

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

«На правах рукопису»
УДК _____

«До захисту допущено»

В.о. завідувача кафедри
_____ Кузьмінський Є.В.

“ ____ ” _____ 2020р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»,
(код і назва)

на тему: Дослідження активності гена β -глюкуронідази в трансформованих рослинах тютюну

Виконала: студентка 6 курсу, групи БЕ-91мп
(шифр груп)

Олійник Марина Євгенівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Науковий керівник доцент, к.т.н., доцент, Козар М.Ю.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Консультант к.б.н., доцент, Моргун.Б.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ініціали)

_____ (підпис)

Консультант Розробка к.е.н., доцент, Ткаченко Т.П.
стартап (науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ініціали)
проекту
(назва розділу)

_____ (підпис)

Рецензент _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації
немає запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Студент _____
(підпис)

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»,

ЗАТВЕРДЖУЮ
В.о. завідувача кафедри
_____ Кузьмінський Є.В.
«__» _____ 2020р.

**ЗАВДАННЯ
на магістерську дисертацію студенту**

Олійник Марині Євгеніївні
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації Дослідження активності гена β -глюкуронідази в трансформованих рослинах тютюну
науковий керівник дисертації Козар Марина Юріївна, к.т.н, доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом по університету від «__» _____ 20__ р. № _____
2. Термін подання студентом дисертації _____
3. Об'єкт дослідження T_1 покоління трансформованих рослин та вивчення експресії перенесених генів, визначення зв'язку між інтенсивністю експресії та будовою векторів для трансформації, а також штамів *Agrobacterium tumefaciens*, які використовувалися в експерименті.
4. Предмет дослідження Експресія гена β -глюкуронідази під контролем різних промоторів в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою різних штамів *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Перелік завдань, які потрібно розробити 1) провести аналіз літературних джерел; 2) отримати покоління T_1 рослин з насіння трансформованих регенерантів T_0 ; 3) підтвердити наявність гену інтересу та відсутності бактеріального забруднення методом полімеразної ланцюгової реакції; 4)

дослідити експресію репортерного гену β-глюкуронідази шляхом гістохімічного аналізу; 5) провести кількісну оцінку рівня загального розчинного білку за методом Бредфорта; 6) провести кількісну оцінку ферменту β-глюкуронідази використовуючи флуорометричне визначення; 7) розробити стартап проекту; 8) надати основні вимоги з охорони праці та захисту довкілля.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу _____

7. Орієнтовний перелік публікацій _____

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розробка стартап-проекту	Ткаченко Т.П., доцент		

9. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Огляд літератури	До 01.11.2019	
2	Отримання покоління T1 рослин з насіння трансформованих регенерантів T0	01.11.2019-01.03.2020	
3	Підтвердження наявності гену інтересу та відсутності бактеріального забруднення методом полімеразної ланцюгової реакції	01.03.2020-03.05.2020	
4	Дослідження експресії репортерного гену β-глюкуронідази шляхом гістохімічного аналізу	03.05.2020-15.06.2020	
5	Проведення кількісної оцінки рівня загального розчинного білку за методом Бредфорта	15.06.2020-01.11.2020	
6	Проведення кількісної оцінки ферменту β-глюкуронідази використовуючи флуорометричне визначення	01.11.2020-15.11.2020	
7	Розробка стартап-проекту	01.11.2020-15.11.2020	
8	Формулювання висновків та оформлення магістерської дисертації	01.11.2020-15.11.2020	

Студент

_____ (підпис)

М.Є. Олійник
(ініціали, прізвище)

Науковий керівник дисертації

_____ (підпис)

М.Ю. Козар
(ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 107 аркушів, 12 рисунків, 28 таблиць та 111 літературних джерел.

Метою роботи є дослідження впливу різних промоторів та бактеріальних штамів на експресію гена β -глюкуронідази в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Об'єкт дослідження – T_1 покоління трансформованих рослин, в яких досліджувалася експресія гена β -глюкуронідази під контролем різних промоторів в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою різних штамів *Agrobacterium tumefaciens*.

Предмет дослідження – експресія гена β -глюкуронідази під контролем різних промоторів в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою різних штамів *Agrobacterium tumefaciens*.

Метод дослідження – детекція трансгена методом ПЛР, гістохімічне визначення, визначення кількостей загального білку за методом Бредфорта, флуориметричне дослідження активності β -глюкуронідази в трансгенних рослинах покоління T_1 .

Висновок, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну шляхом поєднання штаму *GV3103* та вектору *pICBV16* є найкращою комбінацією для забезпечення стабільної інтенсивної експресії у рослинах тютюну. Схожі рівні експресії демонструвало об'єднання штаму *C58* та векторної конструкції *pCB203*. Найгірші результати дало поєднання штаму *GV3103* та вектору *pCB203*, що імовірно пояснюється тим, що у векторі *pCB203* ген інтересу знаходиться під контролем промотору однодольних, на противагу тютюну є дводольною рослиною і за використання штаму менш придатного для реалізації даної векторної системи, дає низькі рівні експресії, майже на рівні контрольних нетрансформованих зразків.

Agrobacterium-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ, *BAR*, *GUS*, *gusA*, ПЛР, T-ДНК.

ABSTRACT

The master's dissertation contains 107 sheets, 12 figures, 28 tables and 111 literature sources.

The aim of the study is to study the effect of different promoters and bacterial strains on the expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tobacco plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation.

The object of the study is the T1 generation of transformed plants, in which the expression of the β -glucuronidase gene was studied under the control of different promoters in transgenic tobacco plants obtained with different strains of *Agrobacterium tumefaciens*.

The subject of the study is the expression of the β -glucuronidase gene under the control of different promoters in transgenic tobacco plants obtained using different strains of *Agrobacterium tumefaciens*.

Research method – detection of transgene by PCR, histochemical determination, determination of total protein by the method of Bradford, fluorimetric study of β -glucuronidase activity in transgenic plants of generation T₁.

Conclusion that *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco by combining strain *GV3103* and vector pICBV16 is the best combination to ensure stable intense expression in tobacco plants.

Similar expression levels were demonstrated by combining the *C58* strain and the vector construct pCB203. The worst results were obtained by combining strain *GV3103* and vector pCB203, which is probably due to the fact that in the vector pCB203 the gene of interest is under the control of a monocotyledonous promoter, in contrast tobacco is a dicotyledonous plant and when using a strain less suitable for this vector system at the level of control untransformed samples.

Agrobacterium-MEDIATED TRANSFORMATION, *BAR*, *GUS*, *gusA*, PCR, T-DNA

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Розвиток генетичної інженерії рослин.....	12
1.2. Способи перенесення чужорідних генів.....	14
1.3. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація.....	18
1.4. Будова векторів для трансформації.....	20
1.5. Нуклеотидні послідовні регуляції генів у генетично модифікованих рослинах.....	21
1.5.1. Промотори.....	21
1.5.2. Ділянки, що не транскрибуються.....	25
1.5.3. Репортерні гени.....	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
2.1. Характеристика реактивів.....	33
2.2. Векторні конструкції та бактеріальні штами.....	34
2.3. Трансформація <i>Agrobacterium tumefaciens</i> методом електропорації.....	35
2.4. Рослинний матеріал.....	36
2.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> опосередкована генетична трансформація рослин тютюну.....	37
2.6. Аналіз рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації.....	38
2.6.1. Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	38
2.6.2. Гістохімічний аналіз активності фермента β -глюкуронідази.....	40
2.6.3. Флуориметричний метод визначення активності β -глюкуронідази.....	41
2.6.4. Екстракція загального водорозчинного білку з листків рослин.....	42
2.6.5. Вимірювання концентрації сумарного розчинного білку.....	42
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	44
3.1. Генетична трансформація тютюну.....	44
3.2. Отримання регенерантів після <i>Agrobacterium</i> опосередкованої	

трансформації.....	44
3.3. Молекулярно-біологічне дослідження трансформантів на присутність гену інтересу.....	46
3.4. Гістохімічний аналіз наявності та інтенсивності експресії <i>gus</i> гену.....	49
3.5. Вирощування T ₁ покоління 13 ліній трансгенних рослин N. Tabacum.....	52
3.6. Гістохімічне визначення присутності гену β-глюкуронідази в T ₁ поколінні трансформантів.....	53
3.7. Опрацювання аналізу рівнів водорозчинного білку.....	54
3.8. Вивчення результатів флуориметричного дослідження.....	54
РОЗДІЛ 4. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗРОБКИ.....	56
4.1. Резюме.....	56
4.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища.....	60
4.3. Визначення ключових факторів успіху проекту.....	65
4.4. Визначення потенційних споживачів.....	66
4.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку.....	69
4.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту.....	75
4.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними.....	77
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ.....	85
ВИСНОВКИ.....	96
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	97

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
п. н.	пара нуклеотидів
Т-ДНК	ділянка ДНК агробактерій, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації (від англ. Transferred DNA)
ЦТАБ	цетрилтриетиламоній бромід
2,4-Д	2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
<i>bar</i>	ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази
<i>GUS</i>	білок β -глюкуронідаза
<i>gusA</i>	ген β -глюкуронідази
<i>hpt</i>	ген гігроміцинфосфотрансферази
<i>nos</i>	ген нопалінсинтетази
<i>nptII</i>	ген неоміцинфосфотрансферази II
<i>NPTII</i>	неоміцинфосфотрансфераза II
<i>ocs</i>	ген октопінсинтетази
RB, LB	правий та лівий повтори, які обмежують Т-ДНК
Tris	трис-(гідроксиметил)-амінометан
X-Gluc	5-бром-4-хлор-3-індолілглюкуронід
4-MU	4-метилумбеліферон (4-methylumbelliferone)
4-MUG	4-метилумбеліферил- β -D-глюкуронід (4-Methylumbelliferyl- β -Dglucuronide)
35S	послідовність ДНК, що кодує транскрипт 35S вірусу мозаїки цвітної капусти
3',5'UTR	3',5' ділянки, що не транслюються

ВСТУП

XXI століття називають «золотим сторіччям» біології. Це стосується і одного з її напрямів – біотехнології. Біотехнологія вивчає застосування біологічних об'єктів та хімікобіологічних процесів з метою отримання різноманітної продукції для вирішення народногосподарських проблем. Власне, ще з давніх часів людство використовує окремі біотехнологічні процеси у різних сферах практичної діяльності таких як: виробництво сирів, напоїв і тд. Однак лише з 70-х років минулого сторіччя біотехнологія як самостійна наука сформувалась на базі молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії, широкого використання методів мікробіології, біохімії, та інших наук [1].

Перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності від одержання їжі і напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів обумовлена їх компактністю й одночасно масштабністю, високим рівнем механізації й продуктивності праці [2].

Генетична інженерія – це напрямок біотехнології, що займається дослідженнями з перебудови геномів. Генетична інженерія використовує методи молекулярної біології і генетики, пов'язані з цілеспрямованим конструюванням нових, не існуючих у природі, сполучень генів. Технологія рекомбінантних ДНК зв'язана з біохімічними і генетичними методиками зміни хромосомного матеріалу, у результаті чого вдається одержувати такі геноми, що природним шляхом навряд чи могли б виникнути [3].

Саме завдяки величезній практичній важливості генетичної інженерії або, як її інакше називають, технології рекомбінантної ДНК, її розвитку в усьому світі приділяється величезна увага. Важливим є розвиток і сучасні напрями біотехнології взагалі і сільськогосподарської біотехнології зокрема [3].

В останні роки біотехнологія стає одним із новітніх інструментів сільськогосподарських досліджень. У поєднанні з традиційною практикою селекції рослин вона робить внесок у створення генетично змінених рослин та

підвищення їх продуктивності. Біотехнологічні підходи доповнюють традиційні методи селекції внаслідок скорочення часу та мають потенціал необхідний для виведення сортів із поліпшеними характеристиками [4].

Передумовою розвитку генетичної інженерії рослин стали процеси, що відбуваються в природі без участі людини. Природним чином трансформація рослин здійснюється за допомогою ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* [5].

Метою роботи було дослідити вплив різних промоторів та бактеріальних штамів на експресію гена β -глюкуронідази в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Об'єкт дослідження – T_1 покоління трансформованих рослин та вивчення експресії перенесених генів, визначення зв'язку між інтенсивністю експресії та будовою векторів для трансформації, а також штамів *Agrobacterium tumefaciens*, які використовувалися в експерименті.

Предмет дослідження – експресія гена β -глюкуронідази під контролем різних промоторів в трансгенних рослинах тютюну, отриманих за допомогою різних штамів *Agrobacterium tumefaciens*.

Метод дослідження – детекція трансгена методом ПЛР, гістохімічне визначення, визначення кількостей загального білку за методом Бредфорта, флуориметричне дослідження активності β -глюкуронідази в трансгенних рослинах покоління T_1 .

Завдання:

- Провести огляд літературних джерел про існуючі методи генетичної трансформації рослин;
- Отримати покоління T_1 рослин з насіння трансформованих регенерантів T_0 та підтвердити наявність гену інтересу методом полімеразної ланцюгової реакції;
- Дослідити експресію репортерного гену β -глюкуронідази шляхом гістохімічного аналізу;

- Провести кількісну оцінку рівня загального розчинного білку за методом Бредфорта та ферменту β -глюкуронідази використовуючи флуорометричне визначення;
- Провести економічні розрахунки на навести заходи та засоби охорони праці та природнього навколишнього середовища.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Розвиток генетичної інженерії рослин

Генетика як наука зародилася ще у XIX столітті. Генетика (від грец. *genesis* – походження) – наука про закони спадковості та мінливості організмів і методи управління ними.

Основи генетики закладені Г.І. Менделем, який відкрив закони дискретної спадковості (1865) і школою Т.Х. Моргана, який обґрунтував хромосомну теорію спадковості (1910-і роки). Генетика включає ряд галузей. Основні розділи генетики залежно від об'єктів дослідження: генетика мікроорганізмів, рослин, тварин і людини. Спадковість і мінливість базується на спадкоємності, видозмінності складних внутрішньоклітинних структур.

Свого бурхливого розвитку генетика набула, починаючи з 1953 року, завдяки відкриттям Френсіса Кріка (Великобританія) і Джеймса Уотсона (США), які показали, що біологічна функція ДНК – відтворення, копіювання і передача спадкової інформації – обумовлена її просторовою будовою і хімічним складом.

Виникнення генної інженерії, як нового напрямку біотехнології, відносять до 1970–1972 рр., коли появились нові розробки з виділення генів, їх хімічного синтезу, введення їх у живі клітини і геном клітин [6].

Відлік історії генетичної інженерії рослин прийнято вести з 1982 р., коли вперше були отримані генетично трансформовані рослини. Метод трансформації був заснований на природній здатності бактерії *Agrobacterium tumefaciens* генетично модифікувати рослини. Спочатку трансформація застосовувалася для генетичної інженерії дводольних рослин, а потім цей метод застосували і для однодольних. Іншим широко розповсюдженим методом трансформації є технологія, заснована на обстрілі тканини мікрочастинками золота (або інших металів), покритими ДНК [3].

Усі вирощувані з комерційною метою трансгенні сорти отримані за допомогою цих двох методів. Однак сучасний арсенал методів трансформації досить великий і, крім уже названих, включає ще і такі підходи як:

- ПЕГ-індуковане введення ДНК у голі клітини (протопласти);
- електропорація клітин;
- мікроін'єкції ДНК у клітини;
- проколювання клітин шляхом струшування їх у суспензії мікроглобок;
- опосередкована вірусами інфекція й ін. [3].

Генетична інженерія рослин – галузь біотехнологічних досліджень, що динамічно розвивається. Поставлені завдання є різноплановими та охоплюють дослідження, метою яких є суто фундаментальні роботи стосовно, наприклад, функціонування перенесених генів, а також прикладні дослідження, спрямовані на розроблення біотехнологій, результати яких можуть становити практичний та комерційний інтерес. До останніх слід віднести розроблення стратегій одержання біологічно активних сполук (БАС) із рослинної сировини з використанням біотехнологічних підходів та покращення с/г рослин. До цільових сполук належать як такі, що природно синтезуються в рослинах *in vivo*, так і невластиві для рослин (наприклад, тваринного або мікробного походження). Використання методів генетичної інженерії дає змогу значно підвищити рівень накопичення БАС [7].

Agrobacterium-опосередкована трансформація рослин є першим розробленим методом перенесення чужорідних генів. Вона базується на природній здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* та *Agrobacterium rhizogenes* родини *Rhizobiaceae* переносити частину свого генома до клітин рослин. Трансформація з використанням *Agrobacterium rhizogenes* є шляхом одержання культури «бородатих» коренів, у яких також відбувається накопичення БАС, причому досить часто у більшій кількості, ніж у вихідних рослин, що є наслідком перенесення до генома специфічних генів рослин або агробактерій, неспецифічного впливу перенесених генів тощо [7].

Трансформовані корені є потенційними продуцентами різних сполук, включаючи антиоксиданти, вторинні метаболіти та ін. Відбір найбільш продуктивних ліній «бородатих» коренів, які характеризуються швидким ростом та підвищеним рівнем накопичення БАС, культивування їх у

біореакторах є шляхом до створення біотехнологій отримання сполук із лікувальними властивостями. Вихідним матеріалом для трансформації можуть бути різні частини рослин, зокрема, стебло, сім'ядолі, листки тощо [7].

Практичне генно-інженерне удосконалення рослин відбувається за тими ж напрямками, за якими проводиться селекція тієї чи іншої культурної рослини. Основними серед них є збільшення продуктивності, покращення якості врожаю та продуктів, які з нього виробляються, підвищення стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів, адаптація до промислових технологій виробництва цільових продуктів з рослинної сировини та інші. Означені напрямки у теперішній час мають різний ступінь розробленості [8].

1.2. Способи перенесення чужорідних генів

Відповідно до способів, які використовують для перенесення чужорідних генів у клітини, виокремлюють методи соматичної гібридизації та генетичної трансформації.

Гібридизація соматичних клітин дозволяє створювати нові комбінації батьківських геномів у вищих рослин, зокрема, цим шляхом можна отримати: а) гетерозиготні по внеядерним генам рослини; б) рослини з ядром одного, а цитоплазмою іншого виду; в) рослини, що несуть стабільний набір деяких внеядерних генів одного батька плюс набір внеядерних генів іншого. Отримати такі комбінації за допомогою звичайного статевого схрещування дуже важко або взагалі неможливо [9].

