування було взято по дві бактеріальні колонії-трансформантів на кожну конструкцію та по три для плазмід plBEG2-6-11, plPEE9-6-12 (Рис. 3.4). У результаті, щонайменше один зразок містив необхідні фрагменти, що свідчить про успішність акту клонування транскрипційних одиниць у проміжні вектори. Таким чином, зразки 1, 3, 6, 8, 9, 12 були задіяні в наступних етапах роботи.

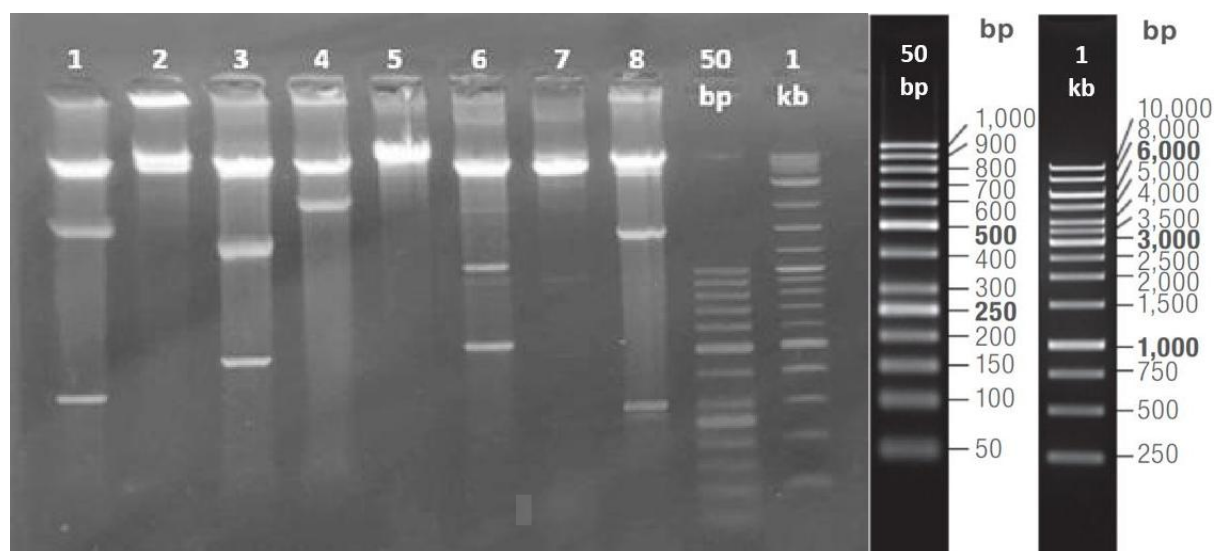


Рис. 3.3 Електрофореграма рестриктів. 1, 2 - plGEG1-6-12; 3, 4 - plCF3-11; 5, 6 - plFT4-1; 7, 8 - plBE 5-12.

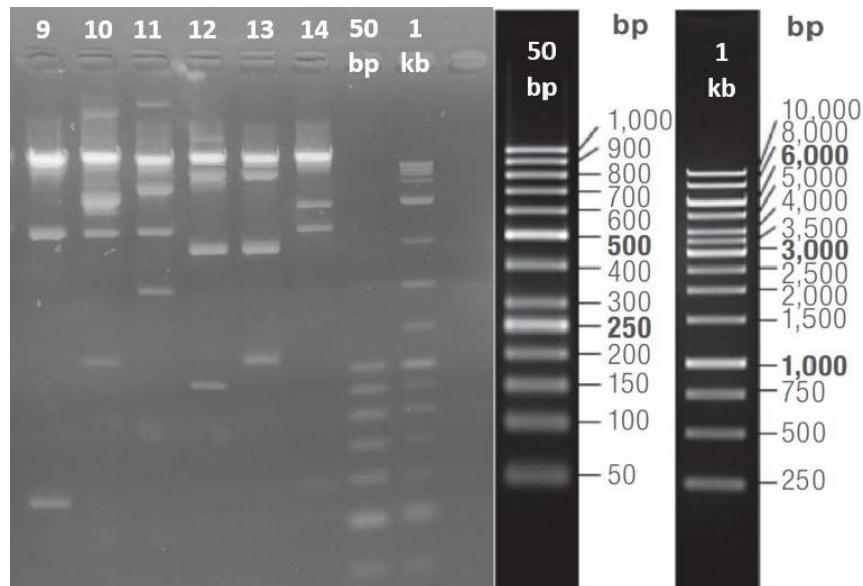


Рис. 3.4 Електрофореграма рестриктів. 9, 10, 11 - pPPE9-6-12; 12, 13, 14 - pLBEG2-6-11.

3.2 Збирання мультигенного плазмідного вектору з конструкцій першого рівня

Отримані на попередньому етапі транскрипційні одиниці, використовувалися для створення мультигенних конструкцій, які клоновані у кінцевий плазмідний вектор. Цей вектор містить бактеріальний селективний ген стійкості до антибіотика канаміцину, точку початку реплікації для *E.coli* та *A.tumefaciens*, сайти рестрикції та Т-регіон .

Загалом, було сконструйовано дві генетичні конструкції другого рівня, генетичні карти яких знаходяться у додатку Б (Рис. 3.5). Перша – pCombi35, що поєднує два касетних модуля експресії гена з плазмід pLBE 5-12 та pFT4-1. Вона призначена для надання рослині комбінованої стійкості до гербіцидів з різними механізмами дії. 2,4-D – системний гербіцид з післясходовою дією, який належить до класу синтетичних ауксинів та ефективний проти однорічних і багаторічних дводольних бур'янів. Сульфонілсечовини – післясходові гербіциди системної дії з широким спектром активності, особливо ефективні проти однорічних і деяких багаторічних дводольних бур'янів, а також деяких злакових. При цьому ознака стійкості до сульфонілсечовини використовувалася як селективний маркер. Таке поєднання генів стійкості дозволить гнучко управляти

гербицидним навантаженням та застосовувати систему чергування гербицидів. Друга – p1QuadRes37, що містить чотири транскрипційні одиниці в плазмід p1GEG1-6-12, p1BEG2-6-11, p1PEE9-6-12 та p1CF3-11. Ця конструкція несе гени стійкості до гербицидів гліфосату та дикамби, а також селективний маркер для відбору на фосфінотрицині. При цьому формування механізму стійкості до гліфосату передбачає використання двох стратегій – експресія нечутливого ферменту 5-енолпіруватшкімат-3-фосфатсинтази з гену *zmepsps* та детоксикація діючої речовини ферментом гліфосатоксидазою з гену *gox*. Така комбінація сприятиме підвищенню ефективності контролю проти широкого спектру бур'янів та знизить кількість обробок.

