

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

**БОЙЧУК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА**



УДК 633.85: 581.1+581.4: 58.084

**ВІДБІР ТА ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*  
ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ЯРОГО РИЖНЮ (*CAMELINA  
SATIVA L.*) З ЇХ ПОДАЛЬШОЮ ГЕНЕТИЧНОЮ ТРАНСФОРМАЦІЄЮ**

03.00.20 – біотехнологія  
091 – Біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі клітинної біології та біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Ємець Алла Іванівна,**  
ДУ «Інститут харчової  
біотехнології та геноміки НАН України»,  
завідувач відділу клітинної біології  
та біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Кравець Володимир Степанович,**  
Інститут біоорганічної хімії  
та нафтохімії імені В.П.Кухаря НАН України,  
завідувач відділу молекулярних механізмів  
регуляції метаболізму клітини

доктор біологічних наук, старший науковий  
співробітник

**Матвєєва Надія Анатоліївна,**  
Інститут клітинної біології та генетичної  
інженерії НАН України,  
завідувач лабораторії адаптаційної біотехнології

Захист відбудеться 9 квітня 2019 року о 13<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.  
Тел/факс: (044) 434 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано « 7 » березня 2019 р.

Вчений секретар спеціалізованої  
вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Як наслідок глобальної залежності від викопного палива в світі постало питання пошуку нових джерел біопалива. Серед основних шляхів вирішення даної проблеми є широке застосування технологій виробництва біодизеля із рослинної олії (Moser, 2009; Поліщук, 2010; Beaudoin, 2014; Zhu, 2016). Розробка методів отримання палива із відновлюваних ресурсів та покращення його технологічних характеристик та екологічних параметрів на сьогодні є особливо актуальною, у зв'язку із виснаженням джерел дешевого викопного палива, з одного боку, та загостренням проблеми антропогенного впливу і, як наслідок, виникненням глобальних кліматичних змін, з іншого боку (Bansal & Durrett, 2015). На сьогоднішній день ринок біодизелю в Україні знаходиться на початковому етапі розвитку: його виробництво здійснюється в експериментальних цілях, проводяться тестові випробування техніки, що працює на біодизелі; розробляються регіональні програми, що включають плани по будівництву заводів.

На сьогодні значну частку серед поновлюваних моторних палив складає біодизель, який виробляється в основному з ріпакової олії. Інтерес до біопалива спонукав дослідників критично оцінити альтернативні джерела сировини для виробництва біодизеля. Один із способів подолати попит на олії є використання неїстівних олійних рослин. Серед таких культур особливий інтерес представляє рижій посівний *Camelina sativa*, який вирощують майже в усіх областях України. Останнім часом, саме рижій розглядають як об'єкт для виробництва біодизелю, оскільки він є перспективною та дешевою олійною культурою. До того ж властивості *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре досліджено (Frohlich & Rice, 2005; Pilgeram et. al., 2007; Kagale et. al., 2014; Блюм, 2014; Kim et. al., 2015; Bansal & Durrett, 2015). Понад 10 років тому було отримано багатообіцяючі результати у випробуваннях двигуна з використанням біодизеля з рижію в якості палива (Frohlich & Rice, 2005), а на сьогоднішній день ряд авіакомпаній вже використовують дане паливо для літаків (<https://www.flightglobal.com/news/articles/in-focus-eu-initiative-to-put-alternative-fuels-int-384708/>). Вміст олії в його насінні складає приблизно 38-43%, а переважна частина вмісту жирних кислот (>90%) представлена ненасиченими жирними кислотами, включаючи значну кількість C20:0 ейкозадієнової кислоти, котра порівняно рідко зустрічається в рослинній олії, а також ліноленову (36,2-39,4%), олеїнову (12,8-14,7%), лінолеву (16,3-17,2%) та ейкозенову (14-15,5%) кислоти (Gugel & Falk, 2006).

Рижій є досить врожайною культурою: його потенційна врожайність може складати 20-30 ц/га (Мельничук та ін. 2012; Рахметов и Самойленко, 2012; Блюм та ін. 2014). Вихід олії, який можна отримати із рижію, за різними оцінками складає від 400 до 850 кг/га та є співставним із відповідними показниками для *Brassica juncea* та *Brassica rapa*, і вищим за показники для сої (Blackshaw et al., 2011; Bansal & Durrett, 2015). Порівняно із канолою, маючи дещо нижчий вихід за кількісним показником, олія із рижію за собівартістю потенційно є вдвічі дешевшою через значно менші витрати на добрива і зрошування, потрібні для вирощування рижію (Urbaniak et al., 2008; Dobre et al.,

2011; Enjalbert et al., 2012). Рижій, як скоростигла культура, вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптивною здатністю до абіотичних стресових факторів, стійкістю до хвороб та різних шкідників (Milligan, 2002; Рожкован та Комаров, 2009; Демидась та ін., 2011).

Загалом факторами, сприятливими для використання рижію у сучасних біотехнологічних розробках та інженерії рослин-продуцентів цільових сполук ліпідної природи, є ряд наступних характеристик: високий вміст олії у насінні, надзвичайно велика різноманітність жирних кислот та широкі можливості метаболічної інженерії, зокрема шляхом редагування генома, короткий життєвий цикл, що дає можливість подвійного вирощування за сезон, наявність весняних та зимових різновидів для оптимізації сільськогосподарського циклу сівозміни, невибагливість до умов, здатність зростати на неродючих землях з малою кількістю опадів без суттєвого зниження продуктивності, низька потреба у добривах.

Традиційно покращення певних господарських характеристик олійних культур досягається шляхом селекції або ж з використанням біотехнологічних підходів. Відомо, що різноманітні біотехнологічні методи дозволяють створювати нові високопродуктивні форми та сорти, маніпулювати складом певних компонентів, в тому числі і жирних кислот. Коли в 2009 р. нами були розпочаті дослідження по використанню цих методів по відношенню до певних сортів і сортозразків *C. sativa*, на той момент існувала лише невелика кількість подібних робіт по рижію (Tattersall & Millam, 1999; Lu & Kang, 2008; Kuvshinov, 2009).

Отже, для більш ефективного використання даної культури у якості альтернативного джерела біодизеля важливим є використання сучасних біотехнологічних методів, які дозволяють отримувати рослини з новими заданими ознаками, зокрема, підвищення врожайності та збільшення вмісту олії в насінні. Тому, введення в культуру *in vitro* та створення генно-інженерним шляхом генетично покращених ліній рижію посівного було і залишається надзвичайно важливим завданням біотехнологічного вдосконалення цього виду рослин, зокрема і його певних високопродуктивних генотипів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була виконана в рамках бюджетних тем відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи „Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України“: „Введення в культуру *in vitro* та генетична трансформація рижію з метою покращення його продуктивних характеристик для виробництва біодизелю“ цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України „Біомаса як паливна сировина („Біопаливо““), 2010-2012 рр.; НТП „Розробка та промислове випробування дослідної технології отримання дизельного біопалива на основі сировини рижію як альтернативної олійної культури“, 2012 р. (№ д/р 0112U001999); „Завершення розробки технологічного циклу отримання біодизелю з рижію та його промислове випробування“, 2013 р. (№ д/р 0113U001872).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було проаналізувати морфофізіологічні та біохімічні характеристики нових ярих сортів і сортозразків рижію української селекції з метою введення в культуру *in vitro*, розробити ефективний метод регенерації рослин рижію з різних типів експлантів та здійснити генетичну трансформацію досліджуваних зразків за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* в умовах *in vitro* та за використання методу *in planta*, порівнюючи ці два методи. Згідно з поставленою метою до завдань експериментальної роботи входило:

1. Провести порівняльний аналіз морфофізіологічних та біохімічних характеристик 12 досліджуваних ярих сортів і сортозразків рижію посівного та відібрати найбільш перспективні з них.

2. Підібрати оптимальні умови для введення в культуру *in vitro* перспективних сортів і сортозразків рижію посівного.

3. Визначити тип експлантів, а також дослідити вплив регуляторів росту на ефективне пагоноутворення та укорінення рослин рижію в умовах *in vitro*.

4. Провести порівняльну характеристику регенераційної здатності різних сортів і сортозразків рижію в культурі *in vitro* для відбору генотипів, найбільш придатних для подальшої генетичної трансформації.

5. Провести генетичну трансформацію *C. sativa*, опосередковану *Agrobacterium tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta* з метою порівняння ефективності використання обох методів для перенесення чужорідних генів.

6. Провести гістохімічний і молекулярно-генетичний аналіз трансформованих ліній *C. sativa* та порівняти частоту генетичної трансформації *C. sativa*, опосередкованої *A. tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta*.

**Об'єкт дослідження.** Біотехнологічні підходи щодо удосконалення рижію посівного *Camelina sativa* сортозразків та сортів української селекції.