Оскільки процес соматичної гібридизації пов'язаний з об'єднанням різних клітин, у тому числі віддалених видів, то для визначення генетичної конституції отриманих гібридів необхідно враховувати сегрегацію хромосом під час перших розподілів гібридних клітин, розподіл рекомбінацію хлоропластів, мітохондрій і інших клітинних органел.

Одержання гібридів (або цибридів) шляхом злиття соматичних клітин, на відміну від статевої гібридизації, відбувається в асептичних умовах.

Генетичний статус гібридів може бути модифікований у результаті змін, що часто зустрічаються при культивуванні клітин і тканин. Процеси злиття, формування гібридних колоній клітин і регенерації рослин достатньо тривалі для здійснення цих змін [10].

Метод генетичної трансформації включає трансформацію, опосередковану бактеріями роду *Agrobacterium*, та пряму трансформацію, при якій перенесення генів здійснюється напряму, без бактерій-посередників.

До методів прямої трансформації відносять, зокрема, ПЕГ-індуковану трансформацію, мікроін'єкцію ДНК, електропорацію, біолістичну трансформацію.

Уперше ПЕГ-індуковану трансформацію було використано для трансформації протопластів тютюну [11].

За допомогою цього методу Li зі співавторами [12] трансформували гриби *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* та *Pleurotus ostreatus*, Gietz зі співавторами [13] клітини дріжджів. Авторами Yen-Chun Liu та Luis Vidali [14] трансформовано протопласти моху *Physcomitrella patens*.

Також авторами [14] зазначено, що ПЕГ-індукована трансформація, не вимагає спеціального обладнання, і її можна проводити в будь-якій лабораторії за допомогою стерильного бокса. Через свою простоту, ефективність і відтворюваність, цей метод може застосовуватися як для проектів, що вимагають великої кількості трансформантів, так і для рутинних перетворень.

Метод мікроін'єкції ДНК за допомогою тонких мікроголок і мікроманіпулятора дозволяє вводити в клітину або безпосередньо в ядро векторну ДНК із включеною чужорідною ДНК. При застосуванні мікроін'єкцій було здійснено трансформацію у дрозофіли та вищих рослин (ячменю, капусти). Метод був розроблений на початку 1970-х рр. А. Андерсоном і Г. Діакумакосом і дає невеликий вихід трансформованих клітин. Основною перевагою цього методу є можливість вводити будь-яку ДНК у різноманітні клітини. Крім того, для відбору трансгенних клітин не потрібно застосовувати селективний тиск [15].

Однак, робота з трансформації шляхом мікроін'єкцій є кропіткою та трудоємною, через що метод не знайшов широкого розповсюдження.

Метод електропорації може бути застосований для трансформації як ядерної, так і хлоропластної ДНК [16].

Перенесення генів відбувається, коли до розчину, що містить протопласти та ДНК, подається електричний імпульс високої напруги [17].

У результаті електропорації молекули ДНК поглинаються клітинами через пори в клітинній мембрані.

Даний метод був використаний для трансформації протопластів моркви, тютюну та кукурудзи [17], діатомових водоростей *Phaeodactylum tricornutum* [18], ціанобактерій *Microcystis aeruginosa* PCC7806 [19]. Шляхом електропорації було здійснено перенесення генів в інтактні клітини зиготичних зародків пшениці без будь-якої спеціальної попередньої обробки [20].

Біологічна балістика – один з найефективніших методів трансформації однодольних і хвойних рослин (в які не вдається ввести чужорідну ДНК за допомогою агробактерій), а також трансформації тваринних клітин. Метод базується на напилюванні рекомбінантної ДНК на мікрочастинки золота або вольфраму (діаметр часток 0,6-1,2 мкм), якими бомбардують клітини.

Бомбардування здійснюють при допомозі генної гармати під тиском або під дією електричного розряду. За достатньої швидкості ці частинки можуть безпосередньо проникати в ядро доставляючи чужинну ДНК [15].

Одним з перших успіхів за допомогою цього методу було перенесення чужорідних генів в інтактні клітини кукурудзи суспензійної культури сорту Black Mexican Sweet [21, 22].

Бомбардування частками часто використовується для трансформації злаків використовуючи незрілі зародки як експланти [23] і є єдиним ефективним методом трансформації хлоропластного геному [21].

За допомогою генної гармати були трансформовані однодольні рослини і отримані стабільні рослини-трансформанти, зокрема, кукурудзи, рису, пшениці, ячменю [15].

Дослідження авторів [24] показало, що бомбардування металевими мікрочастинками корисно для аналізу експресії чужорідних генів у цілісних, повністю розвинених тканинах, однак у рослин, трансформованих цим методом прямого перенесення генів, часто виявляють велику кількість копій та значну перебудову чужорідної ДНК.

Інтеграція занадто великої кількості копій одного і того ж гена в геном рослин зазвичай призводить до замовчування генів. Крім того, було виявлено, що послідовності введеного гена вкорочені, що робить аналіз трансгена важким і небажаним. Тільки фрагменти ДНК розміром менше 10 т.п.н. можуть бути перенесені за допомогою біолістичної технології, тому що великі фрагменти руйнуються під час бомбардування або погано прилипають до металевої частинки, що призводить до безладних подій інтеграції ДНК [21].

Хоча бомбардування частками може забезпечити високу ефективність трансформації, генні гармати недоступні для багатьох лабораторій, і протокол трансформації важко стандартизувати [14]. Крім того, успішне бомбардування частками вимагає встановлення оптимальних фізичних та біологічних параметрів під час трансформації та використання відповідних маркерів та промоторів [25].

Отже, метод бомбардування мікрочастками (біолістична трансформація) є досить універсальним та простим у застосуванні, хоча і вимагає наявності спеціального обладнання (біогармати). Він не є видоспецифічним та може бути застосований для трансформації різних видів, родин, класів. Біолістична трансформація може бути використана для отримання трансгенних рослин в тому випадку, коли, наприклад, для рослин класу однодольних, неможливе використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [16].

Однак, нині найбільш використовуваним все ж таки є опосередкований метод перенесення генів з використанням бактерій роду *Agrobacterium* через його доступність та простоту застосуванні [16].

1.3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація

Здатність вірулентних штамів *Agrobacterium* індукувати ріст пухлини та синтез опіну, а також здатність використовувати опіни надається резидентною індукуючою пухлини плазмідною (Ті-плазмідом). Під час процесу колонізації сегмент ДНК з цієї плазмиди, який називається перенесеною ДНК (Т-ДНК), переноситься в ядерний геном рослини. Т-ДНК кодує ферменти, які синтезують ауксини та цитокініни, що призводить до нерегульованої проліферації клітин, та ферменти, які синтезують опіни із стандартних амінокислот [26].

Плазмідом Ті є природним вектором для трансформації рослин, але Ті-плазмідом дикого типу не є придатними векторами для генетичної інженерії у рослин, оскільки вони занадто великі, щоб маніпулювати ними, а онкогени, що містяться в Т-ДНК, викликають неконтрольоване розмноження трансформованих рослинних клітин та запобігають ефективній регенерації. Тому Т-ДНК потрібно перемістити до меншого, зручного вектора та обеззброїти, видаливши онкогени. Маркерний ген також повинен бути включений, щоб мати змогу визначити чи трансформованими є клітини. Передача Т-ДНК контролюється приблизно 30 генами, розташованими в окремій вірулентній (*vir*) області плазмиди Ті, і вони повинні надходити в транс-положення, використовуючи двійкову векторну систему, якщо Т-ДНК розміщують на меншій плазміді. Сучасні бінарні вектори містять безліч унікальних сайтів клонування всередині Т-ДНК, маркерний ген *lacZ* для синьо-білої селекції рекомбінантів та вибір селективних маркерів для ідентифікації трансформованих рослинних клітин [27].

Передача Т-ДНК опосередковується продуктами гена *vir A* та *virG*, які трансдукують зовнішні сигнали та активують інші гени *vir*, що призводить до побудови пілусу для переносу ДНК та вивільнення Т-ДНК за допомогою ендонуклеази, що включає продукти гени *v/Hdl* і *vt'/D2*. Це вводить або одноланцюговий, або дволанцюговий розрив на 25-бітних кордонах Т-ДНК. Існує думка, що утворена проміжна речовина (дво або одноланцюгова Т-ДНК) може залежати від функцій вірулентності, характерних для штаму

Agrobacterium [28]. Або ліва, або права послідовність кордону може ініціювати перенесення Т-ДНК, хоча більш звичною є ініціація, що відбувається на правій межі через наявність сусідньої послідовності овердрайву, яка розпізнається білками *VirC1* та *VirC2* і діє як підсилювач переносу [29]. З цієї причини видалення правої межі Т-ДНК [30] суттєво знижує ефективність передачі, тоді як видалення лівої межі має незначний ефект [20].

Розробка відповідного методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації – дуже складне завдання, бо важливо зрозуміти вплив усіх чинників, задіяних у процесі доставки Т-ДНК у клітини, з яких може бути регенерована рослина. Після регенерації необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та стабільності Т-ДНК і підвищення ефективності трансформації. Визначено кілька чинників, які впливають на ефективність доставки Т-ДНК: первинні експлантати; штами *Agrobacterium*, векторні плазмиди, щільність суспензії клітин *Agrobacterium*, склад живильних середовищ; умови трансформації, такі як температура і час прекультивування, інокуляції, кокультивування; наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні; антибіотики чи селективні маркери тощо [31].

З використанням *Agrobacterium tumefaciens* було трансформовано надзвичайно широку групу організмів, включаючи численні дводольні та однодольні покритонасінні та голонасінні. Крім того, *Agrobacterium* може перетворювати гриби, включаючи дріжджі, аскоміцети та базидіоміцети [26].

Біологічний спосіб доставки ДНК за допомогою *Agrobacterium* має переваги в інтеграції: дає змогу вводити порівняно велику генетичну конструкцію, забезпечує включення в геном реципієнта обмеженого числа копій чужорідного гена з високою ефективністю і мінімальними порушеннями в його послідовності, що зазвичай відбувається за фізичного способу доставки ДНК, потенційно спричинює менше проблем, пов'язаних з косупресією й нестабільністю трансгена [31].

1.4. Будова векторів для трансформації

При побудові векторів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації як правило залишають тільки повтори правого та лівого бордерів, які складаються з 25 п.н., а решту частину замінюють генами, цікавими для дослідження. Т-ДНК вектору зазвичай містить ген інтересу та маркерні селективний або репортерний гени, які знаходяться під контролем різних регуляторних послідовностей.

Початкові етапи генетичної трансформації включають доставку касети гена в клітини-реципієнти з подальшим аналізом експресії гена, що доставляється. Результати таких подій можна виявити аналізом експресії репортерного гена, введеного в культуру рослинних клітин або тканин.

Репортерні гени виявляють видимий ефект прямо або опосередковано, що пов'язано з їх активністю в трансформованих клітинах. Аналіз експресії репортерних генів не потребує інтеграції трансгена в геном хазяїна, зазвичай його використовують для тестування промотора і функцій гена.

Неоднакова частота доставки ДНК у клітини різних експлантів потребувала розробки методів для ефективного відбору клітин, які несуть і експресують введені послідовності генів.

Методи відбору трансформованих клітин ґрунтуються на експресії гена (селективного маркера), продукт якого надає стійкості до цитотоксичних речовин [31].

Селективні маркерні гени використовуються для ідентифікації клітин, які включили Т-ДНК з маркерним геном та геном, що представляє інтерес при генетичній трансформації експлантів, а також для моніторингу трансформаційних подій у наступних поколіннях [21].

Найбільш часто використовувані селективні маркери включають гени стійкості до антибіотиків, такі як неоміцин та гігроміцин фосфотрансферази, гени стійкості до гербіцидів, такі як N-ацетилтрансфераза фосфінотрицину та ацетолактатсинтази, та гени, пов'язані з метаболізмом, такі як фосфоманноза ізомераза. Ці маркерні гени були прийняті для широкого використання через їх

ефективність та загальну придатність для широкого кола видів та систем культури тканин. Рідше застосовуються додаткові селективні маркери, пов'язані з метаболізмом, такі як ізомераза ксилози, трегалоза-6P-синтаза та протопорфіриноген-оксидаза. Для функціонування у різноманітних типах клітин селектировані маркерні гени будуються як химерні гени, включаючи регуляторні послідовності, що забезпечують конститутивну експресію у всій рослині [21].

1.5. Нуклеотидні послідовні регуляції генів у генетично модифікованих рослинах

1.5.1. Промотори

Промотор відноситься до області в послідовності генома перед початком ділянки транскрипції гена, яка контролює рівень експресії гена та тип специфічності, тобто конститутивний, індукційний, специфічний для тканини або регульований у розвитку [32].

Промотори направляють експресію трансгенних клітин у рослинах кількісно, просторово та часово. Правильний підбір промотору відображається специфічним кінцевим застосуванням трансгену, найчастіше виробництвом рекомбінантного білку або захистом рослин [33].

У трансгенних дослідженнях промотори використовуються для стимулювання експресії селективного маркера для відбору трансформованого калюсу та пагонів під час процедури трансформації, для прослідкування сегрегації T-ДНК з геном інтересу у наступних поколіннях, та для визначення та підвищення рівня експресії і специфічності гена [21].

Незважаючи на велику кількість охарактеризованих за останні роки регуляторних послідовностей, для забезпечення конститутивної експресії найчастіше використовують промотори, що походять від прокариот, які є рослинними патогенами. Так, широке застосування знайшли промотори гену нопалінсинтетази (*nos*) та октопінсинтетази (*ocs*) ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, які були використані у перших векторах для

генетичної трансформації рослин. При подальшому дослідженні з'ясувалось, що *nos* промотор не завжди забезпечував високий рівень експресії трансгену, а його активність посилювалась під впливом ауксинів, а також саліцилової кислоти, метилжасмонату та перекису водню. Схожі результати були отримані і для *ocs* промотора. Іншим джерелом промоторів стали віруси рослин [34].

Конститутивні промотори

Конститутивні промотори є найбільш розповсюдженими серед усіх цих категорій, і більшість походять від рослинних вірусів. Ранні роботи, засновані на розумінні зараження рослинами та реплікації, виявили довгі міжгенні регіони, які функціонували як промотори в клітинах рослин. Ці міжгенні області сприяють експресії вірусних капсидних білків та апарату реплікації. Найбільш визнаним членом цієї групи промоторів є *CaMV 35S*, який контролює синтез вірусу мозаїки цвітної капусти [33].

Промотор *CaMV 35S* – промотор вірусу цвітної капусти забезпечує зразкову промоторну систему ядерних рослин, оскільки його дволанцюжковий геном ДНК транскрибується ядерною РНК-полімеразою II господаря з мініхромосоми *CaMV2*. Крім того, промотор 35S не виявляв тканинної специфічності експресії [35].

Попри широке застосування, промотор *CaMV 35S* погано працює у однодольних, таких як кукурудза [36, 37], але вплив посилюється додаванням нижчого інтрону в межах 5' UTR [33].

Конститутивні промотори

Конститутивні промотори сприяють підвищенню рівня експресії генів у всіх типах клітин протягом усього періоду росту та розвитку і використовуються для надмірного продукування білків, що представляють інтерес, для вивчення їх функції в базових дослідженнях або для отримання перспективних рослин або насіння для агрономічних цілей. Ген 35S *CaMV* [35] забезпечує високу трансгенну експресію у більшості типів клітин, крім пилку, не залежить від умов навколишнього середовища, добре характеризується та активний у різних однодольних та дводольних рослин [38]. Промотор

кукурудзи *Ubi-1* походить від конститутивно експресованого гена убікітину [39] і, як правило, використовується в зернових культурах [23]. Інші сильні конститутивні промотори з великим потенціалом у біотехнологіях рослин виявлені в генах актинів рису *OsAct1* та *OsAct2* [40], у факторі подовження дистахіону брахіподіуму та генах убікітину *BdEF1a* та *BdUBI10* [41, 42], а також у генах убіквітину *Switchvist (Panicum virgatum) PvUbi1* та *PvUbi2* [43, 21].

Органічні, тканинні, доменні або клітинноспецифічні промотори

Конкретні промотори використовують, коли експресія трансгену потрібна у певному місці та/або в певний час у розвитку, щоб генерувати конкретні фенотипи та уникати несприятливих наслідків для росту або врожайності рослин. Було виявлено кілька ендосперм-специфічних промоторів, які експресують поодинокі або, навіть, множинні ферменти біохімічних шляхів або для розкриття метаболічного шляху, або для поліпшення якості харчових насінин [44, 41].

Інші промотори використовувались для базових або біотехнологічних досліджень, наприклад, промотор, специфічний для *Tapetum TA29*, який успішно застосовувався для генерації чоловічої стерильності у ріпаку [45]. Промотор *API API*-типу квіткового гена А-типу [21].

Індуцибельні промотори

Індуцибельні промотори спеціально активуються у відповідь на зовнішні подразники. На відміну від конститутивних промоторів, злиті трансгени можуть експресуватися на певній стадії розвитку протягом певної тривалості або в певній тканині. Крім того, промотори неактивні за відсутності індукторів і, отже, не мають негативного впливу на розвиток рослин. Активність промотору може бути індукована хімічними факторами, такими як тетрациклін, етанол, стероїди, іони міді та гербіциди, або фізичними факторами, такими як тепло, холод та світло. Промотори, які реагують на специфічні хімічні сполуки, яких природно не знайдено в організмі, представляють особливий інтерес у генній інженерії через простоту маніпуляцій. Коротко описані деякі з найбільш

часто використовуваних хімічно індукованих промоторів у рослинах [47].

Тетрацикліни особливо привабливі як індуктори експресії генів, оскільки це невеликі ліпофільні сполуки, які легко потрапляють в клітини еукаріотів за допомогою пасивної дифузії, і вони зазвичай використовуються як у людській, так і у ветеринарній медицині із незначними побічними ефектами. Система, що індукується тетрацикліном, складається з трьох основних компонентів: репресора транскрипції, оператора, що реагує на тетрациклін, та антибіотика з сімейства тетрациклінових [21].