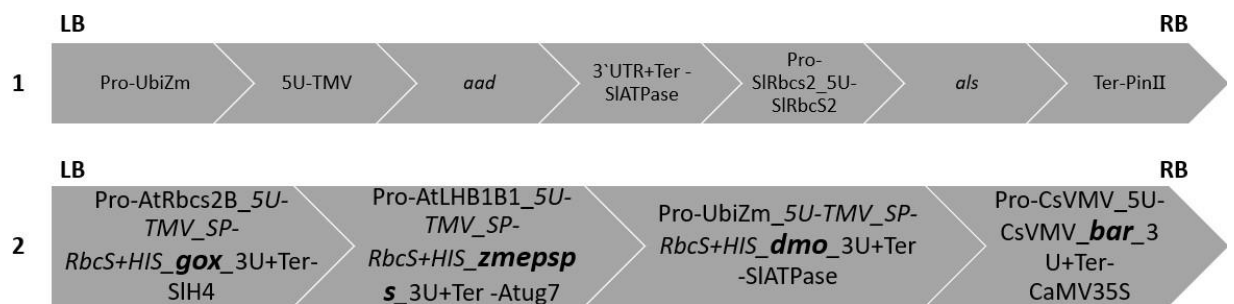


Рис. 3.5 Схема мультигенних конструкцій другого рівня.

Зібрані методом Golden Gate генетичні конструкції, було накопичено у трансформованих компетентних бактеріальних клітин *E.coli* штаму Top 10. Відбір клітин-трансформантів проводився на селективному середовищі з антибіотиком канаміцином із застосуванням біло-помаранчевого скринінгу. Візуальним маркером у кінцевій плазміді є ген, що кодує пігмент β -каротин, що має помаранчеве забарвлення і вказує на відсутність цільової вставки. Тому ізолюються виключно білі колонії (Рис. 3.6).

Для подальшої роботи було обрано по дві білі колонії для нарощення суспензійної культури на рідкому середовищі LB з додаванням антибіотику канаміцину у концентрації 100 мг/л. У подальшому було здійснено виділення плазмідної ДНК на спіні-колонках та реактивами з комерційного набору ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit (Zymo Research, США).

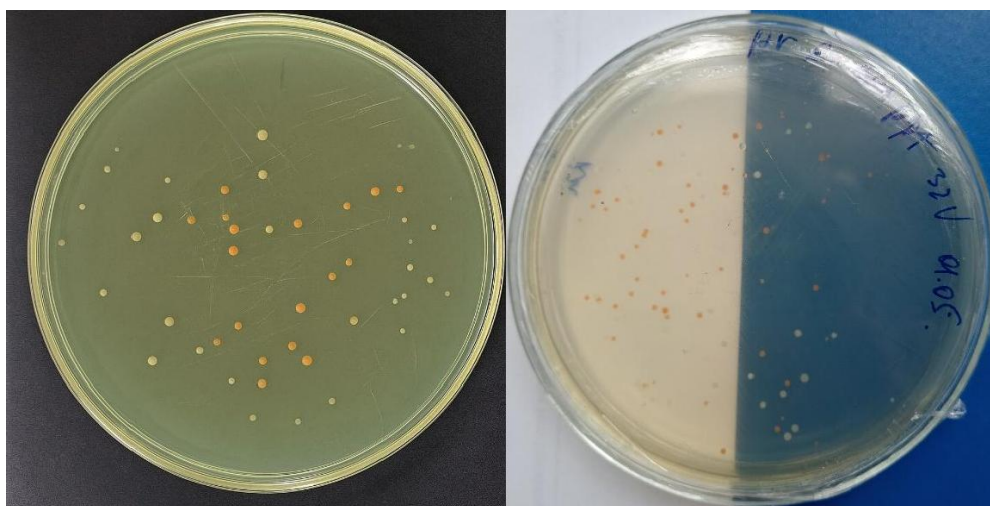


Рис. 3.6 Біло-помаранчевого скринінг колоній *E.coli*, що містять мультигенні плазміди.

Для рестрикційного аналізу векторної конструкції pCombi35 (розмір 9637 п.н.) було застосовано суміш рестриктаз Hind III та Bgl I, з утворенням очікуваних фрагментів (п.н.) – 5095, 2716, 1049, 777. Рестрикція плазміди pQuadRes37 (розмір 13397 п.н.) була здійснена комбінованою дією ферментів NdeI та SaII, з утворенням рестриктів – 4984, 3666, 2232, 1693 та 822 п.н. У результаті, було проаналізовано 6 зразків плазмідної ДНК по 3 на кожну генетичну конструкцію, з яких у 1, 2, 5 та 6 зразках підтверджено успішність клонування (Рис. 3.7). Тому зразки №1 (конструкція pCombi35) та №6 (конструкція pQuadRes37) використані як цільові вектори та застосовані у процесі генетичної трансформації *A.tumefaciens*.

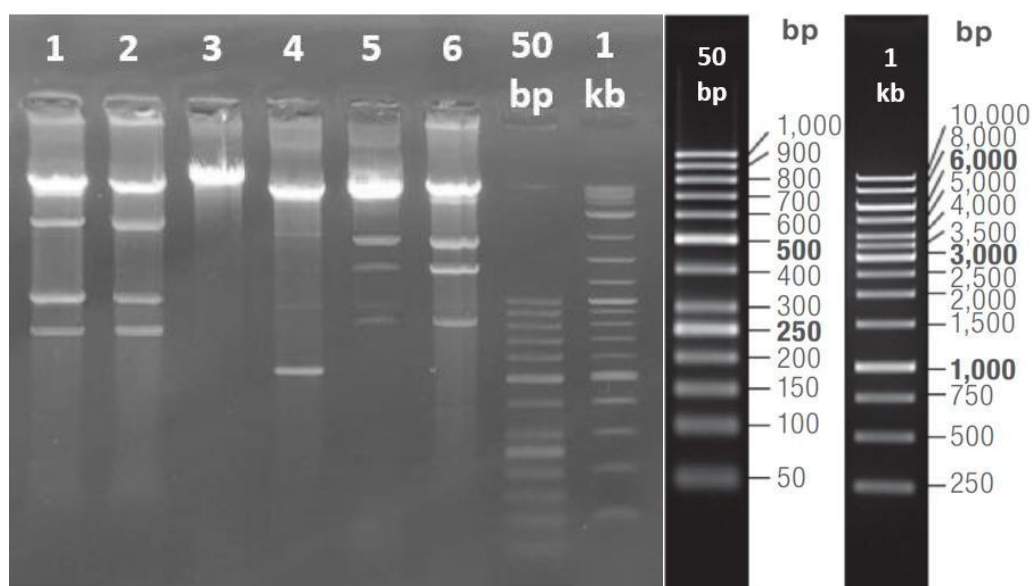


Рис. 3.7 Електрофореграма рестриктів генетичних конструкцій другого рівня. 1, 2, 3 - pICombi35; 4, 5, 6 - pIQuadRes37.

3.3 Формування векторної системи з цільовими генами стійкості до гербіцидів на основі бактерії *A. tumefaciens*

Для здійснення подальшої трансформації рослинної моделі *A. thaliana*, було створено дві векторні системи на основі бактеріальних клітин *A. tumefaciens*, що містять плазмиду pICombi35 та pIQuadRes37 відповідно. У роботі були задіяні агробактерія штаму GV3301, які трансформовані методом електропорації. Після чого, проведений відбір трансформованих колоній на селективному середовищі з вмістом антибіотиків канаміцину (100 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л).