**Предмет дослідження.** Морфофізіологічні та біохімічні особливості 12 сортів і сортозразків рижію посівного, особливості введення їх в культуру *in vitro* та генетичної трансформації рослин *C. sativa*.

**Методи дослідження.** Морфологічні та біохімічні методи; методи культури органів і тканин *in vitro*; методи генетичної трансформації; молекулярно-генетичний аналіз (метод полімеразної ланцюгової реакції); методи статистичного аналізу.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше проведено порівняльний аналіз морфо-фізіологічних та біохімічних характеристик високопродуктивних генотипів *C. sativa* української селекції, а саме: сортозразків ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП, сортів: Перемога, Євро-12, Міраж, Клондайк. Встановлено, що всі сортозразки та сорти рижію характеризуються високим продукційним потенціалом та вирізняються за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками, серед них два сорти Перемога та Євро-12 та один сортозразок ФЕОРЖЯФ-4 мають суттєву перевагу. Підібрано оптимальні умови для введення в культуру *in vitro* досліджуваних сортозразків і сортів *C. sativa*, а також для ефективного пагоноутворення та укорінення рослин

рижію. Встановлено, що для індукції пагоноутворення рижію посівного найкраще використовувати експланти як сім'ядольних листків, так і сегменти гіпокотилів 5- або 7-денних проростків. Продемонстровано, що генетична трансформація методом *in planta* є більш ефективним методом перенесення цільових генів в геном рижію посівного.

**Практичне значення одержаних результатів.** Здійснено біохімічний аналіз 12 досліджуваних сортозразків та сортів рижію ярого української селекції, який може зайняти важливе місце у виробництві олії та створення високобілкових кормів. За результатами жирнокислотного складу визначено сортозразки та сорти, які можуть бути використані, як сировина для виробництва біодизелю. Розроблено методи введення в культуру *in vitro* та ефективної регенерації рослин досліджуваних сортозразків і сортів *C. sativa*, які можуть бути рекомендовані для використання в різних біотехнологічних програмах цього виду. Визначено особливості здійснення агробактеріальної трансформації рижію посівного, які можуть слугувати основою для подальшого генетичного удосконалення цього виду та підвищення ефективності використання його для продукції біодизелю.

**Особистий внесок здобувача.** Постановку наукових завдань досліджень, наступну інтерпретацію отриманих результатів, підготовку матеріалів до публікацій та розробку структури дисертаційної роботи було здійснено спільно з науковим керівником. Під час виконання дисертації здобувач користувалась консультаціями та практичною допомогою д.с.-г.н., проф. Рахметова Д. Б., к.б.н. Шиші О.М. і к.б.н. Баєр Г.Я.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було представлено на: Міжнародній науковій конференції „Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках” (м. Київ, Україна, 15-17 вересня, 2010 р.); Міжнародна наукова конференція „Современные аспекты генетической инженерии растений“ (м. Київ, Україна, 30 травня-1 червня, 2011 р.); VII Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“, присвяченій 110-річчю від дня народження Л.М.Делоне. (м. Алушта, Крим, Україна, 19-23 вересня, 2011 р.); I-й конференції молодих вчених „Біологія рослин та біотехнологія“ (м. Біла Церква, Україна, 5-7 жовтня, 2011 р.); XII конференції молодих вчених „Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів“ (м. Київ, Україна, 15-16 листопада, 2012 р.); Міжнародній конференції „Геноміка рослин та біотехнологія“ та II-й конференції молодих учених „Біологія рослин та біотехнологія“ (м. Київ, Україна, 23-24 грудня, 2013 р.); Матеріали VI Международной научно-практической конференции „Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)“ (м. Ялта, Крим, Україна, 12 – 17 жовтня, 2014 р.); Науковій конференції в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України – Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії „Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив“, (м. Київ, Україна, 9-10 вересня, 2014 р.); X Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“ (м. Умань, Україна, 14-

18 вересня, 2015 р.); XI Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“ (м. Одеса, Україна, 12-16 вересня, 2016 р.); III конференції молодих учених „Біологія рослин та біотехнологія“, (м. Київ, Україна, 16 – 18 травня, 2017 р.).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 5 статей у фахових наукових виданнях.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 128 сторінках комп'ютерного тексту, яка складається зі анотації, вступу, 6 розділів, висновків, списку використаної літератури (314 найменувань) та містить 21 таблицю і 33 рисунки.

### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У огляді літератури наведено дані про біологічні особливості рижію посівного та розглянуто основні біотехнологічні напрямки його вдосконалення та перспективи використання. Детально проаналізовано особливості введення в культуру *in vitro*, регенерації пагонів та способи генетичної трансформації представників родини *Brassicaceae*, зокрема *C. sativa*.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовували насіння високопродуктивних сортів і сортозразків рижію посівного *C. sativa*, люб'язно надане відділом нових культур Національного ботанічного саду (НБС) ім. М.М. Гришка НАН України, а саме: сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП, сорти: Перемога та Євро-12, а також сорти Міраж та Клондайк селекції Інституту олійних культур НААН України.

Полеві дослідження рижію посівного проводили протягом чотирьох років на дослідних ділянках НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Вивчення фенологічних фаз проводили за методикою (Бейдеман, 1954). Біометричні вимірювання виконані за методиками (Доспехов, 1967). Морфологічні показники насіння оцінювали, використовуючи рекомендації (Артюшенко, 1990; Сікура, 2005). Для визначення однорідності насіння, життєздатності, енергії проростання, маси 1000 шт. використовували методичні вказівки з насінництва та міжнародні правила визначення якості насіння.

Вміст ліпідів у насінні визначали методом знежиреного залишку за допомогою апарата Сокслета. Ліпіди одержували з подрібненого насіння екстракцією петролейним ефіром. Визначення тригліцеридного складу олії визначали методом неводної обернено-фазової рідинної хроматографії. Аналіз проводили за допомогою рідинно-хроматографічної системи *Agilent 1100*, оснащеної 4-канальним насосом, автосамплером, термостатом колонок та UV-VIS детектором з діодною матрицею. Застосовували ізократичний елюент складу IPA:ACN (1:1). Ліпідні компоненти розділяли на колонці ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 4.6×150 мм, 5 мм за температури 20 °С. Детектування здійснювали за довжини хвилі 206 нм.

Визначення енергетичної цінності зразків проводили на калориметрі «ИСО - 200».

Для введення в культуру *in vitro* насіння рижію стерилізували в 70%- му етиловому спирті протягом 1 хв, потім обробляли гіпохлоритом натрію в концентраціях 1 та 1,5% протягом 5-10 хв (Кувшинов, 2009). Для пророщування стерильного насіння використовували середовище МС (Murasige & Skoog, 1962) з половинним набором макро- та мікросолей, 2%-ю сахарозою, 0,8%-м агаром, рН 5,7-5,8. Культивування вихідного матеріалу *in vitro* здійснювали за таких умов: інтенсивність освітлення – 1,5-2 клк, світловий фотоперіод – 16 год, температура – 22-24<sup>0</sup>С, вологість повітря – 60-80 %.

Для індукції калюсоутворення та регенерації рослин використовували сім'ядольні листки та сегменти гіпокотилів 5-, 7-, 9- та 14- денних проростків рижію. Для вивчення впливу віку експланту на калюсогенез та регенерацію використовували гіпокотилі. Для дослідження впливу фітогормонів на регенерацію *C. sativa* використовували 12 варіантів живильних середовищ, які відрізнялися співвідношенням фітогормонів – бензиламінопурина (БАП) та нафтилоцтової кислоти (НОК), а також різною концентрацією сахарози.

Ефективність кожного середовища оцінювали через 3-4 тижні після розміщення експлантів на середовище по наявності на них утворення калюсу з регенераційними структурами. Частоту регенерації рослин визначали як співвідношення числа експлантів, на яких утворилися рослини-регенеранти до загальної кількості висаджених експлантів. Кожний дослід повторювали тричі, загальна кількість експлантів в одному досліді становила не менше 100 шт.

Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens*, штам AGL1, що містив векторну конструкцію pGH217 з репортерним геном  $\beta$ -глюкуронідази (*GUS*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину у трансгенних рослин.

Для визначення ефективної концентрації гігromіцину, як селективного агента, досліджували вплив його різних концентрацій (0-15 мг/л) на калюсоутворення та регенерацію пагонів, отриманих з експлантів сім'ядольних листків та гіпокотилів 5-7-денних проростків. Для цього експланти розміром 3-5 мм поміщали на чашки Петрі з відповідними концентраціями антибіотика в середовищі (по 20-25 експлантів на чашку) і інкубували в умовах розсіяного світла за температури 24-26 °С. Вивчення впливу досліджуваних концентрацій гігromіцину проводили через 4 тижні після початку культивування експлантів.