Система, індукована тетрацикліном, успішно використовується для отримання цінних фармацевтичних або промислових білків у культуральних суспензійних культурах рослин [48]. У стероїдно-індукованих системах гетерологічні білки зливаються з рецептором глюкокортикоїдів або естрогенів та індукуються стероїдами. Система, індукована стероїдами на основі глюкокортикоїдних рецепторів, значно вдосконалила розуміння функції факторів транскрипції рослин, які контролюють шляхи розвитку рослин [49, 50].

Система експресії гена, що індукується етанолом, походить від ниткоподібного гриба *Aspergillus nidulans* і складається з двох елементів: спирторегульованого фактор транскрипції (ALCR), який пов'язує промотор, отриманий з *alcA*, який регулює експресію трансгену [51]. Система, що індукується етанолом, оптимізована для виробництва білків у рослинах [52, 21].

Бази даних для послідовностей промоторів рослин

Функціональний аналіз генів у трансгенних рослин часто вимагає відбору промоторів з відповідними моделями активності. Промотори, які зазвичай використовуються у векторах, дуже обмежені і забезпечують лише незначні зміни в моделях експресії генів.

Наразі, із збільшенням кількості секвенсованих геномів рослин, стало необхідним розробити надійний обчислювальний метод виявлення нових рослинних промоторів. На сьогоднішній день доступний широкий спектр програм для прогнозування промоторів [15]. Серед них наступні.

PlantPAN (Navigator Analysis Promoter Analysis Navigator) [53] – система баз даних, PlantPAN (Navigator Analysis Promoter Analysis Navigator), для розпізнавання комбінаторних елементів *cis*-регуляції з обмеженням відстані в наборах рослинних генів.

GRASSIUS (Grass Regulatory Information Services) [54] – веб-ресурс, заснований на знаннях, який інтегрує інформацію про фактори транскрипції та промотори генів у травах.

PlantCARE [55] – це база даних про рослинні *cis*-активні регулюючі елементи, підсилювачі та репресанти. Регулюючі елементи представлені позиційними матрицями, консенсусними послідовностями та окремими сайтами на певних промоторних послідовностях.

TransGene Promoters (TGP) [56] – база даних промоторів рослин, яка містить інформацію про сегменти геномної ДНК, що забезпечує певні моделі експресії репортерних генів в експериментах з трансгенними рослинами.

Однак промотори, визначені програмами прогнозування, повинні бути перевірені за допомогою репортерних генів під час розвитку рослин та під різними стимулами, щоб застосувати їх у трансгенних дослідженнях [21].

1.5.2. Ділянки, що не транслюються

5' та 3' UTR

5'UTR знаходиться безпосередньо вище від трансляційного кодону ініціації в мРНК і може відігравати значну роль у транскрипції та трансляції. Включення інтрону з властивостями ІМЕ до 5'UTR трансгену може мати позитивний вплив на накопичення мРНК, як зазначено в попередньому розділі. 5'UTR, отримані з високоекспресуючих генів, таких як ген кукурудзи *Ubi1*, рису *Ubi3* і рисовий актин; зазвичай використовуються для експресії гетерологічних генів кукурудзи, особливо у поєднанні з їх природними промоторами. Окрім впливу 5'UTR на транскрипцію, ці регіони можуть також включати трансляційні підсилювачі, що призводять до більш високих рівнів накопичення білка. Механізм цього посилення пов'язаний з покращеним

ініціюванням трансляції та безпосередньо пов'язаний з тим, наскільки ефективно рибосоми можуть сканувати та розпізнавати трансляційний (ATG) стартовий кодон. На це впливає вторинна структура, а також контекст навколо стартового кодону ATG. Описано послідовність консенсусу Козака щодо рослин: 5'-ACN₂, AAN₃, (A/T)T(A/C) AACAAATGGC-3', який присутній відразу ж поруч з трансляційним стартовим кодоном ATG з високоекспресованими генами однодольних та дводольних рослин [57]. Ця послідовність дуже подібна до послідовності, описаної у [58], що складається з 5'-AAAAACA(A/C)AATGGCG-3'. Обидві послідовності відзначаються високим вмістом А/Ц перед ATG, що, як очікується, утворює менш стабільну вторинну структуру та сприяє більш ефективному скануванню рибосом через UTR [57].

Лідерні послідовності рослинних вірусів часто використовувались як джерело посилення трансляції. Ці послідовності, як правило, пов'язані з промоторами, такими як *CaMV 35S* та вірус травлення тютюну (TEV), які контролюють експресію вірусних білків капсиду/оболонки, які в значній мірі експресуються в рослинах за допомогою трансляційних механізмів господаря. UTR *CaMV 35S* 5'UTR довжиною 73 п.н. забезпечував 35-кратне збільшення активності люциферази порівняно з нативним промотором люциферази в поєднанні з промотором *CaMV 35S* у перехідних аналізах [59].

Комбінація *CaMV 35S* з 5'UTR, отриманим з TEV, була ефективною для направлення експресії селективного маркера у рослин кукурудзи [60].

Демонстрація того, що рослинний каулімовірусний промотор, отриманий від вірусу згортання жовтого листа *Cestrum* [61], є функціональним у кукурудзі і може забезпечити сильну конститутивну експресію трансгену, доводить, що він також може містити компоненти трансляційного підсилення.

Поєднання ІМЕ або 3' UTR з трансляційними підсилювачами може бути ефективною стратегією максимізації експресії чужорідного білка в кукурудзі, як продемонстрували у роботі [62] з використанням тютюну та рису та у роботі [63] у *Arabidopsis*.

3'UTR зазвичай функціонує для забезпечення сигналів для поліаденилювання та стабільності мРНК і є основною передумовою експресії трансгену. Вибір 3'UTR може впливати на рівень стійкого стану мРНК в залежності від того, чи містять ці регіони багаті на A/U сигнали дестабілізації [64], що призводять до швидкої деградації мРНК, чи здатні вони сформувати міцний каркас – петльові структури, які захищають РНК від деградації 3'РНК-азами. Три основні цис-діючі елементи в межах 3'UTR необхідні для ефективного припинення транскрипції та поліаденилювання: дальні елементи ланцюга, ближні елементи та сайти розщеплення [65]. 3'UTR від генів, які сильно експресуються і накопичуються до високих рівнів у різних видів рослин, ефективні для експресії трансгенів у кукурудзі. Зазвичай використовувані 3'UTR в кукурудзі включають *Pin II* термінатор картопляної протеази II, термінатор *Nos* (нопалінсинтетаза) від *Agrobacterium* та термінатор *35S*, отриманий із транскрипту *CaMV 35S*. Крім того, термінатор *ORF25* від *Agrobacterium* та термінатор пшениці (Ta) *hspl7* використовуються як компоненти генних касет, призначених для ІЧ. Було продемонстровано, що термінатор *pinII* сприяє підвищенню стабільності мРНК [66]. Здатність термінатора збільшувати рівень мРНК у касеті експресії чужорідного гена корелює з їх здатністю ефективно припинити транскрипцію за наявності сильних полі (A) сайтів [67]. Посилення експресії гетерологічних генів за допомогою 3'UTRs було продемонстровано у багатьох видів рослин [68, 69, 70, 63, 33].

1.5.3 Репортерні гени

Репортерні гени, також звані скринінговими або оцінюваними маркерами, являють собою гени, які кодують білки, які можуть бути виявлені безпосередньо, або каталізують специфічні реакції з легко виявлюваними продуктами. Вони особливо корисні для аналізу активності промоторів, вивчення локалізації білків та/або їх взаємодії. Ідеальна генетична репортерна система повинна бути виявлюваною *in situ*, чутливою, кількісною, швидкою,

відтворюваною, безпечною і з низькою ендогенною фоновою активністю або без неї. β-глюкуронідаза (*GUS*), люцифераза (*LUC*), зелений флуоресцентний білок (*GFP*) і антоціанін є найбільш часто використовуваними репортерними генами в дослідженнях рослин (табл. 1.1) [21].

Таблиця 1.1 – Найбільш часто використовувані репортерні гени в дослідженнях рослин [21]

Ген	Субстрат-Фермент	Походження	Дія	Посилання
<i>NPT II</i>	Неоміцин, канаміцин, генетицин (G418) - паромоміцин <i>Escherichia coli</i> неоміцин-фосфотрансферази II	<i>Escherichia coli</i>	Інактивує деякі аміноглікозидні антибіотики шляхом фосфорилування	Fraley et al. (1983)
<i>HPT</i>	Гігроміцин-гігроміцин фосфотрансфераза	<i>Escherichia coli</i>	Інгібування білкового синтезу	Waldron et al. (1985)
<i>BAR, PAT</i>	Фосфінотрицин (PPT)-Фосфінотрицин-ацетилтрансфераза	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> , <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Ацетилювання PPT-конкурентного інгібітора глутамін-синтетази	De Block et al. (1989), Wohlleben et al. (1988)
<i>ALS</i>	Сульфонілсечовини та імідазолінони-ацетолактатсинтаза	Мутантна форма: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Malus domestica</i>	Мутантні ферменти ALS, нечутливі до гербіцидів	Olszewski et al. (1988)
<i>manA</i>	D-манноза - фосфоманозна ізомераза	<i>Escherichia coli</i>	Манноза, що використовується як джерело вуглецю	Joersbo et al. (1998)
<i>EGFP</i>	Немає - посилений зелений флуоресцентний білок	<i>Victoria aequorea</i> (modified from <i>GFP</i>)	Флуоресценція	Yang et al. (1996)

Ген	Субстрат-Фермент	Походження	Дія	Посилання
<i>GUS</i>	β-глюкуроніди - β-глюкуронідаза	<i>Escherichia coli</i>	Гідроліз β-глюкуронідів	Jefferson et al. (1987)
<i>LUC</i>	Люциферин-люцифераза	<i>Photinus pyralis</i>	Окисне декарбоксілювання люциферину	Ow et al. (1986)
<i>R & Cl</i>	Немає - R та Cl регулятори транскрипції антоціаніну	<i>Zea mays</i>	Накопичення антоціаніну у вакуолях клітин	Ludwig et al. (1990), Lloyd et al. (1992)

Зелений флуоресцентний білок (*GFP*) являє собою фотопротеїн, клонований з медузи *Aequorea victoria* [71, 72]. Це дуже стабільний білок, який автофлуоресціює в присутності ультрафіолетового або синього світла і не вимагає зовнішнього субстрату.

Дослідження [73] уперше показало, що *Aequorea GFP* дикого типу може бути візуалізований в рослинних клітинах як репортер *in vivo* експресії рослинних генів. Хоча *GFP* дикого типу успішно використовувався в дослідженнях експресії в рослинних клітинах і тканинах, він мав деякі недоліки, такі як аберрантний сплайсинг в рослинах і утворення цитотоксичних і нефункціональних агрегатів. Ефективна експресія в цілих рослинах була досягнута при модифікації *GFP*-кодуючої послідовності [74].

β-Глюкуронідаза (*GUS*) – це бактеріальний фермент, кодований геном *E. coli uidA (gusA)*, який зустрічається біля мікроорганізмів, хребетних і безхребетних, але не у більшості вищих рослин [75].

Він каталізує гідроліз широкого спектру β-глюкуронідів, таких як хромогенний гістохімічний 5-бром-4-хлор-3-індоліл-β-D-глюкуронід (X-Gluc), безбарвне з'єднання, яке перетворюється під дією β-глюкуронідази перетворюється на нерозчинне [21].

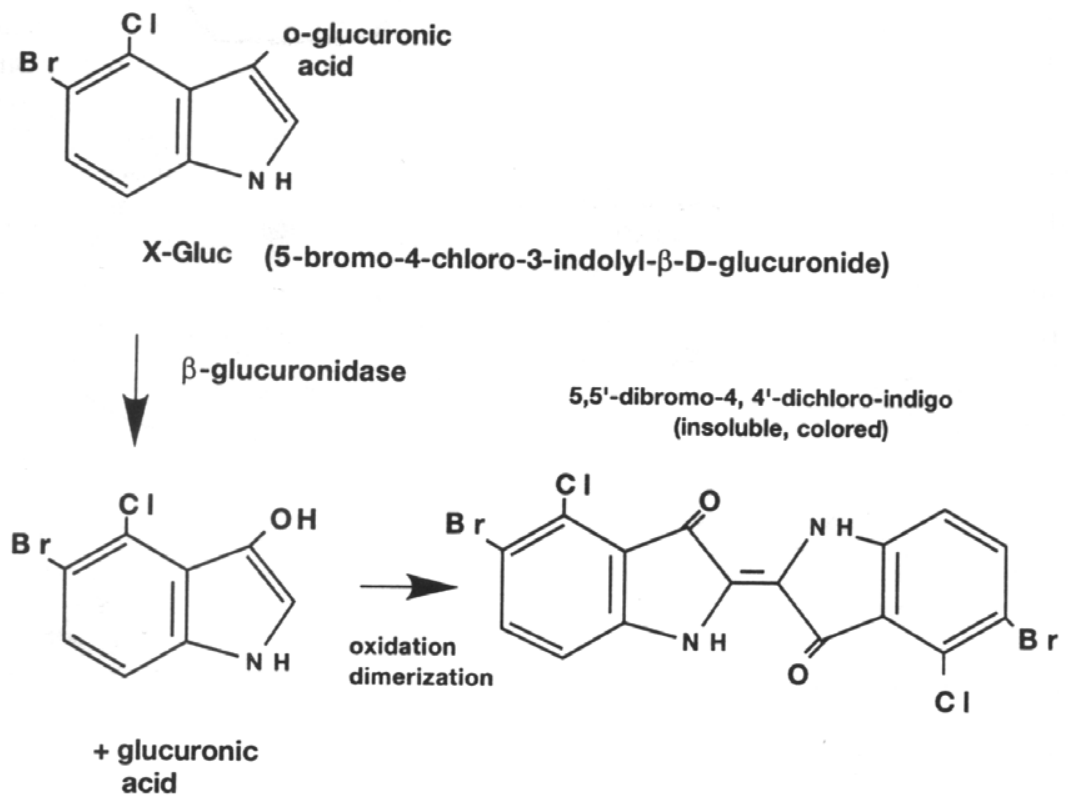


Рисунок 1.1. Реакція утворення забарвленого димеру для проведення гістохімічного методу (дибромодихлоріндіго).

X-Gluc або 5-бром-4-хлор-3-індол- β -D-глюкуронід розщеплюється β -глюкуронідазою з утворенням глюкуронової кислоти та хлорброміндіго. Димеризується хлорброміндіго з утворенням нерозчинного синього осаду дихлор-діброміндіго.

Він використовується для гістохімічної локалізації активності β -глюкуронідази *in situ* в клітинах і тканинах. Фермент *GUS* дуже стабільний в рослинах і нетоксичний при виробництві у великих кількостях [76], але аналізи є деструктивними.

Флуорогенний аналіз, в якому β -глюкуронідаза розщеплює субстрат 4-метил-умбелліферілглюкуронід (MUG) до синього флуоресцентного з'єднання, дозволяє кількісно визначити силу промотора [41].

Метод базується на вимірюванні кінетики накопичення 4-MU (4-метілумбелліферона), який утворюється в результаті розщеплення субстрату

4-MUG (4-метілумбелліферіл глюкуронід) ферментом β -глюкуронідазою. Кількість 4-MU можна обчислити за інтенсивністю його флуоресценції (збудження - 365нм, реєстрація - 455нм), так як в межах до 10мкмоль спостерігається лінійна залежність інтенсивності флуоресценції 4-MU від його кількості.

Активність β -глюкуронідази виражається в кількості 4-MU, що утворився за одиницю часу в розрахунку на мг загального розчинного білка і, як правило, має розмірність [нмоль * мин.⁻¹ * мкг⁻¹].

Репортерний ген люциферази (*luc*) походить від світлячка *Photinus pyralis* і кодує фермент люциферазу (*LUC*), який каталізує АТФ-залежне окислювальне декарбоксилювання люциферину, що призводить до порушеної форми окислюциферину та емісії світла.

Спалах світла вловлюється люмінометром, який вимірює інтегрований світловий потік. Загальна кількість світла, вимірена протягом заданого часового інтервалу, пропорційна кількості люциферазної активності в зразку [21].

Зазвичай світловий спалах гасне за секунди; підвищена інтенсивність світла і більш тривала світлова реакція були отримані при додаванні коферменту А в реакцію, що поліпшило реактивність і відтворюваність аналізу. Спочатку активність *LUC in vivo* визначали шляхом обприскування рослинних тканин субстратом люциферину і видавлювання його на плівку для впливу [77]; в даний час слабке світло репортера можна виявити за допомогою спеціалізованих камер.

Перевага репортерної системи *LUC* полягає в тому, що вона дозволяє здійснювати неруйнівний моніторинг патернів експресії генів, включаючи циркадні ритми, в реальному часі і з великою точністю [78, 79].

Крім того, аналіз люциферази дуже чутливий, і результати можна отримати протягом декількох хвилин.

Обмеження застосування *in vivo* були подолані за рахунок розробки розчинними формами люциферину, які забезпечують проникнення клітин.

Таким чином, *LUC* був використаний для вивчення активності репортерного гена *in vivo* в цілих організмах, таких як рослини, а також в окремих клітинах [21].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика реактивів

Для приготування розчинів та живильних середовищ використовували мінеральні солі, цукри та агар (Хімлаборреактив, Україна). Також у роботі були використані наступні реактиви:

- реактиви для молекулярно-біологічного аналізу:

1. Duchefa, Нідерланди: канаміцин.

2. Thermo Scientific, (EU), Латвія: дезоксинуклеотид трифосфати, Таq-полімераза.

3. Sigma, США: Агароза, бромістий етидій, ЕДТА, Triton X-100, ЦТАБ, ДСН.

4. Promega, Amersham: ферменти рестрикції.

- реактиви для гістохімічного та флуориметричного аналізу:

1. Duchefa, Нідерланди: X-Gluc, МЕС.

2. Sigma, США: 4-MU, 4-MUG.

3. Serva, ФРН: кумасі.

4. Loba Feinchemie, Австрія: меркаптоетанол.

У дослідженні були використані наступні живильні середовища:

- середовище LB (Lysogeny broth): пептон, дріжджовий екстракт, NaCl, агар [80];

- середовище Мурасіге і Скуга (МС) для трансформації рослин: солі МС, 5% сахароза, MES ("Sigma", США), манітол ("Sigma", США) та 0,1% Tween-20 ("Sigma", США), рН 5,7 [81].