З метою підтвердження наявності цільової генетичної конструкції в генотипі *A. tumefaciens*, був проведений аналіз цільових плазмід шляхом ампліфікації ділянок генів стійкості до гербіцидів методом ПЛР. Процедура передбачає застосування пари специфічних праймерів на кожну генетичну вставку. Для плазмиди pICombi35 здійснювалася ідентифікація генів *aad* та *als*, з розміром продуктів після ПЛР 157 та 256 п.н. відповідно. Для плазмиди pIQuadRes37 оцінювалася наявність генів *dmo*, *zmerpsps*, *gox* та *bar*, з очікуваними фрагментами після ПЛР 413, 1338, 1296 та 349 п.н. відповідно. Розділення ампліконів після реакції ПЛР відбувалося за допомогою горизонтального електрофорезу в агарозному гелі (Рис. 3.8).

У результаті було проведено ідентифікацію цільових фрагментів для шести генів. Для цього проаналізовано шість колоній-трансформантів *A. tumefaciens* (по три на кожну з двох генетичних конструкцій). В якості позитивного контролю використовувалися еталонні плазмиди, що містять зазначені гени. Таким чином, у подальшій роботі задіяна бактеріальна колонія №2, що містить конструкцію pICombi35, та колонія №3, що несе конструкцію pIQuadRes37.

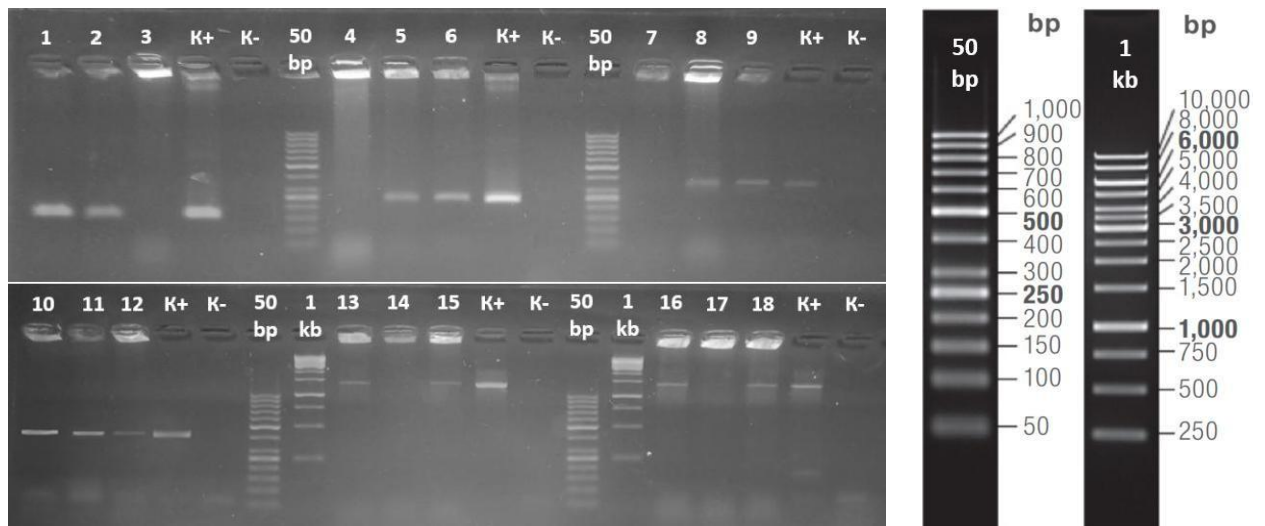


Рис. 3.8 Електрофореграма ампліконів цільових генів: 1-3 – *aad*; 4-6 – *als*; 7-9 – *bar*; 10-12 – *dmo*; 13-15 – *gox*; 16-18 – *zmepps*.

3.4 Отримання рослин-трансформантів *A.thaliana*, що мають стійкість до гербіцидів

Для перевірки функціональності створених генетичних конструкцій *in planta*, було проведено генетичну трансформацію модельного об'єкта *A.thaliana* методом «Floral dip». У роботі був задіяний екотип арабідопсису Columbia, який попередньо був вирощений в умовах теплиці терміном 30 днів від появи сходів до початку цвітіння, коли довжина основного стебла досягла розміру до 15 см. Як носії генетичного матеріалу використовувалися дві колонії *A. tumefaciens*, що містять плазмідні конструкції pCombi35 (із генами *aad* і *als*) та pQuadRes37 (із генами *gox*, *zmepps*, *dmo* і *bar*). Процедура трансформації передбачала занурення наземної частини рослини у бактеріальну суспензію *A. tumefaciens* з подальшою інфільтрацією під вакуумом. Було використано по дві рослини під кожну генетичну конструкцію. Через місяць з інфільтрованих рослин було зібрано насіння (Рис. 3.9).

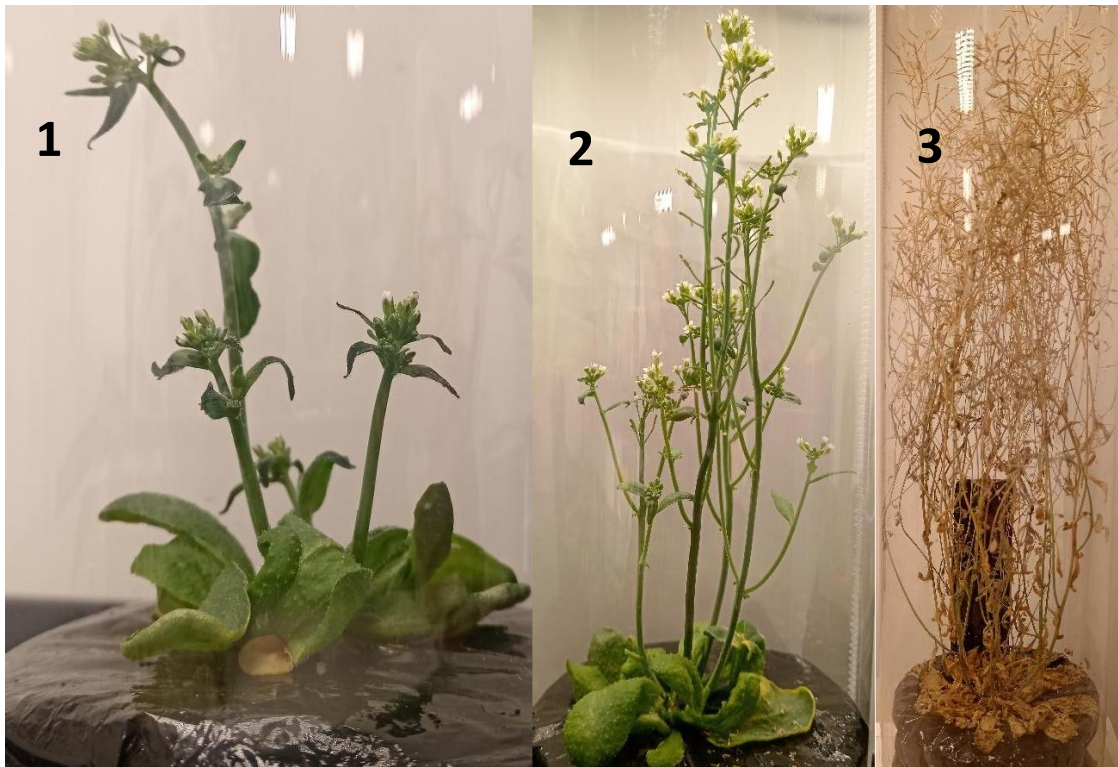


Рис. 3.9 Вигляд рослини *A.thaliana* на різних етапах роботи. 1 – наступний день після інфільтрації; 2 – восьмий день після інфільтрації; 3 – місяць після інфільтрації (збір насіння).