Також досліджували вплив гігromіцину на проростання насіння, розвиток і морфологію проростків контрольної лінії. Для цього насіння поміщали в чашки Петрі на фільтрувальний папір, зволожений водним розчином гігromіцину в концентраціях 0-20 мг/л та пророщували за температури + 23 °С з 16-ти годинним фотоперіодом. Для кожного досліді



використовували не менше 30 насінин, дослідження проводили в трьох повторностях.

Для генетичної трансформації рижію посівного використовували нічну культуру *A. tumefaciens*, яку осаджували шляхом центрифугування (4000 обертів/хв.) протягом 5 хв, супернатант видаляли, осад розбавляли рідким середовищем МС до досягання оптичної щільності  $OD_{600} = 0,5$  бактеріальної культури.

Для проведення трансформації в умовах *in vitro* суспензію бактерії додавали до експлантів сім'ядольних листків і гіпокотилів та залишали в умовах ламінарного боксу протягом 15-60 хв, після чого експланти переносили на агаризоване середовище МС для подальшого кокультивування. Селекцію трансгенних ліній проводили на середовищі для регенерації пагонів *C. sativa*, що містило 5 мг/л гігроміцину.

Для гістохімічного визначення глюкуронідази (*GUS*), як результат експресії *gus(uidA)*-гена (гена  $\beta$ -глюкуронідази) в тканинах ліній рослин *C. sativa* використовували 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкоронід (X-Gluc). У результаті реакції з даним субстратом в області локалізації ферменту в трансгенних клітинах утворювався блакитний осад (Jefferson, 1987).

Для здійснення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta* рослини вирощували до стадії цвітіння. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення квіток („floraldip”) у суспензійну культуру агробактерії на 10-15 сек, далі їх накривали поліетиленовими плівками для створення умов з підвищеною вологістю та витримували протягом 24 год.

Для відбору ймовірно трансгенних ліній зібране насіння ( $T_1$ ) пророщували на фільтрувальному папері з гігроміцином у концентрації 20 мг/л. Через 7-10 діб відбирали зелені, нормально розвинені проростки для їх подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

Трансгенну природу отриманих рослин встановлювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів до репортерного гена *GUS*. Для цього рослину ДНК виділяли за допомогою ЦТАБ-методу (Ausubel, 1987). Ампліфікацію проводили з такими праймерами: *uideA1* (5'- CAGGAAGTGATGGAGCATCAG - 3') та *uideA2*: 5'- TCGTGCACCATCAGCACGTTA -3', що були люб'язно надані к.б.н. В.В. Радчуком (Інститут генетики рослин і досліджень культурних рослин, Гатерслебен, Німеччина). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, по 0,2 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 од. Taq-полімерази (Реплікон, Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (“Applied Biosystems” США) за наступною схемою: початкова денатурація при 94°C, 5 хв; ампліфікація – 30 циклів (94°C – 30 с, 62°C – 90 с, 72°C – 2хв. 30 с); кінцева елонгація – 72°C, 7 хв. Продукти ампліфікації ДНК розділяли за допомогою електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі в 1xTBE-буфері в присутності етидію броміду та візуалізували в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (GeneRuler™ 100 bpDNALadder, ready-to-use, “Fermentas” – Литва).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Морфофізіологічні характеристики досліджуваних сортів та сортозразків рижію посівного.** Дослідження тривалості вегетаційного періоду проводили від ранньої весни (ІІІ декада березня) до пізньої осені (ІІІ декада жовтня). У результаті було встановлено, що для створення насінних посівів з високою продуктивністю найбільш сприятливий період сівби - від ІІІ декади квітня до ІІІ декади травня. Враховуючи, що рослина має дуже короткий період вегетації, то останні строки сівби, як було виявлено, можна проводити в кінці серпня. За цих умов рослини рижію розвивалися до фази цвітіння і початку плодоношення та формували повноцінну надземну масу, однак фаза досягання насіння у них не наставала. Отже, для створення насінних посівів з високою продуктивністю рижій можна сіяти у різні строки протягом тривалого періоду: від ІІ декади квітня до кінця червня. Тривалість вегетаційного періоду *C. sativa* до досягання насіння залежно від досліджуваного зразка становила від 65 до 90 діб.

За даними досліджень було встановлено, що нові сорти та сортозразки рижію характеризувались високим продукційним потенціалом та вирізнялись за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками (Табл. 1), що за рядом з цих показників перевищували, або були на рівні морфологічних характеристик деяких сортозразків ярого рижію різного регіонального походження, які були проаналізовані раніше (Ionescu (Truta), 2009; Комарова, 2010; Комарова та Лях, 2010; Лях, 2010). Серед досліджуваних генотипів найбільш виділявся сортозразок ФЕОРЖЯФ-4 і сорти Перемога та Євро-12.

Таблиця 1

### Морфометричні показники сортів та сортозразків *C. sativa* у фазі цвітіння

№з/п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Висота рослин, см	Бічні пагони на стеблі, шт.	Діаметр стебла, мм	Міжвузля на стеблі, шт.
1	ФЕОРЖЯФ-1	59,5±0,57	6,0± 0,25	4,0±0,09	8,4±0,18
2	ФЕОРЖЯФ-2	49,5±0,67	6,5± 0,25	3,8±0,19	8,7±0,23
3	ФЕОРЖЯФ-3	48,7±0,23	8,5± 0,25	3,2±0,13	14,8±0,19
4	ФЕОРЖЯФ-4	60,2±2,14	7,2±0,38	4,2±0,20	12,8±0,80
5	ФЕОРЖЯФ-5	55,4±1,17	7,8±0,48	4,2±0,28	9,2±0,25
6	ФЕОРЖЯФД	57,5±0,67	5,9±0,25	4,7±0,13	12,9±0,38
7	ФЕОРЖЯФЧ	54,8±1,53	7,4±0,13	3,7±0,28	8,4±0,21
8	ФЕОРЖЯФЧП	54,4±1,83	8,5±0,23	4,7±0,22	12,4±0,17
9	Перемога	65,5±1,51	8,1±0,51	4,5±0,17	12,4±0,17
10	Євро-12	69,2±2,02	8,8±0,50	4,5±0,17	14,4±0,46
11	Міраж	59,4±3,83	6,6±0,22	4,4±0,98	12,2±1,57
12	Клондайк	60,8±0,23	6,5±0,25	4,2±0,10	12,7±0,46

По мірі росту та розвитку рослин *C. sativa* змінювались основні морфометричні показники, які до кінця вегетації досягали максимальних значень.

Встановлено, що розмір стручків та кількість насінин у стручку залежать від формових особливостей та місця розміщення на рослині (Табл. 2). Найбільшу кількість насіння в стручку на основному стеблі зафіксовано у сорту Євро-12, а найменшу у ФЕОРЖЯФ-1, тоді, як за кількістю насіння в стручку на бічних пагонах перевагу мав сортозразок ФЕОРЖЯФ-4. Важливими параметрами, які впливають на якісні показники посівного матеріалу, є розмір плодів та насіння.

При дослідженні морфометричних показників плодів було виявлено, що найменшу довжину мав плід сортозразку ФЕОРЖЯФ-3 (7,42 см), а найбільшу – ФЕОРЖЯФ-4 (9,13 см.). Десять з дванадцяти зразків мали довжину від 8 до 9 мм. Найбільшою шириною вирізнявся плід сортозразка ФЕОРЖЯФЧ (4,54 мм), найменшою – ФЕОРЖЯФ-3 (3,47 мм). Максимальну товщину плодів мали сортозразки ФЕОРЖЯФД (4,20 мм), мінімальну – ФЕОРЖЯФ-3 (3,37 мм). Залежно від формових особливостей рослин, розмірів насінин рижю, маса 1000 насінин варіювала від 1,5 до 2,4 г (Табл. 2). Крупніше насіння *C. sativa* мало масу (1000 шт.) від 2,1 до 2,4 г (ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФД, сорт Євро-12), дрібніше – 1,5-1,67 г (ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФЧП).