2.2. Векторні конструкції та бактеріальні штами

Для генетичної трансформації рослин використовували векторні конструкції pCB203 (рис. 2.1), створений в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, і pICBV16 (рис. 2.2), який був люб'язно наданий компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

До складу вектору pCB203 входить репортерний ген β -глюкуронідази (*gus*) під контролем промотору та першого гена убіквітину кукурудзи (*Ubi1*) та селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що забезпечує стійкість клітинам рослин до гербіциду (Basta, Buster, Liberty виробництва Bayer Crop Science) (активна речовина L-фосфінотрицин), під контролем промотору бактеріального ферменту нопалін синтази.



Рисунок 2.1. Схематичне зображення T-ДНК вектору pCB203, який використовували в дослідженнях з *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації тютюну:

RB, LB – правий та лівий бордери T-ДНК; *nost* – термінатор гена нопалінсинтази; *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази; *nospro*- промотор гена нопалін синтази; *Ubi1*- промотор убіквітину кукурудзи; *gus* – ген β -глюкуронідази; *nos3'* – термінатор гена октопінсинтази

До складу вектору pICBV16 входить репортерний ген β -глюкуронідази (*gus*) під контролем *35S* промотору вірусу мозаїки цвітної капусти та селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) (рис. 2.2).

Тестування вектору проводили шляхом трансформації тютюну – модельного об'єкта біотехнології – методом листових дисків за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pICBV16 з використанням бактерії штаму *GV3101* та вектором pCB203, що знаходився в двох штаммах агробактерії: *GV3101* та *C58*.

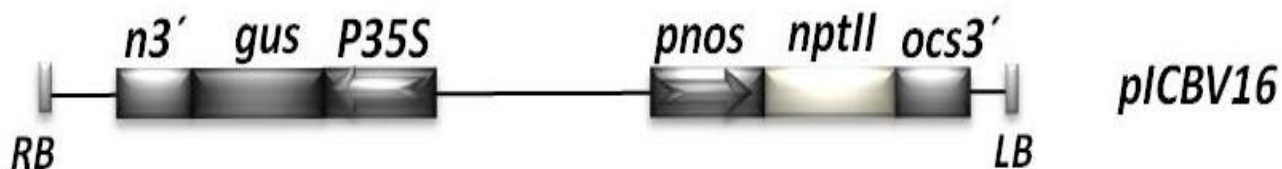


Рисунок 2.2. Схематичне зображення Т-ДНК вектору pICBV16, який використовували в дослідженнях з *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації тютюну:

RB, LB – правий та лівий бордери Т-ДНК; *n3'* – термінатор гена нопалінсинтази; *gus* – ген β -глюкуронідази; *P35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *pnos* – промотор гена нопалін синтази; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази; *ocs3'* – термінатор гена октопінсинтази

2.3. Трансформація *Agrobacterium tumefaciens* методом електропорації

Трансформацію *Agrobacterium tumefaciens* проводили методом електропорації відповідно до рекомендацій, що запропоновані у супровідних документах до приладу. Суспензійну культуру агробактерії штаму *GV3101* та штаму *C58*, що нарощувалась протягом ночі, осаджували центрифугуванням. Отриманий осад тричі промивали стерильною дистильованою водою, ресуспендували у невеликому об'ємі дистильованої води та фасували по 100 мкл у стерильні пробірки епендорф. До отриманих компетентних клітин агробактерії додавали 1-5 мкл плазмідної ДНК та проводили електропорацію.

Після цього до суспензії додавали 1 мл рідкого середовища LB [80] та інкубували при температурі 28⁰С протягом 6-ти годин. Отриману бактеріальну культуру висівали на агаризоване середовище LB, доповнене антибіотиком – канаміцином 100 мг/л та інкубували протягом 3-х діб в темноті при температурі 28⁰С.

Отримані на селективному середовищі агробактеріальні колонії переносили в рідке середовище з відповідними антибіотиками та вирощували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 28⁰С протягом 48 годин.

Для підтвердження факту пренесення ДНК вектору до агробактерії проводили виділення плазмідної ДНК з бактеріальної суспензії та її рестрикційний аналіз.

Отримані агробактеріальні лінії вирощували на рідкому середовищі LB з додаванням антибіотику – канаміцину 100 мг/л та 100 мг/л карбеніциліну при використанні бактерії штаму *C58* або 50 мг/л рифампіміцину, 25 мг/л гентаміцину та 100 мг/л карбеніциліну при використанні штаму *GV3101* при температурі 28⁰С протягом 48 годин.

2.4. Рослинний матеріал

Матеріалом для досліджень були рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) сорту Petit Havana, які вирощували *in vitro* на безгормональному середовищі MS при 24⁰С в режимі періодичного освітлення 16/8 годин (рис. 2.3).

Насіння тютюну було надано Банком зародкової плазми рослин світової флори Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.



Рисунок 2.3. Тютюн (*Nicotiana tabacum*) сорту Petit Havana, який використовувався у дослідженні.

Представники роду *Nicotiana* широко використовуються в біотехнології, і не лише завдяки наявності важливих сільськогосподарських ознак, але і як зручні модельні об'єкти, які дозволяють протягом 2-3 місяців отримати трансгенні рослини [34].

2.5. Генетична трансформація рослин, опосередкована *Agrobacterium tumefaciens*

Генетичну трансформацію рослин проводили методом «листових дисків» [30] за допомогою *Agrobacterium Tumefaciens* штамів *GV3101* та *C58*, які були трансформовані вектором pCB203 та вектором pICBV16 в бактерії штаму *GV3101*.

Застосування методу «листових дисків», за якого експлантами для трансформації слугують частини або цілі листки зі зробленими на них надрізами, є зручним способом генетичної трансформації багатьох рослин за допомогою бактерій роду *Agrobacterium tumefaciens*. Наявність такого методу трансформації дає змогу в досить короткий термін отримати трансформовані рослини та корені і не потребує додаткового обладнання [82, 83].

Важливо відзначити, що зрізи листових пластинок тютюну не містять у стані спокою преформованих зачатків органів і, отже, більшість пагонів, що формуються у краю зрізу, утворюються з дедифференційованих клітин, чутливих до трансформації агробактерій [80].

Спільне культивування сегментів асептичних рослин та розведеної суспензії *Agrobacterium tumefaciens* проводили протягом 24-36 годин, використовуючи розведення нічної культури у 3-4 рази. Для цього нічну бактеріальну культуру осаджували при 6 об/хв., 4⁰С протягом 10 хв. та ресуспендували у відповідному об'ємі рідкого середовища MS. До отриманої бактеріальної суспензії додавали ацетосирінгон до кінцевої концентрації 0,2 мМ та культивували протягом 2-ох годин на ротаційному шейкері (200 об./хв.).

Генетичну трансформацію тютюну проводили методом спільного культивування сегментів листків асептичних рослин з рідкою

агробактеріальною культурою протягом 30 хв. Після спільного культивування експланти просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на агаризоване регенераційне середовище MSR - середовище MS, до якого було додано 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, селективний агент канаміцин в концентрації 100 мг/л та цефотаксим, для елімінації бактерії, в концентрації 500 мг/л при використанні векторної конструкції pICBV16.

Укорінення регенерантів проводили на безгормональному середовищі MS, яке містило канаміцин в концентрації 100 мг/л або 5 мг/л фосфінотрицину та 500 мг/л цефотаксиму після трансформації вектором pCB203.

2.6. Аналіз рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації

2.6.1. Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Регенеранти тютюну, одержані на селективному середовищі, аналізували на присутність трансгена.

З листків рослин-регенерантів тютюну, отриманих після трансформації вектором pCB203 та pICBV16, які знаходились в *Agrobacterium tumefaciens* штамі GV3101 та штамі C58, була виділена загальна ДНК і проаналізована методом ПЛР на присутність гена *bar*, що входить до складу вектору.

Сумарну ДНК з рослинного матеріалу виділяли за методикою з використанням ЦТАБ методу згідно та ПВП [84].

Для виключення можливості забруднення рослинного матеріалу агробактерією, перед аналізом на трансген *bar* та *npt II* була проведена ампліфікація на присутність агробактеріального гена *vir-D1* [85].

Листові сегменти (200мг) були розтерті в охолоджених ступках та перенесені в пробірки на 1,5 мл (Eppendorf, США). Руйнування рослинної тканини проводилось з додаванням екстрактивного буферу для стабілізації виділених компартментів клітин (100 мМ Tris-HCl, 20 мМ ЕДТА, 1,4 М NaCl, 2% ЦТАБ, 40 мМ меркаптоетанол). Після інкубації при 56⁰С протягом 20 хв у зразки було внесено рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1),

таким чином було здійснено депротейнізацію. Розділення фаз було проведено центрифугуванням при 14 тис.об/хв протягом 5 хв.

На виході ми отримали двохфазну систему: нуклеїнові кислоти знаходяться у верхньому шарі, а гідрофобні органічні сполуки (ліпіди) у нижньому. В інтерфазі або середньому прошарку розташовуються білки.

Наступним кроком було відібрано гідрофільну верхню фазу, що містить цільові сполуки, а саме нуклеїнові кислоти. Після чого було додано буфер для осадження ДНК (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ ЕДТА, 1,4 М NaCl, 1% ЦТАБ). Надалі проводилась 20 хвилинна інкубація за кімнатної температури, після чого проводилось осадження при 14 тис.об/хв протягом 5 хв.

В подальшому осад було розчинено у 400 мкл 1,2 М NaCl. ДНК з водної фази було осаджено 96% етиловим спиртом у подвійному об'ємі і після центрифугування при 14 тис.об/хв протягом 5 хв було здійснено промивку 70% етанолом у двох повторностях. Останнім етапом виділення було просушування осаду та його наступне розчинення у 40 мкл деіонізованої води.

Відповідно до рекомендацій [86] полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal (Eppendorf, США).

Загальний об'єм суміші становив 20 мкл: 1 мкл (приблизно 100 нг) сумарної рослинної ДНК, 2 мкл сольового буфера (10 мМ Tris-HCl, рН 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01% Тритон X-100), 2 мкл суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів (Thermo Scientific, (EU) Lithuania) із розрахунку 200 мкМ кожного в реакційній суміші, 0,5 мкл кожного з праймерів (0,2 мкМ), 0,1 мкл Taq-полімерази (Thermo Scientific, (EU) Lithuania) та 15 мкл стерильної деіонізованої води.

Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували ДНК векторів трансгенних рослин, отриманих раніше, за допомогою яких проводили генетичну трансформацію [86].

Інформація про нуклеотидні послідовності праймерів, які використовували в роботі для проведення ПЛР, температуру реасоціації та

розмір очікуваного фрагменту, що синтезується в результаті реакції, представлена в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Праймери, які були використані для проведення ПЛР

Ген	Назва	Нуклеотидна послідовність	Температура реакції	Розмір продукту ампліфікації
<i>bar</i>	<i>bar36/fw</i> <i>bar36/rv</i>	5'ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCC 3' 5'GCATGCGCACGGTCGGGTCGTTGG 3'	59°C	411 п.н.
<i>npt II</i>	<i>kan51/fw</i> <i>kan51/rv</i>	5'CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA 3' 5'GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG 3'	60°C	622 п.н.

2.6.2. Гістохімічний аналіз фермента β -глюкуронідази

Гістохімічний аналіз активності фермента β -глюкуронідази у трансгенному рослинному матеріалі за методикою [87] проводили наступним чином.

Для досліджування активності ферменту були зібрані зразки листової тканини різних ліній тютюну, включаючи контрольний зразок. Листки були вкладені у пробірки Eppendorf 1,5 мл і надалі залиті фосфатним буфером (pH 7,0), що містив 1 мМ X-Gluc, 10 мМ натрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти, 0,1% Тритон X-100, 2,5 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$, 2,5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 2 мМ дитіотреїтолу, 0,1% диметилсульфоксиду, 20% метилового спирту та поміщені на 37°C на ніч у термостат.

Завдяки першому компоненту буферу і візуалізується наявність або відсутність ферменту, а також можна приблизно зробити висновки щодо активності β -глюкуронідази. Пробірки поміщаються у термостат налаштований на 37°C для проходження реакції забарвлення тканин, що містять фермент у

блакитний колір. Наступним етапом є заміна відпрацьованого буферного розчину на розчин етилового спирту 70% на 3-10 діб. Цей крок необхідний для того аби зруйнувати хлорофіл і позбавитися зеленого кольору. При цьому чіткіше проступають забарвлені ділянки і ми маємо можливість точно оцінити результат експерименту.

2.6.3. Флуориметричний метод визначення активності β -глюкуронідази

Для проведення кількісної оцінки накопичення білка *GUS* в листках трансформованих рослин оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU (4-Methylumbelliferone), що утворюється при розщепленні 4-MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) ферментом- β -глюкуронідазою [87].

Інтенсивність флуоресценції визначалась за використання кювет об'ємом 3 мл на спектрофлуориметрі PerkinElmer LS5, використовуючи довжину збудження 365 нм, а емісії - 455 нм. Концентрацію 4-MU в пробі визначали за допомогою калібровочної кривої, побудованої на основі стандартних розведень цієї речовини.

Агроінфільтрацію проводили згідно [88, 89] з деякими модифікаціями. Нічну культуру *Agrobacterium tumefaciens* штам *GV3101*, яка була трансформована відповідним вектором, осаджували при 6 об/хв., 4°C протягом 5 хв. та ресуспендували у буфері для інфільтрації (10 мМ МЕС, рН 5,5; 10 мМ $MgSO_4$).

Для інфільтрації готували бактеріальну суспензію, що містила один з дослідних векторів, та вектор pICH6692, який містить ген білку *P19* вірусу костистої карликовості томатів. Цей білок є супресором пост-транскрипційного та індукваного вірусами сплайлесингу генів в рослинах [90, 91] і використовується в інфільтраційній суспензії для запобігання «замовчування генів».

Бактеріальні суспензії змішували у рівних об'ємах та розводили до кінцевої оптичної густини (OD^{600}) для кожної суміші 0,6-0,8. Надалі проводили інфільтрацію агробактеріальною суспензією рослин *N. benthamiana*, що вирощувались в теплиці, за допомогою стерильних одноразових шприців на 2 мл (без голки). Визначення транз'єнтної експресії проводили на четверту добу після інфільтрації.

2.6.4. Екстракція загального водорозчинного білку з листків рослин

Для виділення загального білку зразки листків відібраних для дослідження ліній нарізали по 100-150 мг листової тканини та гомогенізували в охолоджених ступках в екстракційному буфері при $4^{\circ}C$, зі співвідношенням буфера до тканини 2:1. Екстракційний буфер мав наступний склад: 50 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Na-ЕДТА, 0,1% Тритон X-100, 0,1% натрій лауроїлсаркозин.

Надалі проводилось осадження при 14 тис. об/хв., при $4^{\circ}C$ протягом 20 хв. Після центрифугування 100 мкл екстракту відбирали та додавали до 200 мкл аналізуючого буферу (екстракційний буфер, доповнений 4-MUG до концентрації 1мМ) та інкубували отриману суміші при $37^{\circ}C$.

Через 30 хв інкубації реакцію зупиняли розчином 200 мМ Na_2CO_3 . Для цього 100 мкл суміші відбирали і додавали до 1,900 мл розчину Na_2CO_3 , а отриманий розчин переносили в кювету і проводили вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Оцінка кількості білку β -глюкуронідази проводилась за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU (продукту ферментативного розщеплення 4- MUG) та співвіднесена її із загальною кількістю білку в кожній пробі.

2.6.5. Вимірювання концентрації сумарного розчинного білку

Кількість загального розчинного білку у первинному екстракті було визначено за методикою Bradford et al. [92]. Для приготування реагенту Бредфорда 10 мг кумасі синій (Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva, ФРН)

розчиняли у 5 мл етилового спирту, додавали 10 мл ортофосфорної кислоти та доводили до об'єму 100 мл дистильованою водою.

Оптичне поглинання суміші при довжині хвилі 595 нм вимірювали через 3 хв. після внесення реагенту на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf, США). Як стандарт визначення концентрації білку було використано розчин бичачого сироваткового альбуміну у кількості 4, 8, 12, 16, 20 мкл, який було піпетовано в дистильованій воді (96, 92, 88, 84, 80 мкл).

Надалі вносився реактив Бредфорта у кількості 900 мкл та проводилось вимірювання зразків і побудова калібровочної кривої. Наступним етапом вимірюються зразки рослин та будується графік, виходячи з даних якого, проводиться обчислення кількісного складу білку.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Генетична трансформація тютюну

Генетичну трансформацію рослин проводили методом «листових дисків» [30] за допомогою *Agrobacterium Tumefaciens* штамом *GV3101* та *C58*, які була трансформована вектором *pCB203* та вектором *pICBV16* з використанням бактерії штаму *GV3101*.

Метод агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну успішно використовується для трансформації пасльонових, наприклад, *N. Tabacum*, та є дуже простим і надійним методом, який з успіхом використовують у багатьох лабораторіях [93, 94].

Використання оптимальної концентрації селективних агентів для відбору трансформованих клітин є важливою умовою успішного проведення експериментів з генетичної трансформації рослин.

Оскільки досить невелика кількість клітин рослинного експланту після співкультивування з агробактерією містить перенесену чужорідну ДНК, важливо створити умови, за яких трансформована клітина має переваги перед рештою клітин експланту.

Відтворити такі умови стає можливим завдяки використанню селективних маркерних генів. Експресія цих генів в трансгенних клітинах надає переваги в умовах селективного тиску перед рештою клітин експланту, завдяки чому вони проліферують та дають початок трансформованим рослинам [34].

Вектори для трансформації, які були використані у наших експериментах, містили ген стійкості до гербіциду фосфінотрицину (*bar*) та ген стійкості до антибіотику канаміцину (*nptII*).