З метою відбору рослин-трансформантів, отримане насіння було стерилізоване та введене в культуру *in vitro*. Селекція проводилася на агаризованому живильному середовищі з додаванням фосфінотріцину (PPT) у концентрації 10 мг/л (для p1QuadRes37) та етаметсульфурол-метилу у концентрації 0,1 мг/л (для p1Combi35). У результаті культивування на селективному середовищі спостерігалось проростання та розвиток частини сіянців, які демонстрували толерантність до дії гербіцидів (Рис. 3.10). Нетрансформовані рослини не проростали або проявляли виражені ознаки фітотоксичності, включаючи побуріння та некротизацію тканин. На контрольному зразку жодна рослина не проросла, в якості контролю використано вихідний екотип *A.thaliana*.

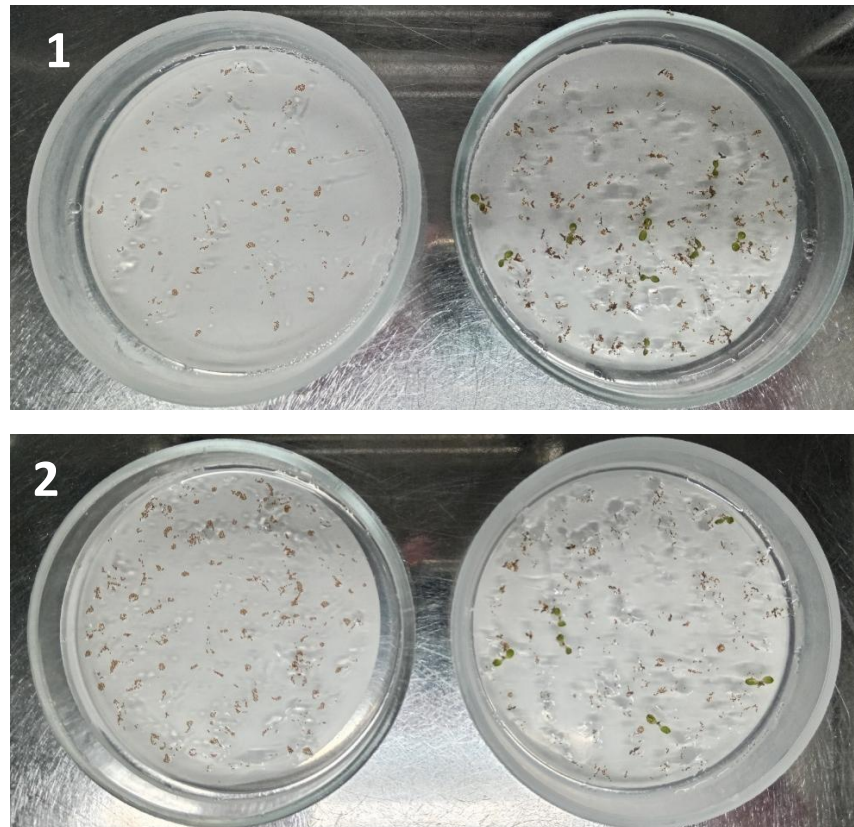


Рис. 3.10 Відбір рослин-трансформантів *A. thaliana* на селективному середовищі. З ліва на право негативний контроль. 1 – рослини з конструкцією pLCombi35; 2 - рослини з конструкцією pLQuadRes37.

На етапі відбору, кількість життєздатних рослин склала чотирнадцять одиниць для події pLCombi35 та вісім одиниць для події pLQuadRes37. Для перевірки використано приблизно по 400 насінин. Таким чином, ефективність трансформації досягла рівня 2% при використанні вектору pLQuadRes37, та 3,5% для плазміді pLCombi35.

Після процедури селекції трансформовані проростки *A. thaliana*, що демонструють стійкість до гербіциду, перенесені з агаризованого живильного середовища до субстрату на основі ґрунтової суміші та акліматизовані (Рис. 3.11). У результаті, кількість рослин, що прижилася становить дванадцять (pLCombi35) та шість (pLQuadRes37) одиниць. Переведення з *in vitro* в умови теплиці дозволяє завершити цикл розвитку трансформованих рослин, забезпечити формування насіння (T1-покоління) та подальшу перевірку спадковості трансгену.



Рис. 3.11 Трансформанти *A. thaliana*. А – рослини з конструкцією pCombi35; Б - рослини з конструкцією pQuadRes37.

3.5 Детекція рекомбінантного білку як маркеру експресії генетичної конструкції

З метою встановлення функціональної активності генетичної конструкції та експресії цільового гена на білковому рівні у трансформованих рослинах *A. thaliana* було здійснено якісну детекцію рекомбінантного білка із застосуванням імунохроматографічного методу. Для цього використовувалися комерційні тест-смужки, специфічні до продукту експресії трансгену, а саме DMO, ZMEPSPS та BAR. Аналіз проводили згідно з інструкцією виробника на екстрактах з листкової тканини трансформантів. Наявність кольорової тест-смуги свідчила про позитивний результат та підтверджувала експресію білка.

Перевірка проводилася лише для рослин з конструкцією pQuadRes37, що містить гени *gox*, *zmepps*, *dmo* і *bar*. Оскільки експресію генів *aad* та *als* не можна прямо виявити зазначеним методом по причині відсутності комерційних антитіл та тест-систем. Тому їх активність підтверджується тільки молекулярними

методами або селекцією – якщо рослини виживають у присутності гербіциду, це свідчить про ефективну експресію гена.

У результаті, протестовано п'ять рослин *A. thaliana* на встановлення наявності білків DMO, ZMEPSPS та BAR (Рис. 3.12). В усіх зразках було зафіксовано позитивний сигнал, що вказує на присутність продукту експресії введеної генетичної конструкції та її ефективне функціонування в рослинах-трансформантах. У рослин контрольної групи, які не зазнавали трансформації, позитивна реакція відсутня, що підтверджує специфічність тесту.