Таблиця 2

**Морфометричні показники сортозразків та сортів *C. sativa* у фазі  
достигання насіння**

№ п/п	Сортозразок, сорт рижю посівного	Висота рослин, см	Кількість бічних пагонів I порядку, шт	Кількість стручків, шт.		Кількість насіння в стручку, шт.		Маса 1000 шт. насінин, г
				на основному стеблі	на бічних пагонах I порядку	на основному стеблі	на бічних пагонах I пор.	
1	ФЕОРЖЯФ-1	65,0±1,78	10,2±1,29	43,3±3,42	26,6±1,41	8,0±0,68	6,0±0,99	1,50
2	ФЕОРЖЯФ-2	69,6±1,26	8,4±1,01	40,5±2,75	26,8±1,89	9,5±1,04	8,0±0,83	1,57
3	ФЕОРЖЯФ-3	67,0±1,77	7,9±0,61	49,0±1,71	25,0±1,45	9,7±1,06	8,8±0,84	2,10
4	ФЕОРЖЯФ-4	84,6±2,08	7,2±0,95	36,2±1,19	27,1±1,55	10,5±1,04	9,8±0,84	2,40
5	ФЕОРЖЯФ-5	68,2±1,61	9,9±1,02	36,9±2,22	22,7±2,52	9,4±1,95	7,1±0,91	1,67
6	ФЕОРЖЯФД	71,3±1,63	10,2±1,32	43,6±3,67	28,1±2,53	9,4±0,81	6,1±0,78	2,19
7	ФЕОРЖЯФЧ	67,6±2,08	10,2±0,95	26,2±2,11	18,1±1,55	8,7±1,13	9,6±0,45	1,82
8	ФЕОРЖЯФЧП	68,3±2,06	7,3±0,62	39,1±4,61	20,6±1,37	10,4±1,35	7,4±0,90	1,69
9	Перемога	79,0±1,17	11,7±0,29	48,4±1,21	25,0±1,45	10,3±1,06	8,5±0,45	1,90
10	Євро-12	97,0±1,34	10,9±0,35	50,4±1,21	29,0±1,45	11,7±1,13	9,2±0,87	2,20
11	Міраж	69,2±1,19	7,9±1,21	34,7±1,82	27,2±2,25	9,0±0,68	7,0±0,83	1,78
12	Клондайк	73,7±1,70	10,4±0,97	42,2±3,36	29,6±2,89	9,1±0,98	8,4±0,82	1,72

У результаті проведених досліджень було підраховано, що нові сортозразки та сорти рижю можуть формувати 3-4 т/га насіння із вмістом олії 36-43% при її виході 1000-1300 кг/га. Показники урожайності досліджуваних генотипів ярого рижю сягали 25 т/га біомаси і 5-8 т/га сухої

речовини, 0,8-1,0 т/га протеїну, що вказує на перспективність використання даної культури як високобілкової та високовітамінної сировини для кормових цілей. За показниками урожайності насіння описані нами нові сортозразки та сорти рижію перевищують всі досліджувані та описані сорти, що вирощуються в Австрії (Vollmann, 2007) та Румунії (Ionescu, 2009), а також сорти і мутанти, досліджені Комаровою (2010) та Лях і Комаровою (2010). За основними морфометричними параметрами встановлено суттєву перевагу сортів Перемога та Євро-12.

**Біохімічний аналіз сортозразків та сортів *C. sativa*.** Характерною особливістю рослин *C. sativa* є високий вміст ліпідів у насінні. При порівняльних дослідженнях біохімічного складу досліджуваних сортозразків та сортів (Табл. 3) було показано, що насіння рижію вирізняється високим вмістом ліпідів (36,04 – 43,89 %) та великим виходом урожаю (1058 – 1330 кг/га). Олія має високу теплоємність, що забезпечує великий вихід енергії на одиницю площі (9,80-12,35 Гкал/га). Як за вмістом ліпідів у насінні, так і за виходом енергії з олії переважали сорти Перемога, Євро-12 та сортозразок ФЕОРЖЯФ-4.

Таблиця 3

**Вміст ліпідів у насінні та його енергетична цінність у досліджуваних сортів та сортозразків *C. sativa***

Сортозразок, сорт	Вміст ліпідів у насінні, %	Вихід ліпідів з насіння, кг/га	Вихід енергії з олії, Гкал/га
ФЕОРЖЯФ-1	38,24	1058	9,80
ФЕОРЖЯФ-2	43,89	1203	11,11
ФЕОРЖЯФ-3	42,64	1093	10,14
ФЕОРЖЯФ-4	39,49	1289	11,86
ФЕОРЖЯФ-5	38,13	1229	11,38
ФЕОРЖЯФД	42,62	1092	10,14
ФЕОРЖЯФЧ	36,56	1097	10,11
Міраж	42,66	1060	9,82
Клондайк	36,04	1105	10,17
Перемога	42,55	1282	11,96
Євро-12	39,35	1330	12,35

Якість та напрям використання олії визначаються її жирнокислотним складом. Найбільший вміст поліненасиченої ліноленової кислоти зафіксовано у сортозразка ФЕОРЖЯФД (38,3%) та сорту Євро-12 (35,6 %) (Табл. 4). Сорт Клондайк та сортозразки ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ відрізнялися вищим вмістом лінолевої кислоти порівняно з іншими зразками. Серед насичених кислот за вмістом у складі олії *C. sativa*

переважала пальмітинова кислота. Найбільше її містило насіння сорту Клондайк (11,4 %).

Високий вміст олеїнової кислоти зафіксовано у сортозразка ФЕОРЖЯФ-2 (18,5 %), сортів Міраж (17,5 %) і Перемога (17,3 %), які придатні для отримання олії для харчових цілей. Отже, встановлено, що для всіх сортозразків та сортів характерним є високий вміст ліноленої, лінолевої, олеїнової, гондоїнової (11-ейкозенової) та пальмітинової кислот, а також властивої всім представникам родини *Brassicaceae* ерукової кислоти (Budin, 1995).

Для використання олії для технічних та енергетичних цілей цінними є ФЕОРЖЯФЧП, ФЕОРЖЯФ-5 та Євро-12, що характеризуються високим вмістом ерукової кислоти, яка є цінною сировиною для виробництва біодизельного палива (Scarth & Tang, 2006).

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що нові сортозразки та сорти рижю суттєво вирізняються за морфологічними особливостями та характеризуються високим продукційним потенціалом. Для розробки методів подальшого біотехнологічного вдосконалення нами було обрано два сорти рижю Перемога та Євро-12.

Таблиця 4

**Жирнокислотний склад олії досліджуваних сортів та сортозразків  
*C. sativa***

Сортозразок, сорт рижю посівного	Лінолева (18:2)	Ліноленова (18:3)	Міристинова (14:0)	Пентадеканова (15:)	Пальмітинова (16:0)	Маргарінова (17:0)	Стеаринова (18:0)	Арахінова (20:0)	Бегенова (22:0)	Лігноцеринова (24:0)	Пальміто-леїнова (16:0)	Олеїнова (18:1)	Нервонова (24:1ω9)	Гондоїнова (20:1ω9)	Ерукова (22:1)
ФЕОРЖЯФ-1	20,094	34,066	0,166	-	9,409	-	2,524	1,219	0,230	0,068	0,193	16,717	0,108	10,777	1,466
ФЕОРЖЯФ-2	20,028	32,496	0,136	0,048	9,534	0,065	1,649	0,436	0,151	0,099	0,182	18,467	0,187	12,497	1,554
ФЕОРЖЯФ-3	20,577	32,447	0,154	0,058	10,483	0,061	3,062	1,043	0,289	0,129	0,188	13,803	0,244	12,837	1,737
ФЕОРЖЯФ-4	21,860	31,353	0,160	0,069	11,083	0,061	2,893	0,895	0,287	0,061	0,185	13,188	0,220	12,909	1,845
ФЕОРЖЯФ-5	20,963	34,967	0,137	0,055	9,833	0,053	2,401	1,019	0,331	0,062	0,158	11,995	0,224	12,456	2,015
ФЕОРЖЯФД	20,445	38,271	0,202	0,111	9,919	0,109	2,090	0,842	0,252	0,054	0,075	14,143	0,182	9,531	1,277
ФЕОРЖЯФЧ	21,619	33,110	0,151	0,067	10,774	0,061	2,780	0,871	0,331	0,076	0,183	13,218	0,237	11,738	1,772
ФЕОРЖЯФЧП	21,981	32,858	0,147	0,053	9,105	0,054	1,923	1,030	0,524	0,158	0,161	15,276	0,205	11,420	2,368
Міраж	20,460	32,732	0,138	-	9,593	-	2,594	0,980	0,188	0,093	0,177	17,482	0,258	9,951	1,716
Клондайк	24,646	31,609	0,169	0,086	11,426	0,057	1,728	0,951	0,221	0,089	0,186	13,515	0,263	10,768	1,702
Перемога	21,186	32,271	0,136	0,053	9,780	0,061	1,854	0,708	0,180	0,090	0,149	17,319	0,161	12,050	1,379
Євро-12	19,762	35,564	0,174	0,070	9,660	0,063	2,685	1,139	0,490	0,082	0,185	13,046	0,200	11,645	1,861

**Введення в культуру *in vitro* та регенерація рослин рижію посівного.** Стерилізація рослинного матеріалу та вибір типу експланту є одним з основних етапів введення в культуру *in vitro*. Встановлено, що 5-7 хв стерилізація насіння досліджуваних сортів *C. sativa* в 1,5% гіпохлориті натрію є достатньою для ефективною стерилізації матеріалу, при якій зберігається повна схожість насіння як для сорту Перемога, так і для сорту Євро-12. При цьому проростки мали нормальну морфологію і на 7-у добу культивування утворювали добре розвинені корені.