3.2. Отримання регенерантів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

В результаті експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну вектором *pCB203*, який знаходився в *Agrobacterium*

tumefaciens штаму *GV3101* після перенесення на селективне регенераційне середовище 31,7 % експлантів знебарвилися, а з 54% спостерігали регенерацію зелених пагонів (рис. 3.1).

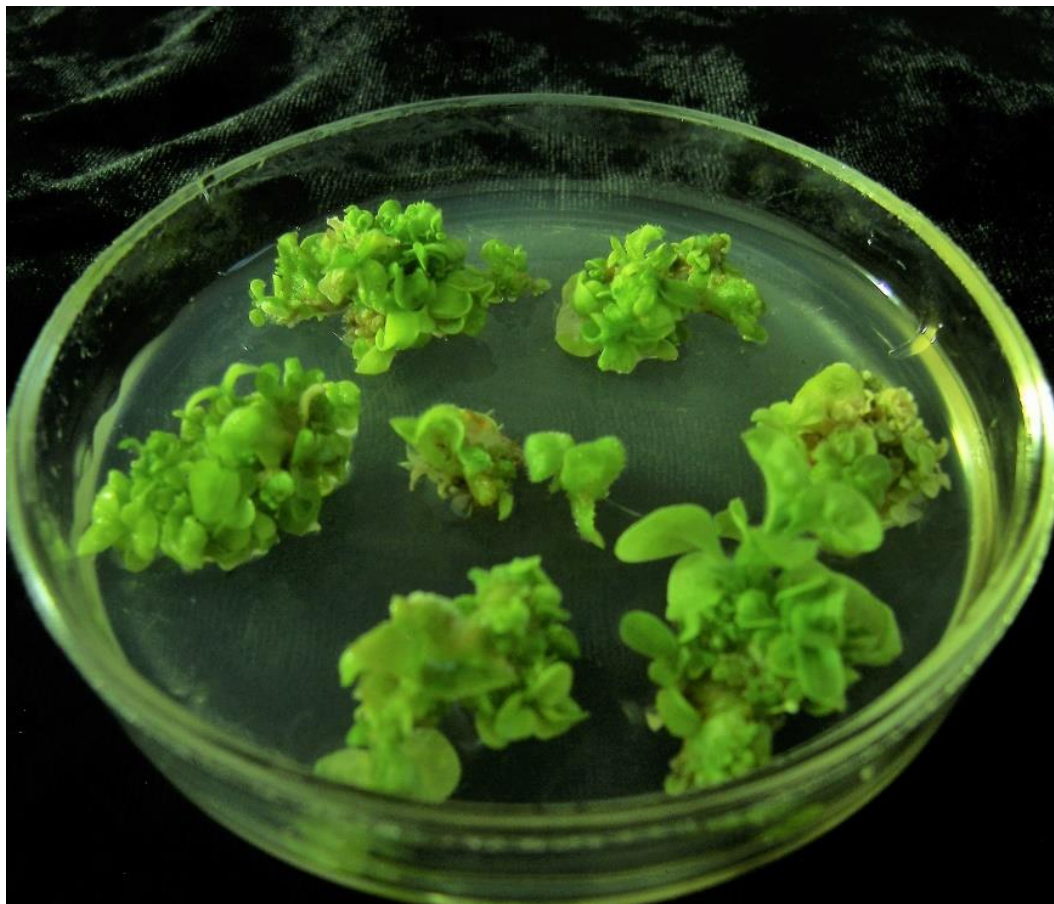


Рисунок 3.1. Регенерація рослин з експлантів тютюну на селективному середовищі із фосфінотрицином після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB203.

Наступним етапом було виділення 25 рослин-регенерантів з експлантів та перенесення їх у банки з селективним безгормональним середовищем MS для проведення подальших досліджень.

По закінченню 30 денного терміну з 25 відібраних рослин вкорінилися 19, решта виявились чутливими.

В результаті проведених експериментів з агробактеріальної трансформації рослин тютюну (*Nicotiana tabacum*) сорту Petit Havana,

векторами pCB203 та pICBV16 на селективному середовищі з канаміцином (50 мг/л), було відібрано декілька рослин, які були протестовані на середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину.

Виявилось, що більшість трансгенних рослин (приблизно 76%) проявляють ознаку стійкості до гербіциду в умовах *in vitro* – вкорінюються на селективному середовищі.

Було отримано 13 ліній трансгенних рослин T₀. При перевірці рослин на селективному середовищі більшість з них, а саме 76%, показали стійкість до фосфінотрицину.

Про стійкість також свідчили результати молекулярно-біологічного аналізу методом полімеразної ланцюгової реакції, яка демонструвала наявність *bar* гену в тотальній ДНК рослин.

Було висунуто припущення, що стабільна трансгенна активність пояснюється принципом дії фосфінотрицину адже його властивістю є блокування глютамінсинтетази, що призводить до численних порушень обміну речовин у рослині та як наслідок її загибелі.

Отже лише рослини, які демонструють експресію гену, що кодує фосфінотрицин ацетил трансферазу, здатні рости на середовищі, внаслідок нейтралізації селективного агенту.

3.3. Молекулярно-біологічне дослідження трансформантів на присутність гену інтересу

Рослинний матеріал відібраний з 19 рослин, що показали себе як перспективні для подальшого вивчення, був проаналізований на присутність трансгена *bar* за методом ПЛР.

Наявність шуканого гену та відсутність бактеріального забруднення була доведена для 13 ліній рослин.

Перед проведенням візуалізуючих та уточнюючих досліджень, рослини T₁, були відібрані для підтвердження наявності успадкованих трансгенів.

Було проведено аналіз загальної ДНК рослин, а також аналіз присутності гену *bar* (рис. 3.2).

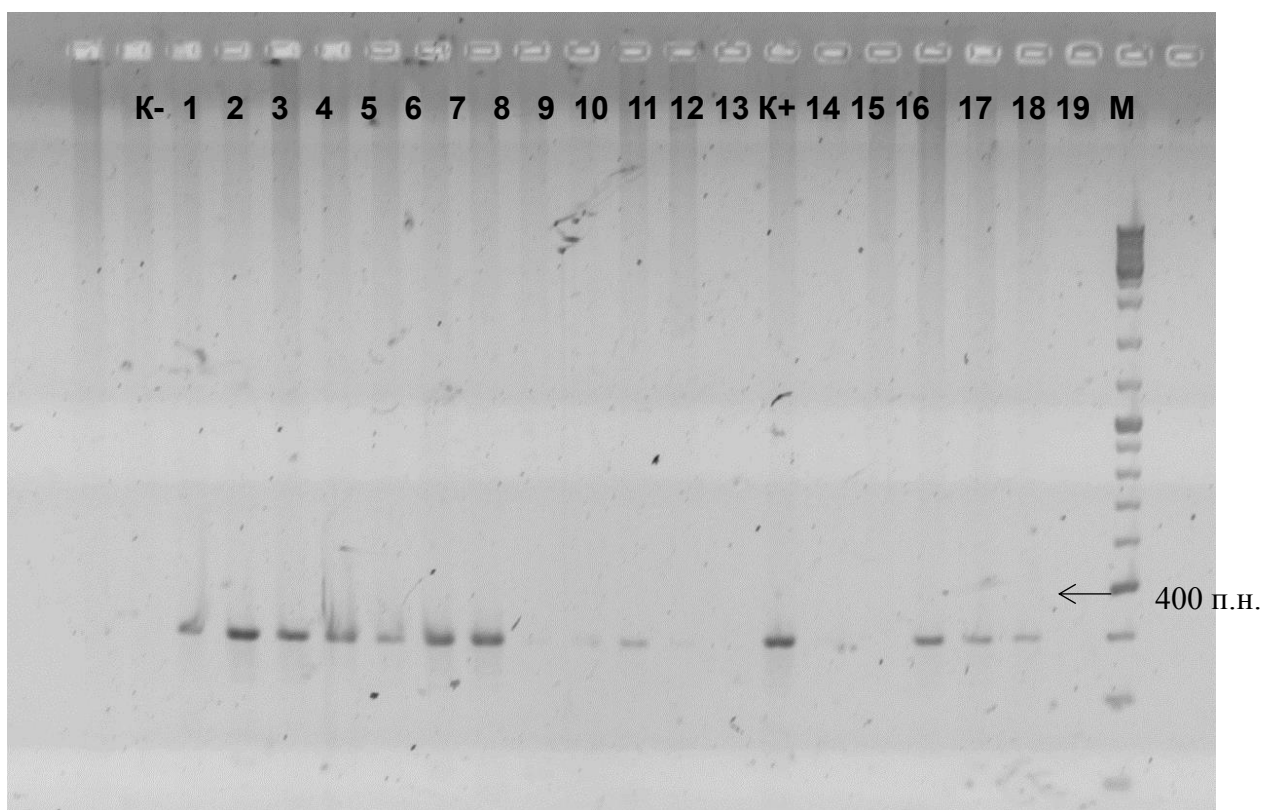


Рисунок 3.2. Фотографія електрофореграми ПЛР дослідження рослин покоління T_0 .

K- – негативний контроль, нетрансформована рослина тютюну, K+ – позитивний контроль, M – маркер молекулярної маси ДНК.

Доріжки 1-19 – лінії регенерантів тютюну після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

В якості позитивного контролю (K+) було взято нетрансформовану рослину *N.tabacum* (дикий тип), негативного (K-) – зразок кукурудзи, нульовим контролем виступав пустий зразок, що містив mQ.

Аналіз загальної ДНК показав наступну картину: зразки 8, 9, 10 (рис 3.3) виявились найбільш насиченими ДНК, до 10 т.п.н.; зразки 4, 6, 7, 12 слабші-близько 7 т.п.н. і найслабші зразки 5 та 11 – 2 т.п.н. Зразки 1, 2 та 3 виявились пустими.

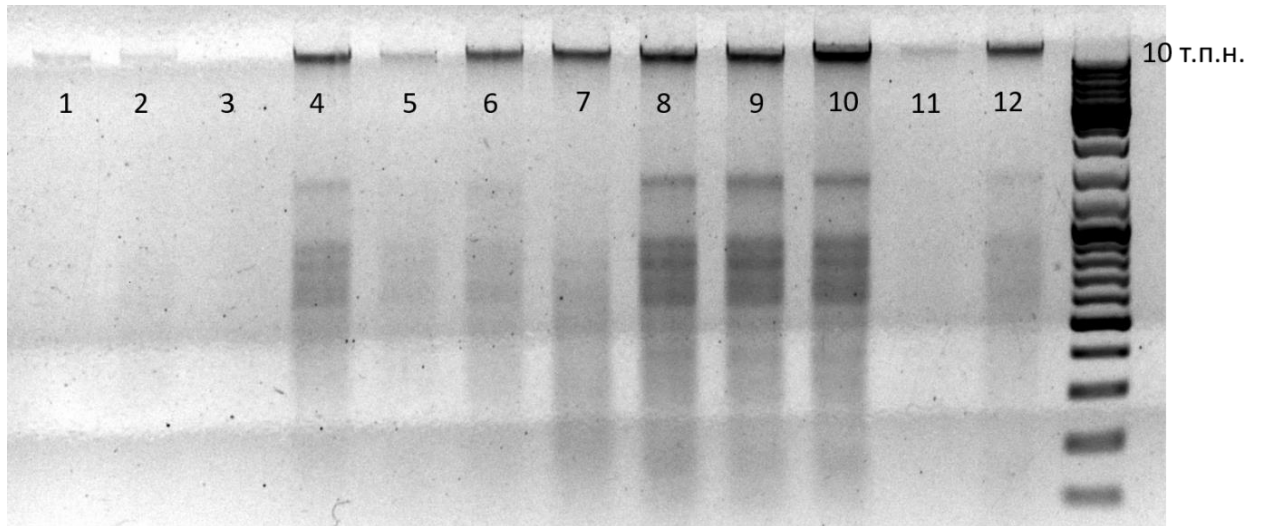


Рисунок 3.3. Фотографія електрофореграми аналізу тотальної ДНК рослин покоління T_1 .

При дослідженні на *bar* ген ми можемо спостерігати смуги величиною 411 п.н., що свідчить про наявність гену інтересу та перспективність даних ліній. Лінії 2, 4, 5, 7, 8, 10 (рис. 3.4) дали найбільш чіткий сигнал за інтенсивністю якого можна зробити висновок про стабільну сильну експресію.

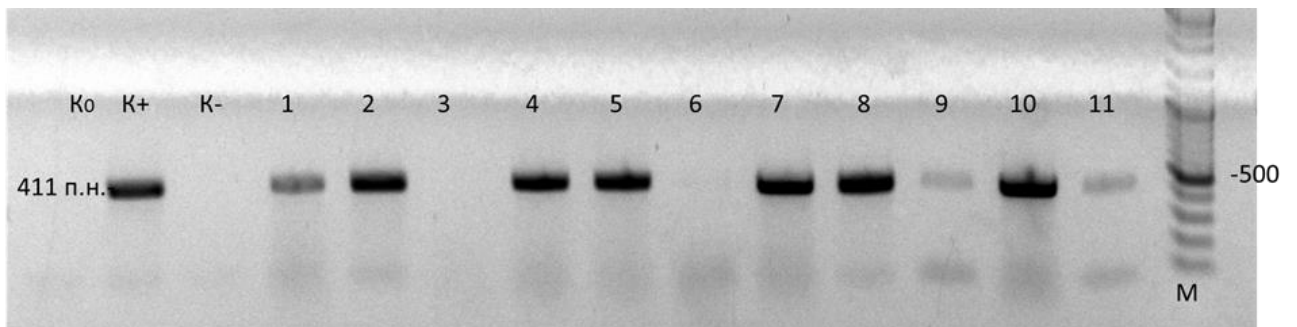


Рисунок 3.4. Фотографія електрофореграми ПЛР дослідження рослин покоління T_1 .

K^- – негативний контроль, нетрансформована рослина тютюну, K^+ – позитивний контроль, K_0 – нульовий контроль, M – маркер молекулярної маси ДНК. Доріжки 1-11 – лінії T_1 покоління тютюну.

Зразки 1, 9, 11 показують наявність гену *bar*, проте володіють імовірно слабшою експресією.

Отримані результати свідчать про передачу трансгену в ряду поколінь.

У результаті перевірки нащадків методом ПЛР на присутність гену інтересу та відсутності бактеріального забруднення було підтверджено трансгенність цих рослин. Дослідження показало, що зразки володіють вищезазначеним геном і являються чистими відносно контамінуючих агентів.

3.4. Гістохімічний аналіз наявності та інтенсивності експресії *gus* гену

В подальшому за використання гістохімічного методу, було доведено наявність ферменту β -глюкуронідази для 1-13 ліній трансгенних рослин, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB203 з різним ступенем інтенсивності (рис. 3.5).



Рисунок 3.5. Гістохімічний аналіз експресії гену β -глюкуронідази в листках рослин-регенерантів тютюну отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB203.

Таким чином, в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну вектором pCB203 були отримані трансгенні рослини, які містили ген

bar та виявляли експресію ферменту β -глюкуронідази, що свідчить про його функціональну активність.

Послідовності регуляції експресії генів однодольних ймовірно впливають на рівень експресії гена в тютюні, і, як наслідок цього явища, ми спостерігали слабку інтенсивність блакитного забарвлення в листках більшості ліній трансформантів в процесі виявлення активності ферменту β -глюкуронідази.

Відомо, що ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації рослин може сильно залежати від штаму бактерії, особливо, якщо це стосується трансформації однодольних рослин, які не є її природніми хазяїнами об'єктах [23, 95], до яких відноситься *Nicotiana tabacum*.

Тютюн належить до дводольних рослин, тому цікаво дослідити експресію векторів призначених для трансформації однодольних у дводольній рослині. Для цього ми проводили гістохімічний аналіз експресії ферменту β -глюкуронідази в листках трансгенних рослин тютюну отриманих за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації векторами pICBV16 з використанням бактерії штаму *GV3101* та pCB203, що знаходився в двох штаммах агробактерії: *GV3101* та *C58*.

У векторі pICBV16 ген β -глюкуронідази знаходився під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти, найпоширенішого при конструюванні векторів для трансформації дводольних рослин, а в pCB203 під контролем промотору та першого інтрону гена убікітину кукурудзи.

Ген *gus* кодує фермент β -глюкуронідазу і є зручним маркерним геном та широко застосовується в векторах для генетичної трансформації рослин [88].

Цей ген використовують найчастіше для оцінки ефективності та специфічності нових промоторних послідовностей, він дозволяє завдяки простій гістохімічній реакції оцінити наявність експресії трансгену в тканинах рослини (з'являється синє забарвлення), а також, використовуючи метод спектрофлуориметрії, провести кількісну оцінку ефективності експресії [95, 62, 96, 97, 98, 99].

Гістохімічне дослідження виявило експресію гена β -глюкуронідази в листках трансгенних рослин тютюну з різною інтенсивністю (рис. 3.6).



Рисунок 3.6. Результати фарбування покоління T_0 .

1) pCB203/GV3101 2) pCB203/C58, 3) pICBV16/GV3101

Найбільш інтенсивне блакитне забарвлення спостерігали у рослин отриманих після трансформації вектором pICBV16, де ген знаходився під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти.

Найслабкіше блакитне забарвлення спостерігали в листках тютюну отриманого після трансформації вектором pCB203 за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101.

Інтенсивність блакитного забарвлення у регенерантів отриманих після трансформації бактеріальним штамом C58, що містив вектор pCB203, в якому ген β -глюкуронідази знаходився під контролем промотору гена убікітину кукурудзи, була близька до такої у рослин отриманих після трансформації вектором pICBV16 за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 та значно

більша порівняно з рослинами тютюну отриманими після трансформації вектором pCB203, що знаходився в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (рис. 3.6).

Таким чином, було показано зниження у тютюні рівня експресії генів, які знаходились під контролем регуляторних послідовностей однодольних порівняно з генами, що знаходились під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти.

Використання в процесі трансформації *Agrobacterium tumefaciens* штаму C58 приводило до підвищення рівня експресії чужорідних білків у трансгенних рослинах порівняно з використанням *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Під час аналізу результатів фарбування було зроблено висновок про залежність конструкції вектору та штаму *Agrobacterium tumefaciens* від інтенсивності експресії вбудованого гену в ДНК цільової рослини.