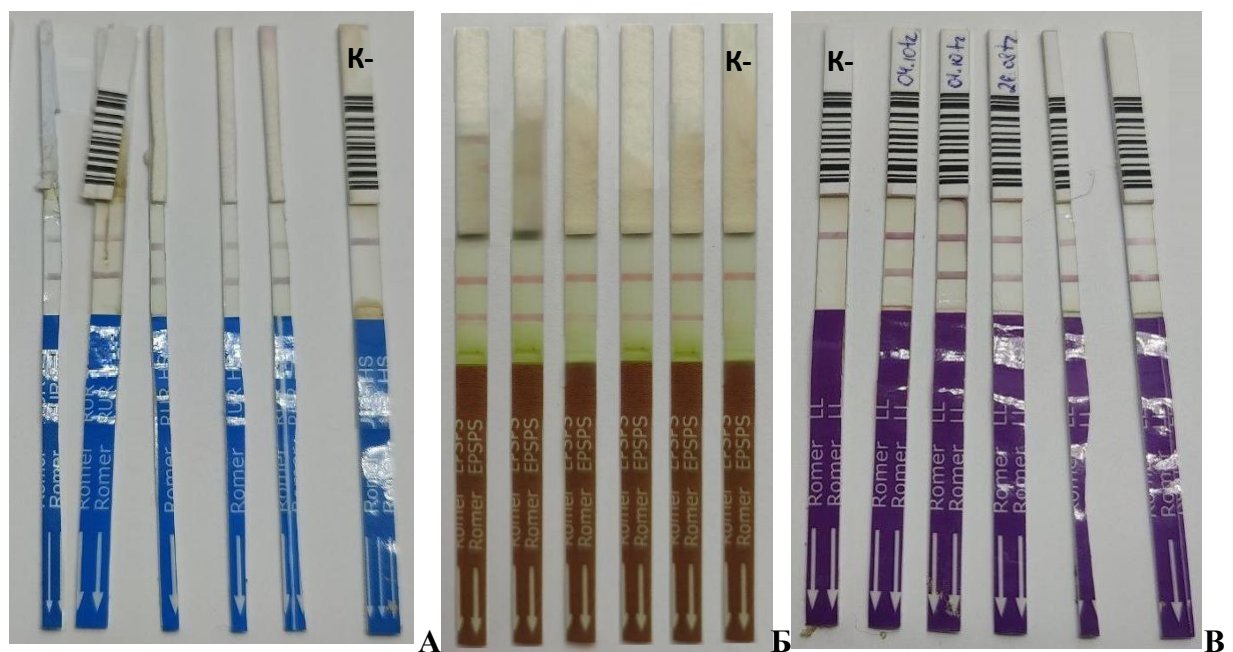


Рис. 3.12 Результати виявлення рекомбінантного білку в *A. thaliana* з конструкцією pIQuadRes37 за допомогою тест-смужок. А – білок DMO; Б – білок ZMEPSPS; В – білок BAR.

Таким чином, у межах проведеної роботи отримано трансформовані штами бактерії *A. tumefaciens*, що несуть конструкції pICombi35 та pIQuadRes37 у складі векторних плазмід. Ефективність роботи рекомбінантних молекул та експресія білків підтверджені на модельному об'єкті *A. thaliana*. Конструкція pIQuadRes37 демонструє стабільне функціонування. Конструкція pICombi35 потенційно активна, але потребує додаткової перевірки в поколінні T1 або T2. Створені вектори придатні для використання у подіях генетичної трансформації цінних видів с/г рослин.

ВИСНОВОК

1. Властивість комбінованої толерантності агрокультур до дії різних типів гербіцидів має на меті зменшити ризик появи резистентних бур'янів, знизити хімічне навантаження на агроценоз та покращити ефективність культивування. Створення генетичних конструкцій з генами стійкості до гербіцидів є важливим етапом у розробці ефективних векторів для проведення трансгенезу. Розробка та експериментальне тестування рекомбінантної ДНК відіграє ключову роль у впровадженні зазначеної агрономічно цінної ознаки у сільськогосподарські види рослин.
2. У результаті роботи отримано два генетичні вектори. Перший - pCombi35, що містить гени *aad* і *als*, і призначений для формування стійкості до 2,4-D та гербіцидів групи сульфонілсечовини. Другий - pQuadRes37, що включає гени *gox*, *zmepps*, *dmo* і селективний маркер *bar*. Зібрані генетичні конструкції успішно трансформовані в бактеріальні штами *Escherichia coli* і *Agrobacterium tumefaciens* у вигляді плазмід. Наявність цільових генів та структурну організацію рекомбінантних молекул підтверджено ПЛР та аналізом рестрикції.
3. Проведено стабільну трансформацію суцвіть *Arabidopsis thaliana* за допомогою трансформованих штамів *A. tumefaciens*. Рослини-трансформанти, отримані з насіння після квіткового занурення, пройшли селекцію на живильному середовищі у присутності відповідних гербіцидів - фосфінотріцину (для pQuadRes37) та етаметсульфурон-метилу (для pCombi35). Ефективність трансформації досягла 2% при використанні вектору pQuadRes37, та 3,5% при застосуванні вектору pCombi35. У рослинах, що несуть конструкцію pQuadRes37, встановлено наявність рекомбінантних білків (DMO, ZMEPPS, BAR) за допомогою імунохроматографічного аналізу на тест-смужках.
4. Таким чином, сконструйовано дві функціонально активні генетичні конструкції у складі векторних плазмід в основі бактеріального штаму *A.tumefaciens*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Borzyh O., Sergiienko V., Storchous I. Research in the consequences of the influence of herbicides on main crops. *Visnyk agrarnoi nauky*. 2022. Т. 100, № 4. С. 30–40.
2. Korav S., Dhaka A.K., Singh R., Premaradhya N., Chandramohan Reddy G. A study on crop weed competition in field crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018. Vol. 7, №4. P. 3235–3240.
3. Vats S. Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance. *Sustainable Agriculture Reviews* ed. by E. Lichtfouse. Cham: Springer. 2015. Vol. 15. P. 153–179.
4. Завірюха П. Д., Косилович Г. О., Голячук Ю. С. Агрофармакологія (хімічний захист рослин) : практикум. Львів, 2014. 159 с.
5. 2024 HRAC Global Herbicide MoA Classification. *Herbicide Resistance Action Committee*. URL: <https://hracglobal.com/tools/2024-hrac-global-herbicide-moa-classification> (дата звернення: 04.05.2025).
6. A New Era in Herbicide-Tolerant Crops Development by Targeted Genome Editing / G. Gosavi et al. *ACS Agricultural Science & Technology*. 2022. Vol. 2, №. 2. P. 184–191.
7. Menon A., Menon S. REVIEW ON HERBICIDES RESISTANCE AND THEIR MODE OF ACTION. *PLANT ARCHIVES*. 2021. Vol. 21, №. 2. P. 22-28.
8. Herbicide Resistance: Another Hot Agronomic Trait for Plant Genome Editing / A. Hussain et al. *Plants*. 2021. Vol. 10, №. 4. P. 621.
9. Brookes G. Genetically Modified (GM) Crop Use 1996–2020: Environmental Impacts Associated with Pesticide Use Change. *GM Crops & Food*. 2022. Vol. 13, №. 1. P. 262–289.
10. Caradus J. R. Intended and unintended consequences of genetically modified crops – myth, fact and/or manageable outcomes?. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2022. Vol. 66, №. 6. P. 519-619.
11. GM Traits List - GM Approval Database | ISAAA.org. *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - ISAAA.org*.