Зазвичай, у багатьох видів рослин родини *Brassicaceae* для ініціації органогенезу в умовах *in vitro* використовують сім'ядолі та гіпокотилі, як найбільш оптимальний тип експлантів (Tang, 2003; Zhang, 2006). Для визначення ефективності використання різних типів експлантів та їх віку, для введення в культуру *in vitro* в наших дослідженнях було використано експланти сім'ядольних листків та гіпокотилів 5-, 7-, 9- та 14- денних проростків двох сортів рижію: Перемога та Євро-12. Нами було відмічено, що утворення калюсу на сім'ядольних листках відбувалося значно швидше, ніж на експлантат гіпокотилів. Було встановлено, що найбільшою здатністю до регенерації характеризувалися експланти 5- та 7-и денних проростків, тоді, як у 9-денних ефективність пагоноутворення значно зменшувалась у всіх досліджуваних зразках (Табл. 5-6). На експлантах 14-денних проростків формування калюсних структур відбувалось більш сповільнено, а формування зачатків пагонів взагалі не спостерігалось.

Таблиця 5

**Вплив віку експлантів сім'ядолей *C. sativa* на частоту пагоноутворення**

Сорт	Частота пагоноутворення з експлантів сім'ядолей, %		
	Вік проростків, з яких отримано експланти, діб		
	5	7	9
Перемога	51,9±1,7	60,2±2,1	33,9±3,6
Євро-12	51,8±2,2	58,6±2,6	29,2±4,2

Таблиця 6

**Вплив віку експлантів гіпокотилів *C. sativa* на частоту пагоноутворення**

Сорт	Частота пагоноутворення з експлантів гіпокотилів, %		
	Вік проростків, з яких отримано експланти, діб		
	5	7	9
Перемога	31,6±3,9	33,9±1,5	21,7±3,5
Євро-12	31,2±0,8	25,4±3,5	19,1±2,4

Таким чином, нами продемонстровано, що для ефективної регенерації пагонів *C. sativa* доцільно використовувати експланти проростків на більш ранніх стадіях їх розвитку. В нашому випадку це 5- або 7-денні проростки, оскільки ефективність регенерації пагонів на їх експлантах була вищою в порівнянні з 9-денними проростками. Відносно типу експланту, то в однаковій мірі для регенерації пагонів можна використовувати як сім'ядольні листки, так і гіпокотилів.

Відомо, що найбільш ефективна регенерація пагонів рижію відбувається на середовищах, що містять цитокиніни в комбінації з ауксинами (Tattersall, 1999; Göre & Kurt, 2015). Так, для вивчення процесу регенерації пагонів у *C. sativa* нами було протестовано декілька варіантів середовищ, які відрізнялись або концентрацією фітогормону БАП (1 – 4 мг/л), або містили різні співвідношеннями БАП (1 або 2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л). У результаті проведених досліджень було виявлено, що процес диференціації клітин відбувався доволі швидко, вже наприкінці третього тижня культивування ріст калюсу дещо сповільнювався, але при цьому спостерігали інтенсивне пагоноутворення на його поверхні. На середовищі, яке містило БАП в комбінації з НОК, формування пагонів відбувалося набагато інтенсивніше в порівнянні з середовищем, що містило лише БАП. Така тенденція була характерною для всіх типів експлантів, отриманих як з 5-денних, так і 7-денних проростків (Рис. 2).

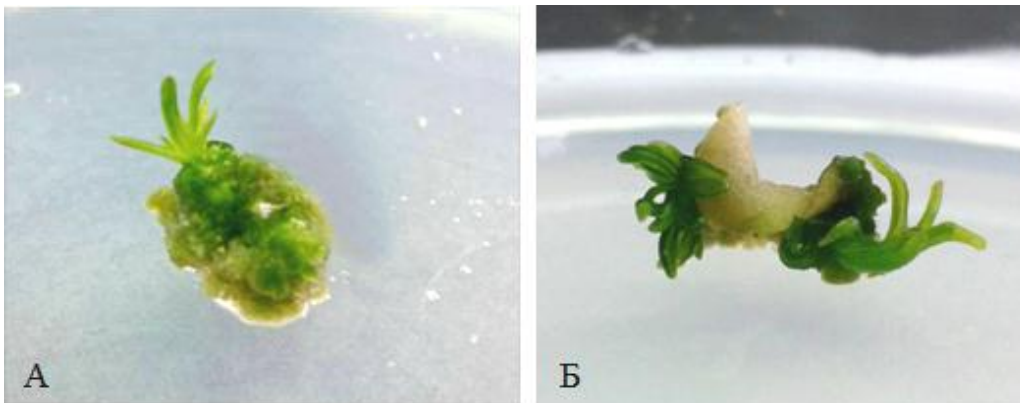


Рис. 2. Регенерація пагонів з експлантів гіпокотилів проростків (А) та сім'ядольних листків (Б) сорту Перемога.

За використання середовища, що містило в своєму складі лише БАП, незалежно від концентрації, регенерація пагонів відбувалась менш ефективно. Так, частота регенерації пагонів на експлантах сім'ядольних листків була 51,7% для 5-денних та 50,3% для 7-денних проростків. Щодо експлантів гіпокотилів, то показник частоти регенерації був на рівні 22%. Найвищу частоту регенерації пагонів з експлантів рижію було отримано на середовищах, що містили БАП в концентрації 1 – 2,0 мг/л та 0,1 мг/л НОК. Вона становила майже 70% у експлантів сім'ядольних листків та 45% у експлантів гіпокотилів (Рис. 3).

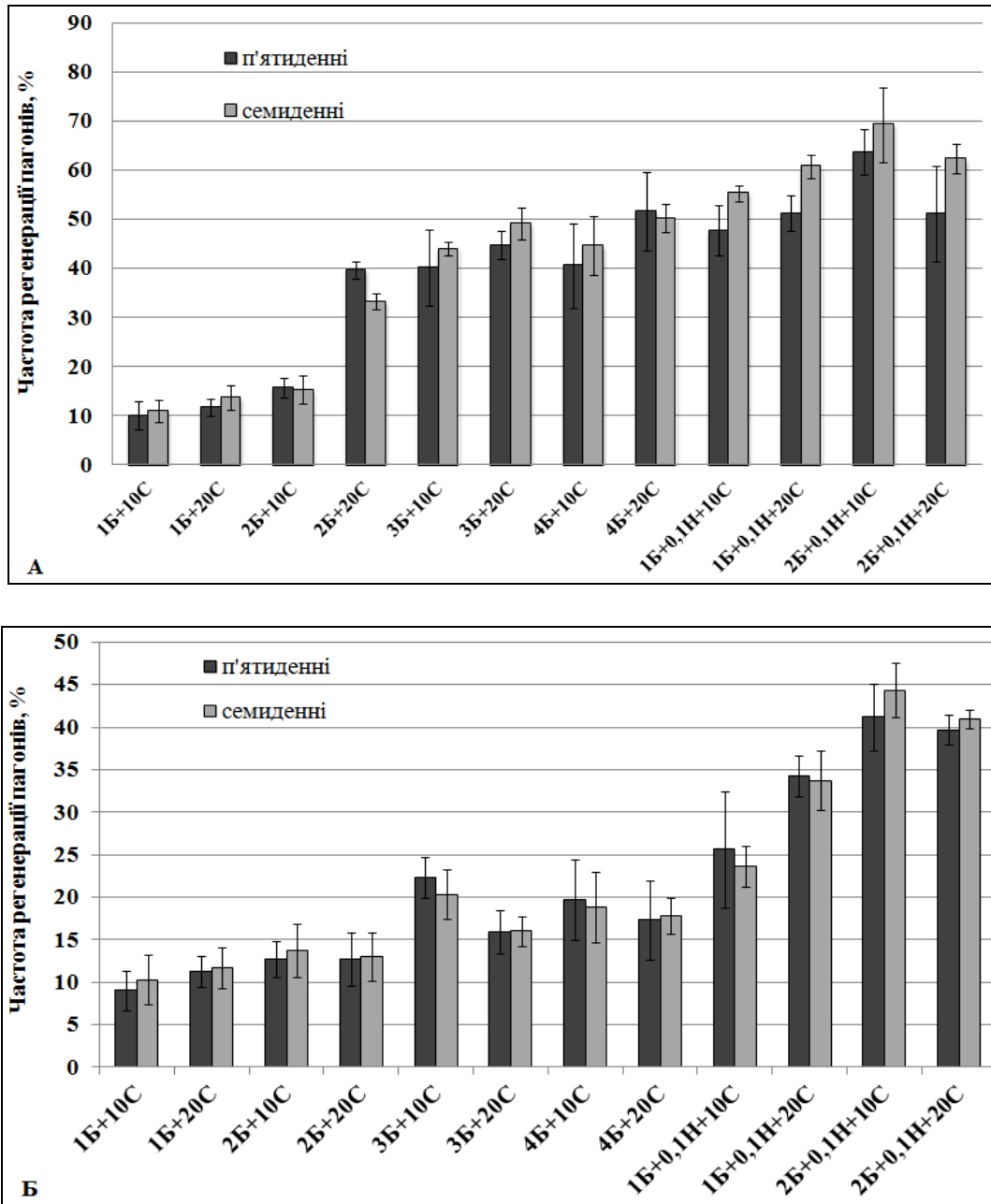


Рис. 3. Частота регенерації пагонів з різних експлантів сорту Перемога на середовищах, що містили різні комбінації фітогормонів: А – сім'ядольні листки; Б – гіпокотилі (Б – БАП; Н – НОК; С – сахароза).