Ми помітили, що за поєднання штаму GV3101 та вектору pICBV16, а також штаму C58 та вектору pCB203 спостерігались найвищі рівні експресії. На противагу, при поєднанні вектора pCB203 та штаму GV3101 експресія спостерігалась досить слабка. Імовірно послідовності експресії для одно- та дводольних внесли вклад в загальну картину трансформації рослин.

3.5. Вирощування T₁ покоління 13 ліній трансгенних рослин *N. Tabacum*

Насіння отримане від ліній рослин-регенерантів покоління T₀ було висаджено у ґрунт для вирощування в умовах теплиці при температурі 25⁰С та денному освітленні.

Після отримання повноцінних рослин-нащадків було проведено дослідження на наявність гена *bar* для підтвердження успадкування трансгенності у поколінні T₁. За результатами ПЛР-аналізу було доведено присутність гена та відсутність забруднення бактерією, з допомогою якої проводилась трансформація.

3.6. Гістохімічне визначення присутності гену β -глюкуронідази в T₁ поколінні трансформантів

Згідно з результатами гістохімічного визначення простежується кореляція з результатами, отриманими під час аналізу покоління T₀ (рис. 3.7).



Рисунок 3.7. Результати фарбування покоління T₁.

1) pCB203/GV3101 2) pCB203/C58, 3) pICBV16/GV3101

Найбільшу активність демонструють рослини, трансформовані штамом *Agrobacterium tumefaciens* GV3103, де ген інтересу знаходиться під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти, який, як правило, забезпечує ефективну експресію у дводольних рослин і як наслідок, трансгенні рослини *N. tabacum*, трансформовані вектором pICBV16 виявляють більшу експресію.

На противагу за використання штаму C58, де трансген знаходиться під контролем промотору убікітину кукурудзи, що використовується у векторних

конструкціях в якості регуляторної послідовності однодольних, експресія дає гіршу візуалізацію, чим і підтверджуються попередні припущення щодо кореляції рівнів активності експресії за використання різних регуляторних елементів та різних штамів *Agrobacterium tumefaciens*.

При аналізі результатів гістохімії були підтверджені попередні припущення щодо впливу векторних конструкцій та використовуваних штамів на повноту реалізації гену інтересу в рослині, яку піддають трансформації та ряду поколінь трансгенної лінії.

3.7. Опрацювання результатів аналізу рівнів водорозчинного білку

Після проведення попередніх уточнюючих досліджень наявності експресії гену інтересу у трансформованих рослинах тютюну покоління T₁ було проведено кількісний аналіз рівнів загального білку за методом Бредфорта. В якості контролю було взято дикий тип, вирощений *in vitro*, а в якості зразків – рослини-трансформанти різних ліній.

Попередня калібровка була здійснена за використання бичачого сироваткового альбуміну у кількості 4, 8, 12, 16, 20 мкл, розпіпетованого у відповідно 96, 92, 88, 84, 80 мкл дистильованої води, після чого було додано реактив Бредфорта у кількості 900 мкл та гомогенізовано загальну суміш. Протягом терміну активності вимірювання було проведено спектрофотометричне визначення та побудова калібрівочного графіку. У якості пустого зразку (blank) використовувалась суміш 100 мкл дистильованої води та 900 мкл реактиву Бредфорта.

Надалі проводилось дослідження активності основних зразків рослин T₁ покоління. Для цього 10 мкл екстракту, попередньо отриманого в результаті виділення та осадження, розпіпетовувалась у 90 мкл дистилату, далі додавався реактив Бредфорта і проводилось спектрофотометричне визначення при довжині хвилі 595 нм, на якій проявляється флуоресценція продукту зв'язування Comassie G250 з білком.

Отримавши калібровочну криву та визначивши концентрацію білку у зразках ми зробили висновок про підтвердження попередніх даних щодо інтенсивності експресії.

3.8. Вивчення результатів флуориметричного дослідження

Після проведення оцінки рівня загального білку в трансформантах T₁ покоління та підтвердження припущень щодо рівнів експресії гену *gus* у вибраних зразках, було проведено флуориметричне дослідження за використання субстрату 4-MUG (4-метиллумбеліферил- β -D-глюкуроніду).

Розщеплення субстрату проходить за реакцією гідролізу, а продукт, отриманий на виході, володіє флуоресценцією, інтенсивність якої і детектується приладом.

В ході досліду було підтверджено найбільшу активність ферменту у рослин, трансформованих вектором pICBV16 за використання штаму *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. Схожі рівні експресії давала комбінація вектору pCB203 та штаму *Agrobacterium tumefaciens* C58.

Поєднання вектору pCB203 та штаму *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 дало найслабші результати за всіма дослідями, в тому числі і за методом флуорогенного аналізу.

В цілому, результати кількісного аналізу за допомогою флуориметричного методу співпадають з результатами гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази для кожного з векторів.

РОЗДІЛ 4. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗРОБКИ

4.1. Резюме

Проблема забезпечення населення планети продуктами харчування з кожним роком стає все гострішою. Зростає чисельність населення планети, причому темпи зростання чисельності населення планети випереджають темпи нарощування обсягів продуктів харчування. Разом з тим, зростає вартість продуктів харчування, за як природних, так економічних причин. А саме: відбувається глобальне потепління клімату, водні ресурси, які забезпечують існування людей, тваринного і рослинного світу є обмеженими та уразливими природними об'єктами, продовжуються виснаження ґрунтів, все більше відчувається нестача води у верхніх шарах ґрунту, зростає вартість енергоносіїв. У цих умовах пріоритетним напрямком у формуванні сільського господарства отримання достатньої кількості продукції високої якості при обмежених витратах природних ресурсів, зокрема викопної енергії, збереженні і навіть підвищенні родючості землі та джерел питної води, запобігання забруднення довкілля.

Шляхом вирішення цієї проблеми є застосування біотехнологічних процесів сільському господарстві.

В зв'язку з цим, генно-інженерні підходи в кінцевому підсумку спрямовані на підвищення урожайності, поживних та харчових якостей, стійкості рослин до хвороб та абіотичних стресорів.

Серед провідних країн-виробників аграрної продукції Україна стрімко рік від року збільшує свій внесок у забезпечення продовольчої безпеки світу.

Назва розробки «Створення фермерського господарства з вирощування трансгенних сільськогосподарських культур» на основі теми «Дослідження активності гену β -глюкуронідази в трансформованих рослинах тютюну».

Мета дослідження – дослідження активності експресії гену β -глюкуронідази під впливом різних промоторів та використовуючи різні штами бактерії *Agrobacterium tumefaciens* в трансформованих рослинах тютюну.

Об'єкт дослідження – T_1 покоління трансформованих рослин та вивчення експресії перенесених генів, визначення зв'язку між інтенсивністю експресії та будовою векторів для трансформації, а також штамів *Agrobacterium tumefaciens*, які використовувалися в експерименті. Місце в інноваційному ланцюжку цінності розробки: Ідея-розробка. За міжнародною класифікацією товарів продукти відносяться до класу 31 «Сирі та необроблені продукти сільського господарства, аквакультури, плодівництва та лісівництва; сире та необроблене зерно і насіння; свіжі фрукти та овочі, свіжі трави; живі рослини і квіти; цибулини, розсада, сіянці та насіння для сівби; живі тварини; корми та напої для тварин; солод» підклас 310061 «Пшениця» та підклас 310082 «Кукурудза» [100].

Цінність розробки полягає в тому, що у якості посівного матеріалу будуть використані трансгенні посівні рослини, тим саме буде забезпечена висока врожайність, та відповідно зниження собівартості продукції, бо як відомо, зазначені сорти стійки до гербіцидів, шкідників та посухи. Суспільна цінність полягає в насиченні ринку зерном високої якості, а відповідно і продуктами харчування високої якості.

Передбачається, що фермерське господарство сімейного типу буде створено без статусу юридичної особи, має 2 га власної землі, 18 га – планується взяти в оренду.

У разі успішного запуску проекту, можливе розширення діяльності та внесення змін до статусу фермерського господарства. Працювати будуть тільки члени сім'ї у кількості 4-х чоловік. Незважаючи на те, що фермерським господарством зазначеного типу ведення бухгалтерського обліку не є обов'язковим, разом з тим прийнято рішення про його ведення для повного і своєчасного відображення витрат, аналізу та шляхів їх скорочення, контролю за раціональним використанням активів. Відповідно до законодавства членам сімейного фермерського господарства виплачується не заробітна плата, а певна частка з отриманого господарством доходу.

Вирощувати планується пшеницю та кукурудзу, площі, що будуть зайняті під зазначені культури – кожна 10 га. Основним ринком збуту виробленого продукту є внутрішній. Джерелами отримання сировини передбачено національний ринок. На сьогодні декілька Науково-дослідних інститутів, у тому числі Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, на базі якого було вище зазначене дослідження, працюють у напрямку створення трансгенних рослин.

Таблиця 4.1 – Резюме стартап-проекту

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Вирощування трансгенних сільськогосподарських рослин – пшениці та кукурудзи
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Відповідно до відкритих статистичних даних фермерські господарства такого типу займаються вирощування інших сільськогосподарських культур, в основному вирощують ріпак, соняшник, овочі.
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Висока якість зерна та висока врожайність сільськогосподарських культур
4. Ступінь розробленості технології реалізації	В Україні існують Науково-дослідні інститути, які створюють нові сорти сільськогосподарських культур
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 31, підкласи 310061 «Пшениця» та 310082 «Кукурудза»
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	КВЕД-2010: Група 01.1 Клас 01.11 Вирощування зернових культур (крім рису), бобових культур і насіння олійних культур
7. Очікувана потужність стартапу	Мале підприємство
8. За масштабом виробництва	Масове
9. За рівнем спеціалізації	Багатопрофільне
10. За ресурсами, що споживатимуться	Матеріаломістке
11. За чисельністю персоналу	Мале

Показник	Характеристика
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу; - офісу стартапу; - збутової мережі; - постачальників комплектуючих.	Київська область
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	Ідея-розробка
15. Гранична корисність ідеї стартапу	145 т пшениці та 175 т кукурудзи
16. Бізнес-модель стартапу	B2B
17. Конкуренти вітчизняні	Інші фермерські господарства
18. Конкуренти іноземні	Іноземні транснаціональні корпорації
19. Ключові фактори успіху стартапу	Екологічність, висока якість продукції
20. Споживачі	Агрокомпанії, які займаються закупівлею зерна
21. Планова кількість продукту розробки	320 т зернових культур, у тому числі 145 т пшениці та 175 т кукурудзи
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	20 т
23. Споживачі на етапі розвитку	Компанія, які займаються закупівлею зерна
24. Споживачі на етапі зрілості	Ті самі
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	Пшениці – 7897 грн/т Кукурудзи – 7526 грн/т
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	35,55%
27. Капіталовкладення в проект	3 980 593,94 грн.
28. Період повернення капіталовкладень у проект	6,2 років
29. Джерела фінансування	зовнішні, національні

Показник	Характеристика
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Посівне зерно, добрива
31. Потенційні постачальники закордонних складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і)	Вітчизняні постачальники
32. Планове місце реалізації результату розробки	Київська область

4.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Таблиця 4.2 – Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища

Фактори	Загрози	Можливості
Політика та право		
Можливі дострокові вибори до Верховної Ради України.	Переваги певної політичної сили на виборах, зміна політичного устрою та політичний ризик фінансових вкладень.	Проявлення політичної волі на створення сприятливого соціального, економічного та політичного клімату для розвитку підприємництва.
Військові дії та нестабільна політична ситуація в Україні	Небезпека утворення нестабільної ситуації, погіршення кримінальної ситуації в країні.	---
Внесення змін та доповнень до чинного законодавства, у тому числі до державного галузевого регулювання та правового захисту підприємництва та прав власності.	Зміни законодавства в негативну сторону.	Безпека праці, захист майна та інтелектуальної власності, спрямування державної екологічної політики на забезпечення конституційного права кожного на безпечне для життя і здоров'я довкілля та на відшкодування завданої порушенням цього права шкоди.

Продовження табл. 4.2

Фактори	Загрози	Можливості
Корупція.	Втрата майна та коштів.	---
Рейдерські захоплення та несприятлива ситуація для підприємництва.	Втрата власного підприємства.	---
Інтелектуальна власність та закони про захист інтелектуальної власності.	Недосконалість законодавства. Викрадення та копіювання ідей.	Захист прав інтелектуальної власності.
Економіка		
Податкове законодавство	Підвищення розміру податків	Зниження розміру податків, зростання доходів населення і підприємств і т.п. будуть сприяти зростанню обсягів реалізації продукції.
Рівень інфляції	Високі ціни на товари, зниження купівельної спроможності населення та зростання соціальної нестабільності.	Розширення виробництва, вихід на міжнародний ринок та отримання виручки в іноземній валюті.
Динаміка курсу гривні	- Високий курс іноземних валют призведе до подороження сировини, складності ведення бізнесу та зменшення прибутку.	Залучення інвесторів-нерезидентів.
Науково-технічний прогрес		
Зміна та виникнення нових тенденцій в обраній сфері діяльності.	Втрата або «знецінення» власних бізнесу. Неможливість забезпечити конкуренцію в даній галузі.	Можливість використання існуючих технологій і інновацій, в тому числі нових технологій, які можуть бути актуальними у вирощуванні сільськогосподарських рослин. Створення власних тенденцій і технологій.
Географія		
Розміщення	Заробітна плата у Київській	У Київській області

Фактори	Загрози	Можливості
виробництва у Київській області.	області є вищою, ніж в регіонах.	знаходиться багато населених пунктів, жителі яких зацікавлені в роботі.
Потенційна клієнтська база	Перевищення попиту над пропозицію та поява конкурентів.	Розширення виробництва може задовольнити попит.
Демографія		
Зниження народжуваності	Зниження кількості споживачів продукту, зниження попиту, зменшення кваліфікованих фахівців, відтік кадрів за кордон.	Створення нових напрямків діяльності.
Старіння населення	Низька чисельність молоді.	Можливість залучати на виробництво фахівців страшного віку з досвідом роботи, враховуючи підвищення пенсійного віку, у разі необхідності.
Культура		
Зміна в базових цінностях, рівні і стилі життя, моди і зміна переконань.	Втрата культурних цінностей, небажання споживачів купувати нову продукцію.	Сучасні світові тенденції - це здоровий спосіб життя і відповідно харчування якісними продуктами.

Таблиця 4.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Постачальники		
Великий вибір постачальників в Україні	У разі виникнення проблем з одним з постачальників, можливо знайти заміну	Підвищення цін на сировину
Вузьке коло постачальників закордоном	Можливість змінити країни-імпортера	Небажана залежність бізнесу від імпорту
Конкуренти		
Конкурентна спроможність на ринку	На даному етапі відсутні	Насиченість ринку зерном

Фактор	Переваги	Недоліки
Споживачі		
Консервативність покупців	Екологічна продукція – світова тенденція.	Неготовність більшості населення до здорового харчування.
Ринок збуту	Широкий ринок збуту	Недовіра до нової компанії та трансгенних продуктів

Таблиця 4.4 – Переваги та недоліки внутрішнього середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Організаційна структура	Раціональна організаційна структура	Відсутність великого досвіду роботи
Маркетинг	Цінові переваги на внутрішньому ринку	- Високі витрати на створення іміджу новоствореної компанії
Виробництво	- Ефективна система контролю якості; - Сприйнятливість ринку до екологічного продукту; - Можливість розширення сфер діяльності.	- Дефіцит коштів; - Дорогі кредити; - Орієнтація на поточні потреби.
Персонал	Можливість розширення виробництва і як наслідок штату.	На початковому етапі неможливе додаткове залучення кадрів.

Таблиця 4.5 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти внутрішнього середовища			
1. Виробник	10	10	10
2. Постачальник	10	4	0,40
3. Споживачі	10	8	0,81
4. Посередники	6	5	0,30

Зацікавлена сторона	Вплив її реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти зовнішнього середовища			
1. Політичні структури	5	7	0,35
2. суб'єкти економічного середовища	8	5	0,4
3. Власники географічних об'єктів	10	8	0,8
4. Суб'єкти демографії	8	7	0,56
Зацікавлена сторона	Вплив її реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
5. Суб'єкти культурного середовища	7	6	0,42
6. Суб'єкти НТП	6	6	0,36

Табл. 4.6 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

	Переваги	Недоліки
Виробництво	ефективне використання виробничих потужностей; можливість розширення виробничих потужностей.	дорогі залучені кошти, дефіцит коштів.
Персонал	зацікавленість у результаті усіх членів господарства.	можливе зменшення кількості працюючих
Організація виробництва	+ раціональна організаційна структура; чіткий поділ праці, професійна спеціалізація; готовність до ризику.	відсутність ефективного менеджменту.

На підставі аналізу переваг та недоліків внутрішнього середовища визначено, які переваги сприятимуть впровадженню розробки, а які недоліки створюють ризики та перешкоди реалізації.

До розгляду інвесторам буде запропоновано інноваційну ідею – створення фермерського господарства з вирощування трансгенних сільськогосподарських культур.

4.3 Визначення ключових факторів успіху проекту

На підставі аналізу факторів внутрішнього і зовнішнього оперативного середовищ було визначено ключові фактори успіху вирощування трансгенних сільськогосподарських культур. Під ключовими факторами успіху розглянемо ті, на які господарство може самостійно впливати під час виробництва. Ключові фактори успіху надано у вигляді діаграми Шонфільда.

Таблиця 4.7 – Оцінка характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик		
		Наша продукція	Конкурент А	Конкурент Б
Ціна (Ц)	0,4	5	4	3
Продуктивність (П)	0,3	5	5	4
Кількість постачальників сировини (К)	0,1	2	4	2
Обсяг збуту (ОЗ)	0,2	3	5	4

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначається бальна оцінка кожної характеристики для нашої продукції і для конкурентів, яку приведено у таблиці.

Таблиця 4.8 – Оцінки характеристики з урахуванням коефіцієнту вагомості

Характеристика	Наша продукція	Конкурент А	Конкурент Б
Ціна (Ц)	2	1,6	1,2
Продуктивність (П)	1,5	1,1	1,2
Кількість постачальників сировини (К)	0,2	0,4	0,2
Обсяг збуту (ОЗ)	0,6	1	0,8

На підставі отриманих бальних оцінок будуюмо графік порівняння конкурентних переваг нашої компанії з конкурентами.