- URL: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gmtraitslist/default.asp> (дата звернення: 06.05.2025)
12. Global commercialization development trend of genetically modified crops in 2023 / X. Cheng et al. *Journal of Integrative Agriculture*. 2024. Vol. 23, №. 12. P. 3943-3952.
 13. Methodology. *AgbioInvestor-GM*.
URL: <https://gm.agbioinvestor.com/methodology> (дата звернення: 06.05.2025).
 14. Countries Approving GM Crop Cultivation. *Science Speaks*.
URL: <https://www.isaaa.org/blog/entry/default.asp?BlogDate=10/31/2024> (дата звернення: 06.05.2025).
 15. Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів : Закон України від 31.05.2007 № 1103-V : станом на 16 трав. 2024 р.
URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1103-16#Text> (дата звернення: 06.05.2025).
 16. Поводження з ГМО – Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України. *Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України – офіційний сайт*.
URL: <https://mepr.gov.ua/diyalnist/napryamky/bioriznomanittya/biobezpeka/povodzhenya-z-gmo/> (дата звернення: 08.05.2025).
 17. Картахенський протокол про біобезпеку до Конвенції про біологічне різноманіття : Протокол Орг. Об'єдн. Націй від 29.01.2000 : станом на 12 верес. 2002 р.
URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/995_935#Text (дата звернення: 08.05.2025).
 18. Кочкін В. ОСОБЛИВОСТІ НОРМАТИВНО-ПРАВОВОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ. *Наукові інновації та передові технології*. 2023. № 13(27). С. 262 – 272.
 19. ГРИГОР'ЄВА Х. ЗАКОНОДАВСТВО УКРАЇНИ ПРО ГМО: ЕВОЛЮЦІЯ, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ. *Economics and Law*. 2024. Т. 74, № 3. С. 16–27.

20. Didkovska L. Regulation of the GM crops circulation in Ukraine: problems and ways to solve them. *Ekonomika APK*. 2021. Т. 319, № 5. С. 38–45.
21. Martynenko H. A. Overview of the issue of genetically modified crops in Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2022. Vol. 8, №. 3-4. P. 21–27.
22. Novak T., Melnyk V., Kovalchuk I. Legal basis for the use of biotechnology in agriculture to ensure food security of Ukraine. *Modern Science*. 2023. P. 131–141.
23. Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції : Закон України від 23.08.2023 № 3339-IX. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3339-20#Text> (дата звернення: 08.05.2025).
24. Environmental impacts of genetically modified crops / F. Noack et al. *Science*. 2024. Vol. 385, №. 6712.
25. The Future of Genetic Engineering in Crop Improvement and Food Production / A. Manik et al. *PLANT CELL BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*. 2024. Vol. 25, №. 11-12. P. 53–63.
26. Anjanappa R. B., Gruissem W. Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of Plant Physiology*. 2021. Vol. 261. №. 153411.
27. Werkissa Y. Application of Genetically Modified Organism (GMO) crop technology and its implications in modern agriculture. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 2022. Vol. 8, №. 1. P. 014–020.
28. Marone D., Mastrangelo A. M., Borrelli G. M. From Transgenesis to Genome Editing in Crop Improvement: Applications, Marketing, and Legal Issues. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, №. 8. P. 7122.
29. Assessment of Benefits and Risk of Genetically Modified Plants and Products: Current Controversies and Perspective / B. K. Ghimire et al. *Sustainability*. 2023. Vol. 15, №. 2. P. 1722.

30. Nasrin S. Recent Advancement in Genetically Modified Crops. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*. 2023. Vol. 11, no. 8. P. 1082–1086.
31. Turnbull C., Lillemo M., Hvoslef-Eide T. A. K. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12.
32. Genetically modified crops: current status and future prospects / K. Kumar et al. *Planta*. 2020. Vol. 251, №. 4.
33. Patil D. T. B., Manekar D. A. A. Herbicide tolerance in economically important agricultural crops: Accomplishments and prospects. *International Journal of Research in Agronomy*. 2024. Vol. 7, no. 7. P. 433–441.
34. Klümper W., Qaim M. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, №. 11. P. 1 – 7.
35. Brookes G. Genetically Modified (GM) Crop Use 1996–2020: Impacts on Carbon Emissions. *GM Crops & Food*. 2022. Vol. 13, no. 1. P. 242–261.
36. Modernizing and harmonizing regulatory data requirements for genetically modified crops—perspectives from a workshop / N. P. Storer et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024. Vol. 12. P. 1 – 12.
37. Herbicides in modern sustainable agriculture: environmental fate, ecological implications, and human health concerns / A. Parven et al. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2024. Vol. 22. P. 1181–1202.
38. Raj N., Patil M., Patil S.S. Development of transgenic herbicide-resistant crops. *The Pharma Innovation Journal*. 2023. Vol. 12, №6. P. 4405–4411.
39. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants / G. Schütte et al. *Environmental Sciences Europe*. 2017. Vol. 29, №. 1. P. 1 – 12.
40. Dong H., Huang Y., Wang K. The Development of Herbicide Resistance Crop Plants Using CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Genes*. 2021. Vol. 12, no. 6. P. 912 – 932.

41. Three strategies of transgenic manipulation for crop improvement / H. Yu et al. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. – 15.
42. GM Approval Database | ISAAA.org. *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* - ISAAA.org. URL: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> (дата звернення: 08.05.2025).
43. Workneh S.T., Tsega U., Abena T. Resistance evolution in GMOs and its management strategies: the case of transgenic plants. *International Journal of Novel Research in Life Sciences*. 2021. Vol. 8, №5. P. 41–48.
44. RISKS AND RISK ASSESSMENT OF GM CROPS WITH ADVANCED MODIFICATION TECHNOLOGIES / T. Zafar et al. *National Journal of Biological Sciences*. 2022. Vol. 3, №. 1. P. 35–57.
45. Plant genetic engineering and genetically modified crop breeding: history and current status / X. WANG et al. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*. 2017. Vol. 4, №. 1. P. 5 – 27.
46. Werkissa Y. Application of Genetically Modified Organism (GMO) crop technology and its implications in modern agriculture. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 2022. Vol. 8, №. 1. P. 014–020.
47. Endo M., Toki S. Creation of herbicide-tolerant crops by gene targeting. *Journal of Pesticide Science*. 2013. Vol. 38, №. 2. P. 49–59.
48. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement / A. Kamthan et al. *Theoretical and Applied Genetics*. 2016. Vol. 129, №. 9. P. 1639–1655.
49. Botterman J., Leemans J. Engineering of Herbicide Resistance in Plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1988. Vol. 6. P. 321–340.
50. Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method / L.-Y. Low et al. *New Visions in Plant Science*. 2018. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79369> (дата звернення: 08.05.2025).
51. Plant transformation in biotechnology / G. Atiq et al. *Middle East Journal of Applied Science & Technology (MEJAST)*. 2019. Vol. 2, №3. P. 103–123.