При дослідженні впливу сахарози на частоту пагоноутворення було встановлено, що за використання 20 г/л сахарози цей процес відбувався з більшою частотою, ніж за використання 10 г/л.

Щодо вивчення процесу ризогенезу, то було виявлено, що ініціація утворення коренів відбувалась на середовищі МС з додаванням 1 мг/л НОК, тоді як при додаванні 0,1 чи 0,5 мг/л НОК формування коренів у регенованих пагонів взагалі не спостерігалось.

Аналіз ефективності регенерації пагонів всіх інших досліджуваних сортів та сортозразків рижю показав, що найбільша кількість регенерантів на експлант була у сортів Перемога та Міраж, а також у сортозразка ФЕОРЖЯФ-5 (Рис.4).



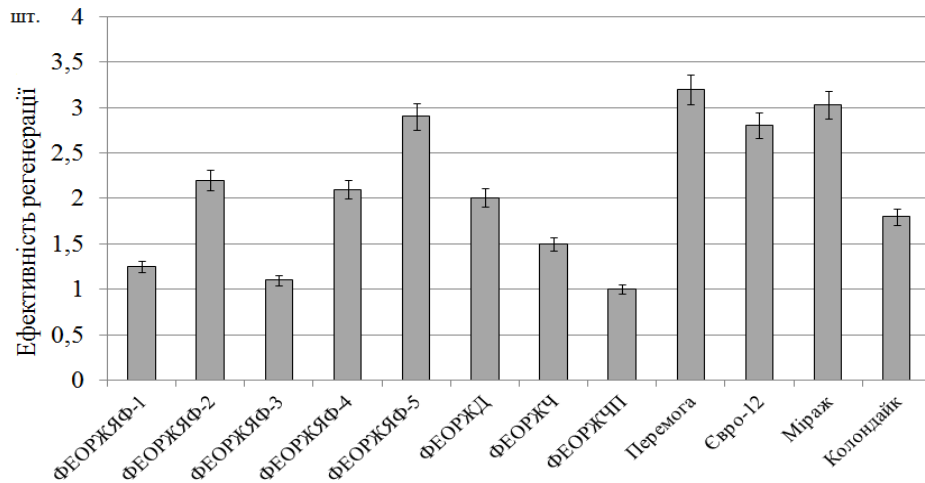


Рис. 4. Ефективність регенерації рослин у досліджуваних сортозразків та сортів *C. sativa*.

Таким чином, було встановлено, що найбільш ефективним для регенерації пагонів *C. sativa* є середовище МС, що містило в якості фітогормонів 1-2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, а для їх укорінення – середовище МС з 1 мг/л НОК.

**Генетична трансформація та аналіз трансгенних ліній *C. sativa*.** Оскільки конструкція для трансформації містила селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину, було досліджено дію його різних концентрацій на життєздатність експлантів рижію. У результаті проведених досліджень було встановлено, що ефективною концентрацією гігроміцину, за дії якої гинуло більше 50% експлантів є 5 мг/л. Також було вивчено вплив гігроміцину на проростання насіння та ріст і розвиток проростків. За результатами тестування на чутливість до селективного агента було встановлено, що критичною концентрацією для відбору трансгенного насіння рижію є 20 мг/л гігроміцину, яку в подальшому було використано при селекції трансгенних ліній після трансформації методом *in planta*.

Генетичну трансформацію *C. sativa* здійснювали двома шляхами: в умовах *in vitro* та за використання методу *in planta*, порівнюючи їх ефективність в наших дослідженнях. Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in vitro* було взято сорт Перемога, який характеризувався високою регенераційною здатністю. Для визначення умов, що дають можливість ефективно проводити трансформацію рижію, було проведено серію експериментів, в яких досліджували тривалість інокуляції та ко-культивування з агробактерією. Було встановлено, що найбільш оптимальна тривалість інокуляції як сім'ядольних листків, так і сегментів гіпокотилів агробактерією є 15 хв, а оптимальний час ко-культивування експлантів з *A. tumefaciens* складає дві доби. Збільшення часу інокуляції до 30 хв і більше призводило до негативного ефекту на рослинні тканини. За таких умов значна частина експлантів відмирала або взагалі втрачала здатність до регенерації пагонів.

Аналіз експресії репортерного гена *GUS* після трансформації експлантів проводили через три доби після перенесення їх на селективне середовище з гігromіцином (Рис. 5).

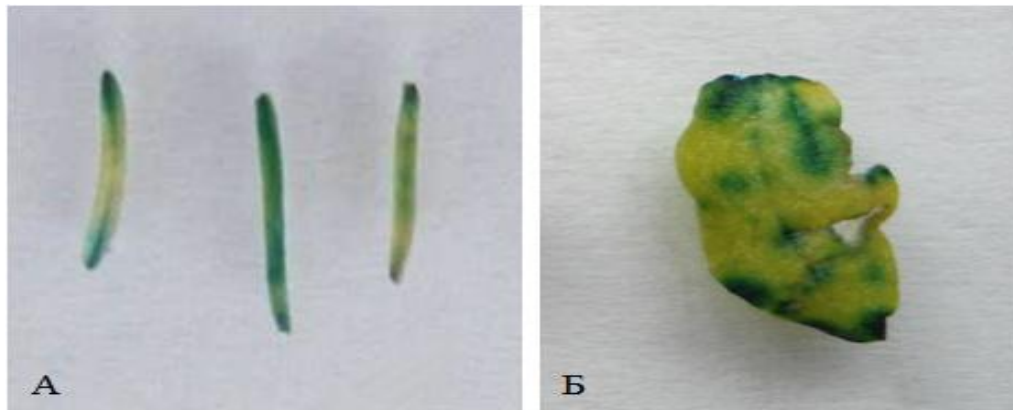


Рис. 5. Результати гістохімічного аналізу активності репортерного гена *GUS* в клітинах експлантів гіпокотилів (А) та сім'ядольних листків рижю (Б) після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації конструкцією pGH217.

У результаті селекції на середовищі, що містило 5 мг/л гігromіцину, були відібрані трансгенні лінії *C. sativa*, які також аналізували за допомогою гістохімічного аналізу (Рис. 6). За нашими даними частота транз'єнтної трансформації рижю становила 1,6%. Нами було встановлено також, що більш тривале культивування калюсу на селективному середовищі в присутності гігromіцину послідовно знижувало його регенераційний потенціал, що відображалось на кінцевому результаті і на кількості отриманих регенерантів. Більше того, тривале (більше 4 місяців) культивування в умовах *in vitro* пагонів, що були регенеровані на гігromіцині, також призводило до значного інгібування їх здатності до коренеутворення.

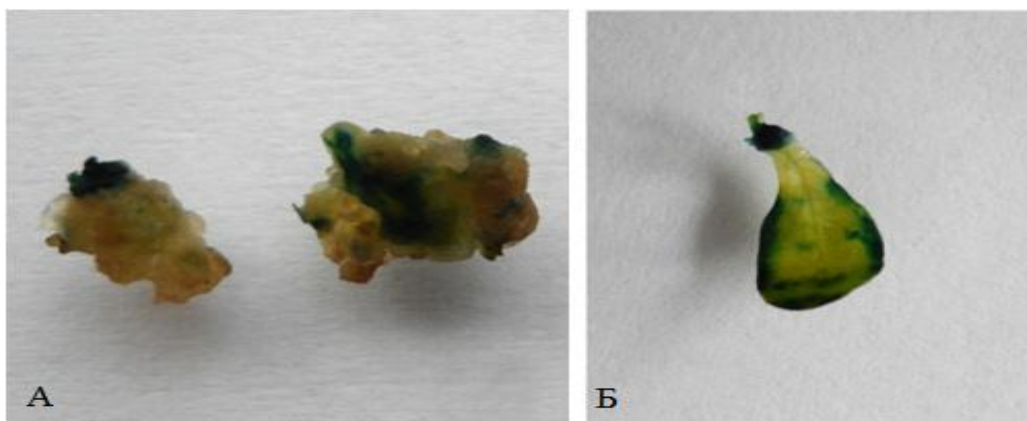


Рис. 6. Результати гістохімічного аналізу активності репортерного гена *GUS* в сформованому через три тижні на селективному середовищі калюсі (А) та листках регенерованих пагонів *C. sativa* (Б).