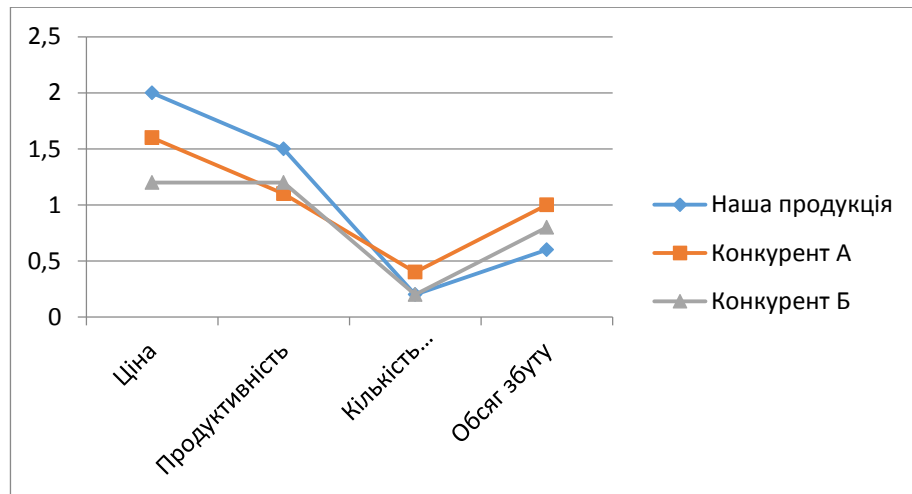


Рисунок 4.1. Порівняння конкурентних переваг підприємства з конкурентами.

Таким чином, наша продукція має переваги по ціні продуктивності і відповідно до якості по ціні. Паритет з конкурентом конкурентом Б – по кількості постачальників.

На основі ключових факторів успіху формуємо можливі варіанти розвитку.

Таблиця 4.9 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Розширення виробництва	У разі успішного запуску проекту, можливе розширення діяльності та внесення зміни до статусу фермерського господарства.
Продаж ідеї	Як в 1., але без права управління будь-яким сегментом діяльності господарства.
Самостійний розвиток	Самостійний розвиток є фінансово-витратним і не раціональним для сільськогосподарського продукту.

4.4. Визначення потенційних споживачів

Таблиця 4.10 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Юридична особа	
1. Форма власності (державне, приватне, колективне, комунальне, змішане,...)	Приватні, державні
2. КВЕД	01.11.0 Вирощування зернових та

Критерій	Значення
	технічних культур 01.11 Вирощування зернових культур (крім рису), бобових культур і насіння олійних культур 01.12 Вирощування рису 01.13 Вирощування овочів і баштанних культур, коренеплодів і бульбоплодів
3. За потужністю	Великі
4. За масштабом виробництва	Масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузкопрофільні, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються	Працемістки
7. За чисельністю персоналу	Великі, середні
8. За сферою діяльності	Виробничі
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, спільні
10. За географічним розташуванням	Київська, Черкаська області і т.д.
11. За віддаленістю органів управління	Національні
12. За характером господарської діяльності	Сільськогосподарські, тогівельні, міжгалузеві
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні
14. За долею іноземного капіталу	З іноземними інвестиціями
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні та корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	Безперервні
17. За роботою протягом року	Безперервні
18. За географічним розташуванням на території України	Київська, Черкаська області і т.д.
19. За наявністю вільних ОбЗ (коштів)	З наявними вільними ОбЗ
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: – Регіон – Чисельність населення – Структура регіону	- Київська область; - 1,8 млн осіб; - 59,1 % від загальної площі області-сільськогосподарські угіддя, з яких приблизно 81,5 % - рілля.

Таблиця 4.11 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Агрокомпанії, які займаються закупівлею зерна	Збільшується якість продукції
Відкоригована ідея стартап проекту	
Необхідно враховувати сезонність ведення діяльності та стихійні лиха	

Таблиця 4.12 – Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення	Примітки
Організаційно-правова форма	Приватне	-
Класифікація -за потужністю -за чисельністю персоналу	Великі Великі	-
-за обсягом виробництва	Великі	
-за сезонністю виробництва	Внесезонні	
Розташування	Село, місто,	-
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Зерно	-
Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	Професійна освіта Професійна освіта Висококваліфіковані	-
Потенційний обсяг споживання розробки	145 т зерна пшениці та 175 т зерна кукурудзи у рік	-

Таблиця 4.13 – Запланований обсяг реалізації стартап-продукту

	Березень, 2021	Квітень, 2021	Травень, 2020	Червень, 2021	Липень, 2021	Серпень, 2021	Вересень, 2021	Жовтень, 2021	Листопад, 2021	Грудень, 2021	Січень, 2022	Лютий, 2022
Запланований обсяг, т (пшениця)	0	0	0	0	72,5	72,5	0	0	0	0	0	0
Запланований обсяг, т (кукурудза)	0	0	0	0	0	0	87,5	87,5	0	0	0	0

4.5. Ціна іноваційної пропозиції на ринку

Таблиця 4.14 – Проектні ціни продажу пшениці та кукурудзи

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
Пшениця	175	7897,00	175	7450,00
Кукурудза	145	7526,00	145	7100,00

Розраховували ціну за такими основними методами ціноутворення:

1. *Витратний метод*:

$$Ц = C + W, \text{ [грн/од.]}, \quad (1)$$

де Ц – прогнозована ціна товару, грн/од.;

C – розрахована автором ідеї очікувана собівартість товару, грн/од.;

W - фіксований відсоток прибутку від собівартості, грн/од.

Ціна становить:

$$Ц = 963,96 + 963,96 \cdot 7 = 7711,68 \text{ [грн/т]}$$

2. *Агрегатний метод*:

$$Ц = \sum_{i=1}^{i=n} Ц_i, \text{ [грн/од.]}, \quad (2)$$

де Ц – ціна ідеї, за якою автор пропонуватиме її на ринку, грн/од.;

Ц_i – ціна і-того компоненту багатокomпонентного товару, грн/од. (всі компоненти наведенні в табл. 4.17);

Усереднена ціна складає:

$$Ц = 963,96 \text{ грн/т}$$

3. *Параметричний метод* – враховує вагомість якісних параметрів

$$Ц_{н.м.} = Ц_{б.м.} \frac{Б_{н.м.}}{Б_{б.м.}}, \text{ [грн/од.]} \quad (3)$$

де Ц_{н.м.} – ціна нової моделі, тобто ідеї, за якою ми пропонуватимемо її на ринку, грн/од.;

$C_{б.м.}$ – ціна базової моделі, тобто аналогу ідеї, яка вже існує на ринку, грн/од.;

$B_{н.м.}$ – Балова експертна оцінка нової моделі характеристик нової технології;

$B_{б.м.}$ – Балова експертна оцінка базової моделі характеристик існуючої технології.

Таблиця 4.15 – Розрахунок ціни параметричним методом

Продукт	Параметри						Бал з коефіцієнтами вагомості
	Стійкість до гербіцидів		Стійкість до посухи		Урожайність		
	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	
Аналог	45	0,2	45	0,4	70	0,4	$45 \cdot 0,2 + 45 \cdot 0,4 + 80 \cdot 0,4 = 55$
Новий	50	0,2	60	0,4	80	0,4	$50 \cdot 0,2 + 60 \cdot 0,4 + 80 \cdot 0,4 = 66$

Ціна існуючого продукту: 7450 грн/т (пшениця) та 7100 грн/т (кукурудза), таким чином розрахована ціна параметричним методом становить:

$$C_{н.м. \text{ пшениця}} = 7450 \cdot \frac{66}{55} = 8940 \text{ грн/т}$$

$$C_{н.м. \text{ кукурудза}} = 7100 \cdot \frac{66}{55} = 8520 \text{ грн/т}$$

4. Конкурентний метод.

Ціна конкурентів становить 7450 грн/т (пшениця) та 7100 грн/т (кукурудза), але зважаючи на те, використовуватись будуть тільки високоякісні сорти зернових, ціна може бути вищою за ціну конкурентів на 6%.

Тоді ціна пшениці складе – 7897 грн/т, ціна кукурудзи – 7526 грн/т.

5. Метод на основі аналізу точки беззбитковості.

Розрахуємо точку беззбитковості у натуральному вираженні.

ТБ = постійні витрати : (ціна – середні змінні витрати на одиницю продукції).

$$ТБ = 144282,10 / (7711,50 - 513,08) = 20,0 \text{ т}$$

Таким чином, точка беззбитковості досягається при вирощування 20 т

зернових культур.

Таблиця 4.16 – Калькуляція собівартості стартап-продукт

№ з/п	Елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник, грн.
1	Затрати на сировину і матеріали, всього		386 056,00
	у т.ч.		
	Насіння пшениці	3 т	52 500,00
	Насіння кукурудзи	0,28т	58 956,00
	Мінеральні добрива	9 т	173 800,00
	Паливно-мастильні матеріали	3,6 т	100 800,00
2	Амортизація основних засобів господарства, всього	(розраховано прямим методом)	83 897,20
	у тому числі:		
	Трактор	-//-	51 000,00
	Причеп до трактора	-//-	6 560,00
	Плуг	-//-	9 920,00
	Борона	-//-	850,00
	Культиватор	-//-	3 150,00
	Посівна машина	-//-	8 420,10
	Розкидувач добрив	-//-	3 700,00
	Жатка для пшениці	-//-	3 850,00
	Жатка для кукурудзи	-//-	3 442,10
	Прес-пакувальник	-//-	2 925,00
3	Єдиний податок (4 група)	20 га	13 200,00
4	Орендна плата за землю	18 га	64 800,00
5	Ремонт та обслуговування техніки	мото/год	46 600,00
6	Оренда зерновоза	т	48 000,00
7	Витрати на збут	т	86 273,00
8	Витрати на електроенергію	кВт/г	20 160,00
9	Страховий платіж (страхування врожаю)	-	224 000,00
10	Виплата відсотків за кредитом	-	267 554,94
11	Виплата доходу членам господарства	-	480 000,00
12	Інші затрати	-	100 000,00
	Всього		1820541,14
	На 1 т		5 688,68

Таблиця 4.17 – Забезпеченість проекту основними засобами (ОЗ)

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Сівба Обробіток ґрунту від сівби до появи сходів, жнива	Трактор	1 220 000,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Сівба Обробіток ґрунту від сівби до появи сходів, жнива	Причеп до трактору	151 200,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Сівба	Плуг	218 000,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Обробіток ґрунту від сівби до появи сходів	Борона	18 000,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Обробіток ґрунту після появи сходів культур	Культиватор	70 00,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Сівба	Посівна машина	238 402,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Обробіток ґрунту від сівби до появи сходів	Розкидувач добрив	84 000,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Жнива	Жатка для пшениці	92 000,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Жнива	Жатка для кукурудзи	78 848,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит
Прес – пакувальник	Жнива	73 500,00	20 років	Біржа сільгосптехніки	Кредит

Таблиця 4.18 – Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОБФ	Назва	Норма витрат на рік, од.	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина і матеріали	Насіння пшениці	3 т	17500,00	Вітчизняні постачальники	Власні кошти
	Насіння кукурудзи	0,2 т	1550,00	Вітчизняні постачальники	Власні кошти
	Мінеральні і добрива	9 т	19305,56	Вітчизняні постачальники	Власні кошти
Паливно-мастильні матеріали	Паливо	3,03 т	28,00	Вітчизняні постачальники	Власні кошти

У фермерському господарстві працюють члени родини у кількості 4-х чоловік та суміщують декілька функцій, зарплата не виплачується.

Таблиця 4.19 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати
Робочі основні	Механік	1	Повна загальна середня освіта та професійна підготовка на виробництві	-
Спеціалісти	Агроном	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки	-
	бухгалтер	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки	-
Керівники	Директор	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки	-

У якості джерел фінансування для господарства, було обрано такі запозичені джерела: кредити фінансових установ, власні кошти.

Таблиця 4.20 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики, у тому числі: - пшениця - кукурудза	т	В 320 145 175
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times К_{пер}$ $4 \times 1 = 4$
3. у тому числі: - основних - спеціалісти - керівники	Осіб	1 особа 2 особи 1 особа
4. Середньорічний виробіток робітника	т/особу	$ППс.р. = В / Ч_{сп}$ $320 / 4 = 80$

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
5. Капіталовкладення у проект - всього - на одиницю продукції	грн. грн/т	$K = OF + OBK$ $2\,243\,950,00 + 1\,736\,643,94 = 3\,980\,593,94$ $3\,980\,593,94 / 320 = 12\,439,36$
6. Повна собівартість - всього - на одиницю продукції	грн. грн/	$C = A + OBK$ $83\,897,20 + 1\,736\,643,94 = 1\,820\,541,14$ $308\,466,20 / 320 = 5\,689,19$
7. Відносний прибуток	грн/т	$P = C - C$ $P = 7711,50 - 5\,689,19 = 2\,022,31$ (7711,50 – усереднена ціна)
8. Рентабельність	%	$R = (P/C) \times 100$ $R = (2\,022,31 / 5\,689,19) \times 100 = 35,55\%$
9. Період повернення капіталовкладен	років	$T_{пов} = K/P$ $T_{пов} = 3\,980\,593,94 / (2\,022,31 \times 320) = 6,2$
10. Фондовіддача виробничих фондів	грн./грн.	$FB = (C \times V) / OF$ $FB = (7711,50 \times 320) / 2\,243\,950,00 = 0,29$
11. Фондоємкість	грн./грн.	$FC = 1 / FB$ $FC = 1 / 0,29 = 3,45$
12. Продуктивність праці	$\frac{T}{\text{люд.} \cdot \text{год}}$	$PP = V / (C_{сп} \times T)$ $320 / (4 \times 24 \times 365) = 0,01$
13. Коефіцієнт економічної ефективності	-	$E = P/K$ $E = (2\,022,31 \times 320) / 3\,980\,593,94 = 0,16$

4.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Таблиця 4.21 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат, грн
Етап 1	Розробка стартап-	Робота	1 місяць	10000,00

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат, грн
Етап 2 Реалізація ідеї	Підписання контрактів та договорів	Директор	2 місяці	1500000,00
	Закупка матеріалів та техніки	Директор, бухгалтер	2 місяці	
Етап 3 Впровадження у виробництво	Сівба	Механік, агроном, директор	1 місяць	150000,00
	Догляд за урожаєм	Механік, агроном, директор	4 місяці	
	Жнива	Механік, агроном, директор	1 місяць	
Етап 4 Масова реалізація	Продаж зерна	Директор, бухгалтер	2 місяці	100000,00

Таблиця 4.22 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи			
	Директор	Бухгалтер	Агроном	Механізатор
Розробка стартап-проекту	+	-	-	-
Підписання контрактів та договорів	+	+	-	-
Закупка техніки	+	+	-	-
Закупка матеріалів (насіння, добрива)	+	+	+	-

Функції	Елементи			
	Директор	Бухгалтер	Агроном	Механізація
Посівна компанія	+	-	+	+
Догляд за урожаєм	+	-	+	+
Жнива	+	-	+	+
Реалізація зерна	+	+	-	-

4.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Таблиця 4. 23 – Ризики інноваційної розробки

Назва процесу/стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Пошук інформації	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик
	Аналіз ринку	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик Культурно-соціальний, демографічний ризик	Управлінський ризик
	Визначення технології вирощування	Науково-технічний ризик	Управлінський ризик

Назва процесу/стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
	Визначення планового обсягу виробництва та ціни продукту	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик Культурно-соціальний, демографічний ризик	Управлінський ризик
	Аналіз постачальників сировини та метеріалів	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик Операційний ризик Транспортний ризик
	Аналіз конкурентів	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик
Реалізація ідеї	Пошук інвесторів	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Інвестиційний ризик	Управлінський ризик
	Аналіз сільськогосподарської техніки	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик	Управлінський ризик Операційний ризик

Назва процесу/стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
	Закупівля сільськогосподарської техніки	Науково-технічний ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик Операційний ризик
Впровадження у виробництво	Організація виробничого процесу	Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик Операційний ризик Майновий ризик
	Погодні умови	Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик Операційний ризик Майновий ризик
Масова реалізація	Прожаж урожаю	Політико-законодавчий ризик Макро-економічний ризик Податковий ризик Ринковий ризик	Управлінський ризик Операційний ризик

Таблиця 4.24 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Об'єкт ризику	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на результат
Пошук інформації	Знаходження неправдивої, неактуальної	Низька	Високий. Проблеми на початковому етапі створення господарства.

Продовження табл. 4.24

Об'єкт ризику	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на результат
	інформації		Неврахування можливості впровадження нових законодавчих норм.
Аналіз ринку	Недостовірний аналіз кон'юнктури ринку	Низька	Середній. Необгрунтоване визначення пріоритетів загальної і ринкової стратегії господарства, неадекватна оцінка потреб сфери споживання і власного виробництва.
Визначення технології виробництва	Поява нових технічних і технологічних досягнень	Середня	Середній. Можливість надто швидкого техніко-економічного старіння.
Розробка маркетингової політики, визначення планового обсягу виробництва та ціни продукту	Маркетингові ризику	Середня	Високий. Невідповідність цін, передбачених бізнес-планом, та реальних ринкових цін. Недостатнє ресурсне забезпечення виробництва. Недостатньо обгрунтована сегментація ринку збуту. Помилковий вибір цільового сегмента ринку, стратегії продажу продукту, організації системи логістики та трансфертних моделей реалізації продукту. Неадекватні результати маркетингових досліджень через їх нераціональну організацію. Помилкова стратегія і тактика ціноутворення.