52. Adane M., Adeladlew T. Review on cloning vector and expression vector. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*. 2016. Vol. 1, №5. P. 14–19.
53. Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation / W. Su et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, №. 13. P. 1 – 21.
54. Bird J. E., Marles-Wright J., Giachino A. A User’s Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synthetic Biology*. 2022. Vol. 11, №. 11. P. 3551 – 3563.
55. Raguz Nakic Z., Peters C. Modular Cloning by Golden Gate Assembly and Possible Application in Pathway Design. *CHIMIA*. 2023. Vol. 77, no. 6. P. 437–441.
56. Golden Standard: a complete standard, portable, and interoperable MoClo tool for model and non-model proteobacteria / B. Blázquez et al. *Nucleic Acids Research*. 2023. Vol. 51, №. 19. P. 1 – 16.
57. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs / E. Weber et al. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, №. 2. P. 1 – 11.
58. A selection of Golden Gate vectors to simplify recombinant protein production in *Escherichia coli* / M. Fairhead et al. *Biorxiv*. 2024. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.13.579886v1.article-info> (дата звернення: 10.05.2025).
59. Easy method for six-fragment Golden Gate Assembly of modular vectors / I. A. Cerpleanu-Pascu et al. *BioTechniques*. 2023. Vol. 74, №. 2. P. 85 – 99.
60. Marillonnet S., Grütznér R. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2020. Vol. 130, №. 1. P. 1 – 33.
61. Yahya R. T. Describe of Arabidopsis Thaliana Plant as a Model Plant in Biotechnology. *NTU Journal of Pure Sciences*. 2022. Vol. 1, №. 3. P. 10–17.
62. Irion U., Nüsslein-Volhard C. Developmental genetics with model organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. Vol. 119, №. 30. P. 1 – 10.

63. Woodward A. W., Bartel B. Biology in Bloom: A Primer on the Arabidopsis thaliana Model System. *Genetics*. 2018. Vol. 208, №. 4. P. 1337–1349.
64. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*. 2000. Vol. 408, №. 6814. P. 796–815.
65. The pan-genome and local adaptation of Arabidopsis thaliana / M. Kang et al. *Nature Communications*. 2023. Vol. 14, №. 1. P. 1 – 14.
66. Resistance to Herbicides in the Model Organisms Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana: the Involvement of Multidrug Resistance Transporters / T. Cabrito та ін. *Herbicides and Environment*. 2011. URL: <https://doi.org/10.5772/13057> (дата звернення: 10.05.2025).
67. Yaschenko A. E., Alonso J. M., Stepanova A. N. Arabidopsis as a model for translational research. *The Plant Cell*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1093/plcell/коас065> (дата звернення: 10.05.2025).
68. Srinivasan R., Nath Radhamony R., Mohan Prasad A. T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 8, №. 1.
69. The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species / J.-F. Li et al. *Plant Methods*. 2009. Vol. 5, №. 1.
70. The Efficiency of Arabidopsis thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the Agrobacterium Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant / R. Ghedira et al. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2013. Vol. 26, №. 7. P. 823–832.
71. Methods to Transfer Foreign Genes to Plants / Y. Narusaka та ін. *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. 2012. URL: <https://doi.org/10.5772/32773> (дата звернення: 10.05.2025).
72. Transient Transformation of A. thaliana Seedlings by Vacuum Infiltration / C. Bernat-Silvestre та ін. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY, 2020. С. 147–155. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0880-7_6 (дата звернення: 10.05.2025).

73. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation / S. J. Harrison et al. *Plant Methods*. 2006. Vol. 2, №. 1. P. 1 – 7.
74. Simplified floral dip transformation method of *Arabidopsis thaliana* / I. Ali et al. *Journal of Microbiological Methods*. 2022. Vol. 197. P. 1 – 4.
75. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants / C. Engler et al. *ACS Synthetic Biology*. 2014. Vol. 3, №. 11. P. 839–843.
76. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo* / D. R. Gallie et al. *Nucleic Acids Research*. 1987. Vol. 15, №. 8. P. 3257–3273.
77. Plant Promoters and Terminators for High-Precision Bioengineering / W. Liu et al. *BioDesign Research*. 2023. Vol. 5, №. 0013. P. 1 – 20.
78. *Arabidopsis rbcS* Genes Are Differentially Regulated by Light / A. Dedonder et al. *Plant Physiology*. 1993. Vol. 101, №. 3. P. 801–808.
79. *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* / S. Marillonnet et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. Vol. 101, №. 18. P. 6852–6857.
80. Sequence of the fourth and fifth Photosystem II Type I chlorophyll a/b-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family / J. M. McGrath et al. *Plant Molecular Biology*. 1992. Vol. 19, №. 5. P. 725–733.
81. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955 / R. F. Barker et al. *Plant Molecular Biology*. 1983. Vol. 2, №. 6. P. 335–350.
82. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter / B. Verdaguer et al. *Plant Molecular Biology*. 1998. Vol. 37, №. 6. P. 1055–1067.
83. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* / C. J. Thompson et al. *The EMBO Journal*. 1987. Vol. 6, №. 9. P. 2519–2523.

84. *Agrobacterium tumefaciens*: Biology and application in genetic engineering / Grace Sunday et al. *GSC Advanced Research and Reviews*. 2024. Vol. 20, №. 1. P. 389–398.
85. Bergkessel M., Guthrie C. Colony PCR. *Methods in Enzymology*. 2013. С. 299–309. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00025-2> (дата звернення: 10.05.2025).
86. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method / X. Zhang et al. *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, №. 2. P. 641–646.

ДОДАТОК А

Таблиця А. 1

Гени, що несуть ознаку стійкості до гербіцидів та застосовуються в
трансгенних технологіях

Назва гену	Продукт	Ознака	Походження	Механізм дії
<i>Aad I</i>	Фермент класу оксигеназ - арилоксиалканоатдіоксигеназа 1	Стійкість до гербіциду 2,4-D ¹	Бактерії <i>Sphingobium herbicidovorans</i>	Деградації бічного ланцюга молекули гербіциду, руйнування R-енантіомери арилоксифеноксипропіонатних сполук
<i>Dm o</i>	Ензим дикамба монооксигеназа	Стійкість до гербіциду дикамба ²	Бактерії <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	Каталізує реакцію окиснення, з використанням дикамби в якості субстрату та перетворенням на менш токсичні метаболіти
<i>Bar</i>	Фермент фосфінотрицин-N-ацетилтрансфераза	Стійкість до гербіцидів глюфосинатної групи	Актиноміцети <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Модифікація активного компоненту гербіциду шляхом ацетилювання, що знижує його активність
<i>Pat</i>	Фермент фосфінотрицин-N-ацетилтрансфераза	Стійкість до гербіцидів глюфосинатної групи	Актиноміцети <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Модифікація активного компоненту гербіциду шляхом ацетилювання, що знижує його активність