Наступним етапом роботи була *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин рижію методом *in planta*. Для цього, інокуляцію рослин рижію проводили в умовах вегетаційного періоду на дослідних ділянках. Трансформовані рослини знаходились на ділянках до повного дозрівання насіння. У результаті проведених досліджень було отримано насіння, яке за морфологічними показниками не відрізнялося від контролю (Рис. 7).

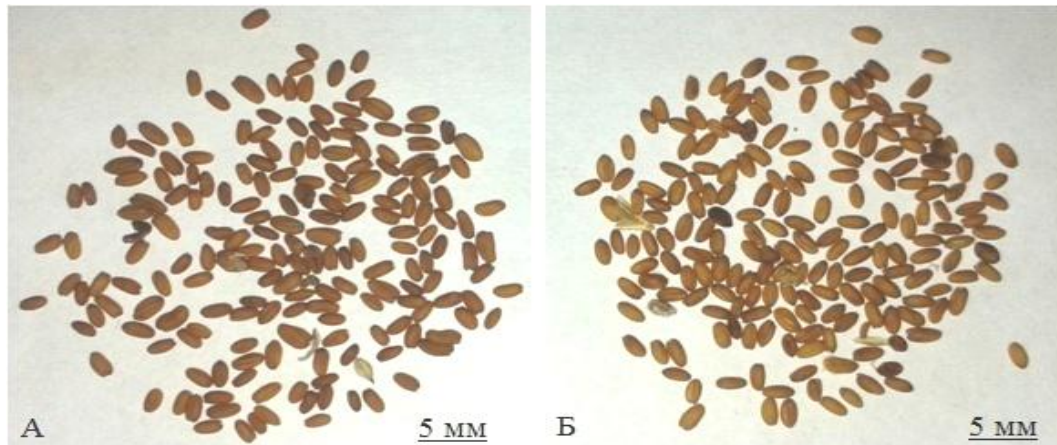


Рис. 7. Загальний вигляд насіння контрольної рослини *C. sativa* (А) та насіння, отриманого після трансформації *C. sativa* методом *in planta* (Б).

Так, після трансформації рижію методом *in planta* було отримано близько 4,5 г насіння. Для відбору потенційно транс генного насіння ( $T_1$ ) його пророщували на фільтрувальному папері з гігроміцином у концентрації 20 мг/л, оскільки дана концентрація при вивченні впливу антибіотику на проростання насіння та ріст і розвиток проростків рижію виявилась найбільш токсичною для контрольної лінії. Протягом 3–5 діб насіння проростало достатньо рівномірно, але вже через тиждень селекції спостерігали, що нетрансформовані проростки були більш пригнічені у рості, листя скручувалося в той час, як трансформовані проростки мали довші гіпокотилі. Частоту трансформації рижію визначали як співвідношення кількості гігроміцин-стійких проростків до загальної кількості насіння, що пророщували у присутності селективного агента. Для сорту Перемога вона становила 2,2 %.

Для підтвердження трангенної природи отриманих нами рослин було проведено молекулярно-генетичний аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР-аналіз проводили з використанням відповідних праймерів до гена *GUS*. У результаті було отримано фрагменти, які відповідали розрахованій довжині фрагмента репортерного гена – 830 п.о., і вони були виявлені у зразку, що відповідає позитивному контролю (плазмід рGH217), та в трангенних лініях. При аналізі рослинної ДНК із контрольних рослин рижію, ампліфікацію цього гена не спостерігали (Рис. 8).

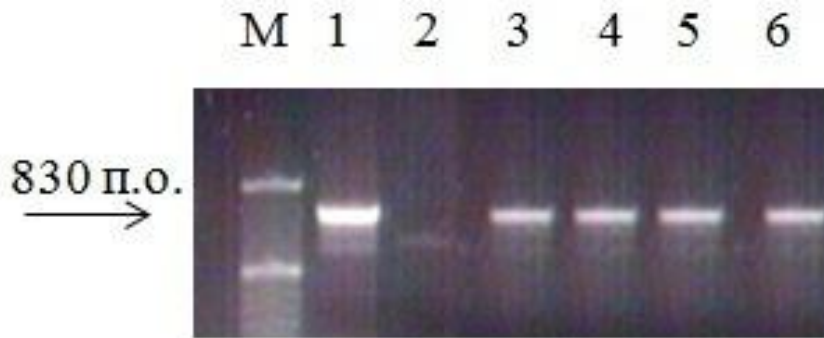


Рис. 8. Результати ПЛР-аналізу рослин *C. sativa*: М – маркер молекулярних мас (п.о.), 1 – плазміда рGH217, 2 – нетрансформована рослина *C. sativa* (контроль), 3 – 6 – трансгенні рослини рижію Т<sub>1</sub>.

Отже, результати молекулярно-генетичного аналізу ліній рижію посівного підтверджують перенесення та інтеграцію чужорідного гена.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було підтверджено, що найбільш ефективним методом перенесення чужорідних генів в геном рослин рижію посівного для подальшого біотехнологічного вдосконалення різних генотипів цього виду є метод генетичної трансформації методом *in planta*, оскільки він є більш зручним, швидким, а також за його використання спостерігається збільшення показника частоти трансформації *C. sativa*.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проаналізовано морфофізіологічні та біохімічні характеристики ряду ярих сортів і сортозразків рижію посівного (*Camelina sativa*) української селекції, розроблено метод введення їх в культуру *in vitro*, вивчено вплив фітогормонів на індукцію пагоноутворення та укорінення рижію з метою оптимізації умов культивування для його подальшого біотехнологічного вдосконалення, а також проведено порівняння частоти генетичної трансформації *C. sativa*, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta*.

1. За результатами порівняльного аналізу морфофізіологічних та біохімічних характеристик 12 ярих сортів і сортозразків рижію посівного встановлено, що всі вони характеризуються високим продукційним потенціалом (3-4 т/га). Визначено, що тривалість вегетаційного періоду до досягання насіння у проаналізованих зразків *C. sativa* становить від 65 до 90 діб.

2. Встановлено, що насіння досліджуваних сортів та сортозразків рижію характеризується високим вмістом ліпідів (36–43 %) та великим їх виходом з урожаєм (1000–1300 кг/га). За вмістом ліпідів та за виходом енергії з олії перевагу порівняно з іншими мали сорти Перемога та Євро-12 і сортозразок ФЕОРЖЯФ-4.

3. Встановлено, що для використання олії в технічних та енергетичних цілях більш цінними є сорти Перемога та Євро-12 і сортозразки ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФЧП, які характеризуються високим вмістом ненасичених жирних кислот, у тому числі ерукової кислоти, яка є важливою жирною кислотою для отримання якісного біодизелю.

4. Підбрано умови введення в культуру *in vitro* всіх досліджуваних сортів і сортозразків *C. sativa*. Встановлено, що для індукції пагонів рижію посівного найкраще використовувати експланти 5- або 7-денних проростків, які характеризуються найбільшою здатністю до регенерації рослин. Для ефективної регенерації рослин можна використовувати як сім'ядольні листки, так і експланти гіпокотилів цих проростків.

5. У результаті дослідження впливу фітогормонів на регенерацію пагонів рижію та їх укорінення було встановлено, що живильне середовище МС, яке містить комбінацію фітогормонів БАП (1-2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л), є найбільш ефективним для регенерації пагонів, тоді як середовище, що містить 1 мг/л НОК – для їх укорінення.

6. Встановлено, що найбільшою здатністю до регенерації рослин характеризуються сорти Перемога і Міраж та сортозразок ФЕОРЖЯФ-5 (ефективність регенерації – близько 3 пагонів на експлант).

7. За результатами проведеної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів рижію з використанням репортерного гена *GUS* та гістохімічного аналізу трансгенних ліній було встановлено, що частота транз'єнтної трансформації *C. sativa* становить 1,6%.

