

АНОТАЦІЯ

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

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

Таким чином, метою дисертаційного дослідження було отримання біотехнологічних рослин комерційної лінії озимого ріпаку *B. napus* L. української селекції, а також створення платформи для редагування геному озимого ріпаку з використанням системи CRISPR/Cas9 за використання прийомів генетичної інженерії.

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

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

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

При відпрацюванні методики генетичної трансформації озимого ріпаку, з'ясовано, що оптимальними умовами для генетичної трансформації експлантів озимого ріпаку є наступні: оптична щільність суспензії агробактерій $\text{OD}_{600} = 0,5$; тривалість інокуляції в суспензії *A. tumefaciens* – 10 хв. При цьому, частота трансформації за геном *gus*, який входить до складу Т-ДНК генетичної конструкції pCB203, становила $22,75\% \pm 2,28\%$. Також було показано, що додавання ацетосирингону в інокуляційне середовище є недоцільним, оскільки спричиняє некроз тканин та знижує частоту регенерації озимого ріпаку на 20%. На відміну від традиційної селекції, яка дозволяє отримати новий сорт ріпаку через 8–12 років, за допомогою оптимізованої нами методики регенерації та

генетичної трансформації біотехнологічне насіння T_0 озимого ріпаку може бути отримане через один рік після початку експериментів.

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

Було виявлено, що створена нами генетична конструкція pSPE2053, при стабільній трансформації нею рослин забезпечує накопичення бактеріальної ендонуклеази Cas9 в тканинах озимого ріпаку *V. napus* L. лінії *Vn1*. В подальшому в такі рослини можуть бути перенесені послідовності гідових РНК за використання стабільної або транз'єнтної генетичної трансформації.

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

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

– розроблено ефективну систему регенерації озимого ріпаку *V. napus* L. лінії *Vn1* української селекції, яка дозволяє отримати насіння нульового

покоління через рік після початку експериментів та при застосування якої не відбувається соматональна мінливість *in vitro*;

- оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку лінії *Bn1* української селекції та створено біотехнологічні рослини, стійкі до гербіциду фосфінотрицину;

- створено трансгенні рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*, стійкі до гербіциду гліфосату, в результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133, pCB135 та pSPG2254;

- створено генетичний вектор pSPE2053, що несе ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9; за використання цього вектора отримано трансгенні лінії озимого ріпаку, які в подальшому будуть використовуватися в селекційних програмах для здійснення редагування геному;

- створено генетичну конструкцію pSPE2058, що несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9; направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти; а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*; конструкція буде використана для створення високоолеїнових ліній озимого ріпаку української селекції.

Практичне значення отриманих результатів.

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

Результати теоретичних та практичних досліджень:

- застосовуються в практичній діяльності ТОВ «БЕТА НК» при створенні біотехнологічних рослин ріпаку озимого із якісно новими ознаками;

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

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