Продовження таблиці А. 1

<i>Zmepsps</i>	Ензим 5-енолпірувілшикімат -3-фосфатсинтаза з подвійною мутацією	Стійкість до гербіцидів в гліфосатної групи	Кукурудза (<i>Zea mays</i>)	Толерантна форма ферменту має меншу здатність до зв'язування з гліфосатом, і є нечутливою
<i>Cp4epspS</i>	Фермент 5-енолпірувілшикімат -3-фосфатсинтаза	Стійкість до гербіцидів в гліфосатної групи	Бактерія <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	Толерантна форма ферменту має нижчу спорідненість до гліфосату
<i>Goxv247</i>	Фермент класу оксигеназ - гліфосатоксидаза	Стійкість до гербіцидів в гліфосатної групи	Бактерії <i>Ochrobactrum anthropi</i> LB AA	Детоксикація гербіциду шляхом розщеплення молекули на амінометилфосфонову кислоту і гліоксилат
<i>Als</i>	Фермент ацетолактатсинтаза	Стійкість до сульфонілсечовини	Рослина <i>Arabidopsis thaliana</i>	Нечутлива форма ферменту, що продовжує здійснення метаболічних функцій у присутності гербіциду

Примітка: ¹ - 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислота; ² - 2-метокси-3,6-дихлорбензойна кислота.

ДОДАТОК Б

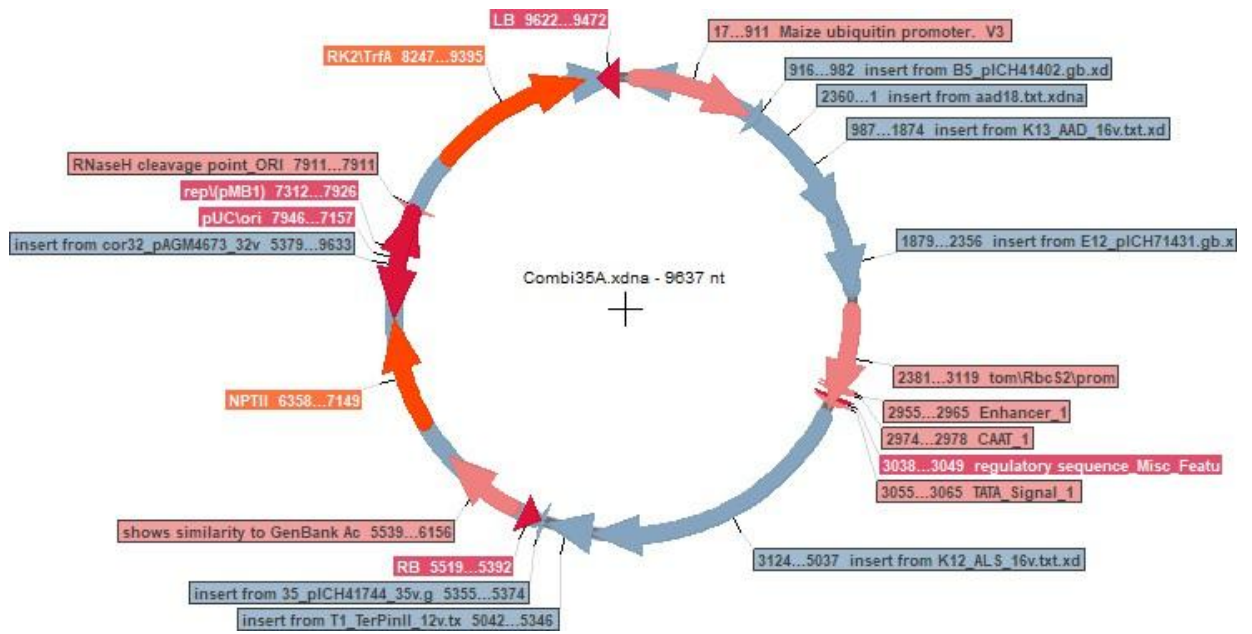


Рис. Б.1 Генетична карта плазмідного вектора pCombi35

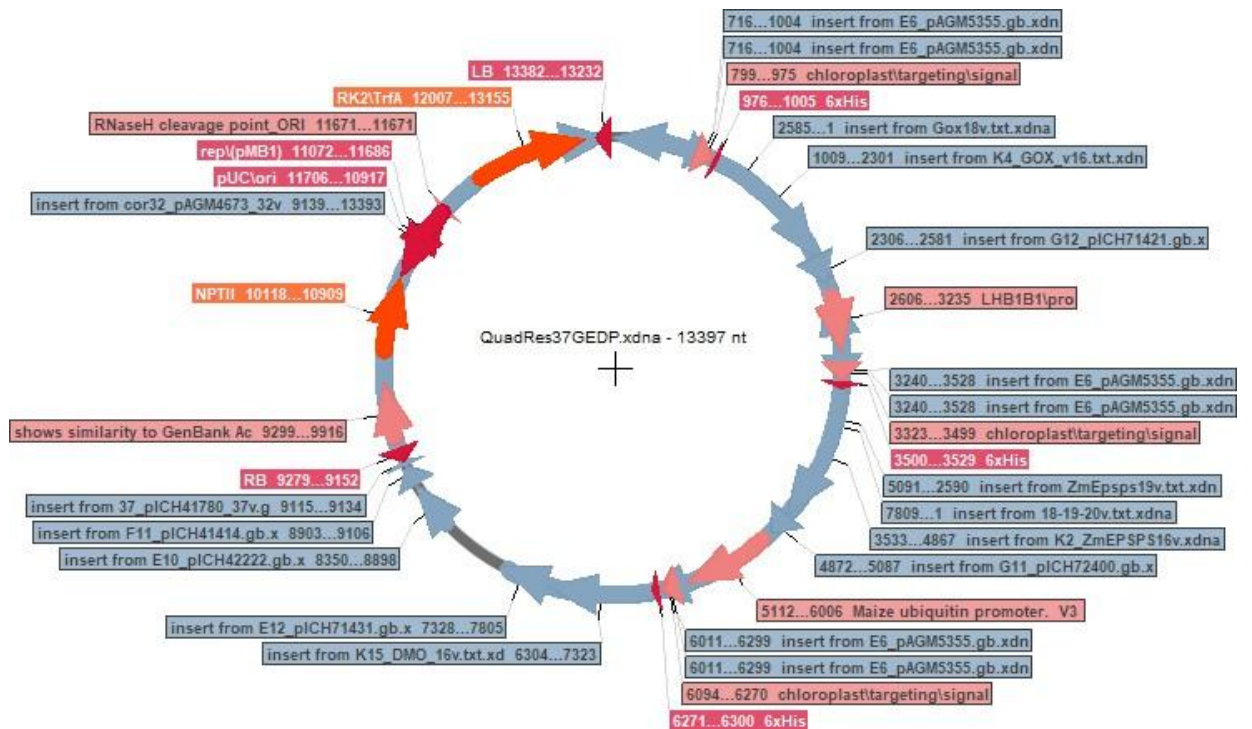


Рис. Б.2 Генетична карта плазмідного вектора pQuadRes37