8. За використання методу генетичної трансформації *in planta* та проведеного молекулярно-генетичного аналізу відселектованих трансгенних ліній *C. sativa* було встановлено, що цей метод перенесення чужорідних генів в геном рослин рижію посівного є більш ефективним, оскільки частота стабільної трансформації за умов його використання становить 2,2%.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Yemets A.I., Boychuk Yu.N., Shysha E.N., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Establishment of *in vitro* culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. Cytology and Genetics. V 47, N 3, p. 138-144. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І., Бойчук Ю.М., Андрущенко О.Л., Вергун О.М., Рахметова С.О. *Camelina sativa* (L.) crantz – цінна олійна рослина. Інтродукція рослин. – 2014. – Т. 62, 2. – С. 50 – 58. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

3. Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Бойчук Ю.М., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Фізіологічні та морфометричні характеристики нових форм та сортів ярого рижію (*Camelina sativa*). Вісник Українського товариства генетиків і

селекціонерів.– 2014. – Т. 12, № 1. – С. 65–77. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Трансформація *Camelina sativa* методом *in planta*. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 112– 116. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

5. Блюм Р.Я., Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Рахметова С.О., Блюм Я.Б., Рахметов Д.Б. Порівняльна оцінка жирнокислотного складу олій насіння форм та сортів тифону, редьки олійної і рижюю як перспективної сировини для отримання біодизелю. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 61–66. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

6. Шиша О.М., Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Введення в культуру *in vitro* рижюю посівного (*Camelina sativa*). Матеріали міжнародної наукової конференції присвяченої 75-річчю заснування Національного ботанічного саду ім. Гришка НАНУ «Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках», Київ, 15-17 вересня. –2010. – С. 627-630.

7. Бойчук Ю.М., Шиша О.М., Ємець А.І., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Введення в культуру *in vitro* та розробка методу генетичної трансформації рижюю посівного (*Camelina sativa*). Матеріали конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений». – г. Киев, 30 мая-1 июня. – 2011. – С. 18.

8. Шиша, Е.Н., Бойчук Ю.Н., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и генетическая трансформація Рижика посівного (*Camelina sativa L.*). Фактори експериментальної еволюції організмів. – г. Алушта, 19-23 сентября 2011. – Т. 11. – С. 442-445.

9. Бойчук Ю.Н., Шиша Е.Н., Ємець А.І., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и разработка метода генетической трансформации Рижика посівного (*Camelina sativa*). Матеріали першої конференції молодих учених (с міжнародним участієм) «Биология растений и биотехнология». – г. Белая Церковь, 5-7 октября. – 2011. – С. 107.

10. Бойчук Ю.М., Шиша О.М., Ємець А.І. Регенерація рослин рижюю посівного (*Camelina sativa*) культурі *in vitro*. Матеріали XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». –м. Київ, 15-16 листопада. – 2012. – С. 228-229.

11. Бойчук Ю.М., Шиша О.М., Ємець А.І. Генетична трансформація рижюю посівного (*Camelina sativa*). Міжнародна конференція «Геноміка рослин та біотехнологія» та друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». –м. Київ, 23-24 грудня. – 2013. – С. 73.

12. Бойчук Ю.Н., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Изучение жирнокислотного состава рижика посівного (*Camelina sativa*) украинской

селекції. Матеріали VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)». – г. Ялта, Крым, 12 – 17 октября. – 2014. – С. 188.

13. Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Селекційно-генетичний потенціал рижію колекції НБС ім.М.М.Гришка НАН України як перспективний ресурс для виробництва біодизелю. Матеріали наукової конференції в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України – Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив». – м. Київ, 9-10 вересня. – 2014. – С. 90 – 94.

14. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Ємець А.І. Трансформація рижію посівного (*Camelina sativa*) методом *in planta*. Матеріали третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». – м. Київ, 16 – 18 травня. – 2017. – С. 61.

## АНОТАЦІЯ

**Бойчук Ю.М. Відбір та введення в культуру *in vitro* високопродуктивних генотипів ярого рижію (*Camelina sativa* L.) з їх подальшою генетичною трансформацією.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2019.

У дисертаційній роботі представлено результати порівняльного аналізу морфофізіологічних та біохімічних характеристик нових сортозразків та сортів ярого рижію (*Camelina sativa*) української селекції та відібрано найбільш перспективні з них. Серед восьми сортозразків та чотирьох сортів виявлено високопродуктивні генотипи, два сорти та один сортозразок, які за основними морфометричними параметрами та біохімічним складом мали суттєву перевагу. Підібрано умови для введення в культуру *in vitro* та регенерації рослин *C. sativa*. Зокрема, визначено вік та тип експланту для ефективної регенерації з них рослин. Досліджено вплив регуляторів росту на індукцію пагоноутворення та укорінення рижію. Здійснено генетичну трансформацію за допомогою двох методів та продемонстровано, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* є більш ефективним методом перенесення чужорідних генів в геном рижію. Трансгенну природу отриманих рослин було підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного аналізу.

**Ключові слова:** рижій посівний (*Camelina sativa*), сортозразки, сорти, *in planta* трансформація.

## АННОТАЦИЯ

**Бойчук Ю.Н. Отбор и введение в культуру *in vitro* высокопродуктивных генотипов ярового рыжика (*Camelina sativa* L.) с их последующей генетической трансформацией.** – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2019.

В диссертационной работе представлены результаты сравнительного анализа физиологических и морфометрических характеристик новых сортообразцов и сортов ярового рыжика (*Camelina sativa*) украинской селекции и отобраны наиболее перспективные среди них. Продемонстрировано, что для создания семенных посевов с высокой продуктивностью, рыжик можно сеять в разные сроки в течение длительного периода: от II декады апреля до конца июня. Продолжительность вегетационного периода *C. sativa* до созревания семян в зависимости от исследуемого сортообразца или сорта составляла от 65 до 90 суток. Среди исследуемых 12 генотипов наиболее выделялся сортообразец ФЕОРЖЯФ-4 и сорта Пэрэмога и Евро-12, которые характеризовались высоким продуктивным потенциалом и отличались по морфологическим и урожайным характеристикам. По результатам проведенного биохимического анализа было установлено, что по содержанию липидов в семенах, и по выходу энергии из масла преобладали сорта Пэрэмога, Евро-12 и сортообразец ФЕОРЖЯФ-4. Изучив жирнокислотный состав масла, полученного из семян рыжика, установлено, что для всех анализируемых сортообразцов и сортов характерно высокое содержание линоленовой, линолевой, олеиновой, гондоиновой и пальмитиновой кислот, а также эруковой кислоты.

Подобраны условия для введения в культуру *in vitro* и исследованы факторы, влияющие на процессы регенерации побегов и их укоренения. Установлено, что для индукции побегов рыжика лучше использовать экспланты 5- или 7-дневных проростков. Выявлено, что высокую частоту регенерации побегов демонстрируют экспланты семядольных листьев и гипокотилей. Показано, что питательная среда, содержащая комбинацию фитогормонов 1-2 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК является наиболее эффективной для регенерации побегов, а для их укоренения – среда МС с 1 мг/л НУК. Установлено, что сорта Пэрэмога, Евро-12, Мираж и сортообразец ФЕОРЖЯФ-5 обладают наибольшей способностью к регенерации растений в культуре *in vitro*.

Проведена *Agrobacterium*-опосредованная трансформация в условиях *in vitro* и с использованием метода *in planta* и продемонстрировано, что наиболее эффективным методом переноса чужеродных генов в геном рыжика является трансформация *in planta*. Полученные результаты могут в дальнейшем служить



основой для дальнейшего биотехнологического совершенствования наиболее продуктивных сортов или сортообразцов *C. sativa*.

**Ключевые слова:** рыжик посевной, *Camelina sativa*, сорта, регенерация растений, трансформация *in planta*.

## SUMMARY

**Boychuk Yu.M. Selection and *in vitro* culture establishment of highly productive genotypes of spring false flax (*Camelina sativa* L.) for their further genetic transformation.** – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The study presents the results of the comparative analysis of the morphophysiological and biochemical characteristics of new variety samples and varieties of false flax (*Camelina sativa*) of Ukrainian breeding, and selected the most promising ones. Among eight variety samples and four varieties there were found the highly productive genotypes, two varieties and one variety sample which, due to their specific morphometric and their biochemical properties, are very important. Conditions for establishment of *in vitro* culture and shoot regeneration of *C. sativa* have been found. In particular, the age and type of explants for efficient plant regeneration have been determined. The influence of phytohormones on shoot induction and root development of *C. sativa* has been investigated. The analysis of regenerative ability of all investigated false flax genotypes was carried out. A genetic transformation was carried out using two methods and it was demonstrated that *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* is the most effective method for foreign gene transfer to *C. sativa* genome. The transgenic nature of selected plants was confirmed by molecular genetic analysis using specific primers to *GUS* gene.

**Key words:** false flax, *Camelina sativa*, varieties, plant regeneration, *in planta* transformation.