Об'єкт ризику	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на результат
Аналіз постачальників сировини	Ризики, пов'язані із системою взаємодії з партнерами та контрагентами	Низька	Низький. Недостатньо налагоджена система взаємодії з партнерами та контрагентами. Відмова постачальників від попередньо укладених контрактів.
Аналіз конкурентів	Ризики, пов'язані з непередбаченою конкуренцією	Середня	Середній. Виникнення нових фірм-конкурентів Експансія з боку іноземних експортерів. Створення аналогічної продукції. Зниження конкурентами цін на аналогічну продукцію.
Пошук інвесторів	Ризики, пов'язані з незабезпеченістю підприємницької ідеї (проекту) фінансовими ресурсами (інвестиціями)	Висока	Високий. Відсутність або недостатність коштів для самофінансування. Відсутність реального джерела зовнішнього інвестування. Недоліки вибраного методу фінансування. Утрата джерела фінансування проекту в процесі його реалізації.
Аналіз сільськогосподарської техніки	Некоректний аналіз сільськогосподарської техніки	Низька	Середній. Можливість помилитись із можливостями і функціоналом сільськогосподарської техніки.
Закупівля сільськогосподарської техніки	Закупівля неякісної сільськогосподарської техніки або	Низька	Середній. Закупка невідповідної техніки в результаті чого працювати з ним, внаслідок чого неможливість або

Об'єкт ризику	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на результат
	переплата		складно, можливість зростання собівартості продукції.
Найняття персоналу	Неспроможність працівників освоювати нове обладнання та технологій	Низька	Низький. Плинність кадрів
Експлуатація сільськогосподарської техніки	Неправильне експлуатація сільськогосподарської техніки	Низька	Високий. Перевитрати, що виникли внаслідок зриву планів робіт проекту, пошкодження техніки. Порушення прогностичних термінів одержання доходів.
Організація виробничого процесу	Некоректна організація виробничого процесу	Низька	Високий. Можливість виникнення додаткових витрат, які пов'язані з перебоями чи зупинкою виробничих процесів, порушенням технології виконання операцій.
Залучення покупців	Погане залучення покупців	Середня	Середній. Ненадійні покупці можуть зашкодити підприємству
Розробка реклами	Неефективна реклама	Низька	Низький. Зменшення прибутку та довіри потенційних покупців.
Прийом замовлень та нарощування бази покупців	Непередбачуване обсягів закупівель, падіння попиту	Низька	Середній. Зниження обсягів реалізації, збільшення витрат на одну одиницю об'єму реалізованого товару

Таблиця 25 – Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		1	2	3
Високий рівень впливу	3	9 (3*3)	3 (3*1)	3 (3*1)
Середній рівень впливу	2	8 (2*4)	6 (2*3)	
Низький рівень впливу	1	3 (1*3)		

Таблиця 26 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Очікувані результати від впровадження методів управління
Пошук інформації	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Визначення технології виробництва	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Розробка маркетингової політики, визначення планового обсягу виробництва та ціни продукту	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Аналіз конкурентів	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Пошук інвесторів	Ухилення від ризику Прийняття ризику Передача ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Аналіз обладнання	Ухилення від ризику	Запобігання та

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Очікувані результати від впровадження методів управління
	Попередження ризику	мінімізація впливу ризиків на результат
Встановлення обладнання	Ухилення від ризику Попередження ризику Передача ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Організація виробничого процесу	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат
Залучення покупців	Ухилення від ризику Попередження ризику	Запобігання та мінімізація впливу ризиків на результат

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

Система заходів з охорони праці, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності людини забезпечують шляхом виконання вимог Закону України «Про охорону праці» та інших чинних нормативно-правових актів і нормативних документів з охорони праці.

Відповідно до Кодексів законів про працю України [101] допускаються до прийняття на роботу особи, які досягли 18-ти річного віку та, у разі необхідності, пройшли медичний огляд згідно з наказом Міністерства охорони здоров'я від 21.05.2007 № 246 «Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій» [102].

Відповідно до [101] обов'язок працівника виконувати вимоги нормативних актів про охорону праці, а саме:

- знати і виконувати вимоги нормативних актів про охорону праці, правила поводження з машинами, механізмами, устаткуванням та іншими засобами виробництва, користуватися засобами колективного та індивідуального захисту;
- дотримуватися зобов'язань щодо охорони праці, передбачених колективним договором (угодою, трудовим договором) та правилами внутрішнього трудового розпорядку підприємства, установи, організації;
- проходити у встановленому порядку попередні та періодичні медичні огляди;
- співробітничати з власником або уповноваженим ним органом у справі організації безпечних та нешкідливих умов праці, особисто вживати посилюючих заходів щодо усунення будь-якої виробничої ситуації, яка створює загрозу його життю чи здоров'ю або людей, які його оточують, і навколишньому природному середовищу, повідомляти про небезпеку свого безпосереднього керівника або посадову особу.

Законом України «Про охорону праці» [103] встановлено, що працівники під час прийняття на роботу і в процесі роботи повинні проходити за рахунок

роботодавця інструктаж, навчання з питань охорони праці, з надання першої медичної допомоги потерпілим від нещасних випадків і правил поведінки у разі виникнення аварії.

Працівники, зайняті на роботах з підвищеною небезпекою або там, де є потреба у професійному доборі, повинні щороку проходити за рахунок роботодавця спеціальне навчання і перевірку знань відповідних нормативно-правових актів з охорони праці.

Згідно з [104] на підприємстві повинні бути створені для кожного працівника здорові і безпечні умови праці. При цьому необхідно дотримуватись виключення небезпек, якщо це є можливим і реальним;

- обмеження небезпек, яких уникнути неможливо;
- усунення небезпек у їх першоджерелах, виключення або максимальне обмеження впливу небезпечних і шкідливих виробничих чинників;
- забезпечення пріоритету колективних засобів захисту над індивідуальними;
- врахування людського фактору, зокрема під час вибору засобів виробництва, технології, організації праці, устаткування робочих місць тощо.

Основними складовими безпеки праці на виробництві є:

- безпечне виробниче обладнання;
- безпечні технологічні процеси;
- організація безпечного виконання робіт.

Безпечність виробничого обладнання – це властивість виробничого обладнання відповідати вимогам безпеки праці під час монтажу (демонтажу) і експлуатації в умовах, установлених нормативною документацією.

Безпечність виробничого процесу – це властивість виробничого процесу відповідати вимогам безпеки праці під час проведення його в умовах, установлених нормативною документацією [105].

Вимоги до безпечності технологічного обладнання підприємства, виробничих процесів, а також до безпечності будівель та споруд визначені законодавством.

Рівень пожежної безпеки робочих зон, приміщень та інженерного устаткування повинен відповідати вимогам Правил пожежної безпеки в Україні, затверджених наказом МНС України від 19.10.2004 № 126, зареєстрованих в Міністерстві юстиції України 4.11.2004 за № 1410/10009 (НАПБ А.01.001 - 04), та інших нормативно-правових актів з питань пожежної безпеки.

Облаштування всіх робочих зон повинно проводитись з урахуванням вимог Законів України «Про охорону праці», «Про основи соціального захищеності інвалідів в Україні» та постанови Кабінету Міністрів України від 31.01.2007 № 70 «Про реалізацію статей 19 і 20 Закону України «Про основи соціальної захищеності інвалідів в Україні».

Упродовж робочого часу в робочих приміщеннях забезпечується мікроклімат, що відповідає фізіологічним потребам організму працюючих, із врахуванням енергетичних витрат на виконувану роботу згідно з ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень».

Для людини навколишнє повітряне середовище є найважливішим фактором її існування і воно повинно мати визначені фізичні та хімічні властивості. Фізичні властивості можуть бути представлені параметрами мікроклімату (температура, вологість, швидкість руху повітря, барометричний тиск), іонним складом, електромагнітними та акустичними полями, густиною, прозорістю тощо. Іншим найважливішим показником якості повітряного середовища є його хімічний склад, обумовлений природним складом повітря та різними забрудненнями.

Значення параметрів мікроклімату суттєво впливають на самопочуття та працездатність людини і, як наслідок цього, на рівень травматизму.

Завдання по забезпеченню найкращих умов праці, коли не відбувається перенапруження механізму терморегуляції, повинне вирішуватися з врахуванням трьох основних параметрів - температури, відносної вологості і швидкості руху повітря.

У основу принципів нормування параметрів мікроклімату покладена диференційована оцінка оптимальних і допустимих метеорологічних умов в робочій зоні залежно від категорії робіт по ступеню важкості і періоду року.

Створення оптимальних метеорологічних умов у виробничих приміщеннях є складним завданням, вирішити яке можна за допомогою наступних методів і засобів:

- удосконаленням технологічних процесів/устаткування;
- впровадження нових технологій і устаткування, не пов'язаних з необхідністю проведення робіт в умовах інтенсивного нагрівання (зменшення виділення тепла у виробничі приміщення);
- раціональне розміщення технологічного устаткування – основні джерела теплоти розміщують безпосередньо під аераційними ліхтарями, біля зовнішніх стін і в один ряд;
- автоматизація і дистанційне керування технологічними процесами;
- раціональна вентиляція, опалювання і кондиціювання повітря;
- раціоналізація режимів праці і відпочинку – досягається скороченням тривалості робочої зміни, введенням додаткових перерв, створенням умов для ефективного відпочинку в приміщеннях з нормальними метеорологічними умовами, вживанням мікрокліматичних оазисів усередині виробничих приміщень з надлишками тепла. Для працівників, що працюють на відкритому повітрі взимку обладнувати приміщення для обігріву з температурою вище за комфортну;
- використання теплоізоляційних матеріалів і захисних екранів. У приміщеннях із значними площами застелених поверхонь передбачаються заходи захисту від перегрівання при попаданні прямих сонячних променів в теплий період року (орієнтація віконних прорізів схід-захід, улаштування жалюзі та ін.);
- використання засобів індивідуального захисту.

Для створення нормальних умов виробничої діяльності необхідно забезпечувати не лише комфортні метеорологічні умови, але й необхідну

чистоту повітря. Унаслідок виробничої діяльності в повітряне середовище приміщень можуть викидатися різні шкідливі речовини, які використовуються в технологічних процесах. Шкідливими вважаються речовини, які при контакті з організмом людини за умови порушення вимог безпеки можуть привести до виробничої травми, професійному захворюванню або розладу в стані здоров'я, які визначаються сучасними методами як в процесі праці, так і у віддалені терміни життя сьогодення і подальших поколінь.

Успіх функціонування будь-якої системи регулювання якості повітряного середовища залежить від ефективності всіх її ієрархічних та функціональних рівнів. Для сучасного підприємства найбільш розповсюдженим інженерним методом впливу на параметри повітряного середовища є організація належного повітрообміну (вентиляції) у приміщеннях, а також локалізація джерел викидів з наступним видаленням забрудненого повітря та його очищенням (аспірація).

Вентиляція – це організований і регульований повітрообмін, що забезпечує видалення з приміщення забрудненого повітря і подачу на його місце свіжого. Задачею вентиляції є забезпечення чистоти повітря та заданих метеорологічних умов у виробничих приміщеннях.

За способом переміщення повітря розрізняють системи природної, механічної та змішаної вентиляції.

Системи кондиціонування повітря повинні забезпечувати нормовані метеорологічні параметри та чистоту повітря в приміщенні при заданих параметрах зовнішнього повітря для теплого та холодного періодів року згідно ДСН 3.3.6.042-99 (Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень) [106].

Виробниче обладнання повинно бути забезпечене місцевим освітленням, виконаним відповідно до вимог чинних нормативів, якщо його відсутність може спричинювати перевантаження органів зору або інші небезпеки, пов'язані з експлуатацією цього обладнання.

Освітлення робочих зон повинно відповідати вимогам ДБН В.2.5-28-2006 «Природне і штучне освітлення», затверджених наказом Міністерства

будівництва, архітектури та житлово-комунального господарства України від 15.05.2006 № 168.

Все електрообладнання (корпуси електричних машин, апаратів, світильників, розподільчих пристроїв, металеві корпуси пересувних та переносних електроприймачів тощо) повинне мати надійне захисне заземлення або занулення [107].

Виробничі процеси не повинні забруднювати навколишнє середовище викидами шкідливих та небезпечних речовин, а також спричинювати вибухи та пожежі. Якщо під час технологічного процесу виявляються певні небезпеки, то це зазвичай наслідки помилок, які були допущені ще на стадії його розробки та проектування. Тому при проектуванні, організації та проведенні технологічних процесів необхідно передбачати:

- усунення безпосереднього контакту працівників з вихідними матеріалами, заготовками, напівфабрикатами, готовою продукцією та відходами виробництва, які чинять на них небезпечний та шкідливий вплив;

- заміну технологічних процесів та операцій, пов'язаних з виникненням небезпечних та шкідливих виробничих чинників, процесами та операціями, при виконанні яких ці чинники відсутні або мають меншу інтенсивність;

- застосування комплексної механізації, автоматизації та комп'ютеризації виробництва;

- застосування дистанційного керування технологічними процесами та операціями за наявності небезпечних і шкідливих виробничих чинників у робочій зоні;

- застосування засобів колективного захисту працюючих;

- раціональну організацію праці та відпочинку з метою профілактики монотонності (одноманітності дії та сприйняття інформації) та гіподинамії (обмеження рухової активності), а також зниження важкості праці;

- своєчасне отримання інформації про виникнення небезпечних та шкідливих виробничих чинників на окремих технологічних операціях;

- запровадження систем керування технологічними процесами, які забезпечують захист працівників та аварійне вимкнення виробничого устаткування;

- своєчасне видалення та знешкодження відходів виробництва, які є джерелами небезпечних і шкідливих виробничих чинників;

- забезпечення пожежо- та вибухобезпеки.

Застосування нових нешкідливих і негорючих матеріалів, замкнених безвідходних технологій, комплексної механізації, автоматизації, комп'ютеризації виробничих процесів, створення оптимальних умов праці сприяють усуненню або зменшенню кількості несприятливих виробничих чинників, а відтак – запобігають виникненню нещасних випадків, отруєнь, професійних захворювань, аварій та пожеж [108].

Єдині загальні вимоги щодо діяльності людини в умовах підвищеної біологічної безпеки встановлено в [109]. Цей стандарт поширюється на роботи з біологічними об'єктами в усіх сферах діяльності народного господарства, де має місце біологічна безпека.

Біологічна безпека (біобезпека) – це стан середовища життєдіяльності людини, при якому відсутній негативний вплив його чинників (біологічних, хімічних, фізичних) на біологічну структуру і функцію людської особи в теперішньому і майбутніх поколіннях, а також відсутній незворотній негативний вплив на біологічні об'єкти природнього середовища (біосферу) та сільськогосподарські рослини і тварини.

За визначенням ВООЗ, лабораторна біобезпека описує принципи ізолювання, технології і методи, що використовуються для запобігання ненавмисного впливу патогенів і токсинів, або їх випадкового розповсюдження.

Одним з головних пріоритетів навчальних і науково-дослідних лабораторій біологічного профілю має стати неухильне дотримання норм і правил біобезпеки і біозахисту. У всіх без винятку біологічних лабораторіях існують більші чи менші ризики біологічної безпеки. Під час проведення багатьох видів лабораторних робіт можливе інфікування працівників

лабораторії, а також осіб, що контактують з їхнім персоналом. Неправильне поводження з об'єктом дослідження, недостатність застережних, ізоляційних і захисних заходів у таких лабораторіях, крім внутрішніх біобезпекових загроз, може водночас створювати біологічну небезпеку для довкілля. Заходи щодо попередження біологічних ризиків негативного впливу патогенів, токсинів, або їх випадкового розповсюдження в лабораторних умовах описує лабораторна біобезпека. Дотримання її відповідних принципів і практик знижує ризик випадкового інфікування, втрати, крадіжки або використання не за призначенням небезпечного біологічного матеріалу, або неналежного поводження з ним.

У світі основоположним документом з біологічної безпеки є «Посібник з біологічної безпеки лабораторій» (Laboratory Biosafety Manual. World Health Organization.), перша публікація в 1983 році, підготовлений ВООЗ. Цей посібник надає практичні рекомендації щодо методів забезпечення біобезпеки для використання в лабораторіях усіх рівнів.

Основні запобіжні заходи з лабораторної біологічної безпеки загального характеру:

- Доступ до лабораторії обмежується на підставі рішення завідувача лабораторії в той час, коли проводяться експерименти або робота з мікробіологічними культурами, або біологічно небезпечними зразками.

- Персонал лабораторії зобов'язаний здійснювати дезинфікаційну обробку рук після роботи з біологічним матеріалом, після зняття захисних рукавиць, перед виходом з приміщення лабораторії.

- У робочій зоні лабораторії забороняється вживати їжу, палити, знімати або одягати контактні лінзи, наносити косметику і зберігати продукти харчування. Співробітники, які носять контактні лінзи, повинні користуватися запобіжними щитками або захисними екранами. Харчові продукти повинні зберігатися за межами робочої зони у спеціально відведених і призначених виключно для цієї мети шафах або холодильниках.

– Забороняється здійснювати піпетування будь-яких рідин за допомогою рота.

Персонал лабораторії, допущений до роботи має попередньо пройти спеціальний інструктаж і підготовку із біологічної і загальної безпеки.

– Деконтамінацію всіх робочих поверхонь необхідно проводити щонайменше один раз в день, а також щоразу після потрапляння на них біологічного матеріалу.

– Перед тим, як викидати відходи будь-яких мікробіологічних культур, що використовувалися у роботі або зберігалися в колекціях, необхідно проводити їх деконтамінацію будь-яким затвердженим способом (в автоклаві, кип'ятінням, із застосуванням дезінфікуючих засобів тощо).

– У разі, якщо біологічний матеріал планується деконтамінувати за межами робочої зони, перед винесенням з лабораторії він повинен бути поміщений у міцний герметичний контейнер, який щільно закривається і придатний для обробки дезінфікуючим розчином. Процедура упакування біологічного матеріалу, який підлягає деконтамінуванню за межами лабораторії, перед винесенням з робочого приміщення проводиться згідно з відповідними затвердженими правилами та інструкціями.

Специфічні процедури з біобезпеки визначаються для кожної лабораторії окремо, враховуючи специфіку робіт, що виконуються у даній лабораторії.

Для визначення специфічних процедур для конкретної лабораторії важливим є правильно оцінити біологічні ризики, і розробити відповідні заходи безпечної роботи. При оцінці біологічних ризиків важливою складовою є встановлення цінності біологічного матеріалу та забезпечення його захисту. Такий підхід підкреслює відповідальність кожної установи для гарантування безпечної і надійної роботи у лабораторіях.

Оскільки у лабораторіях загроза біологічної небезпеки найчастіше виникає через:

– специфічні характеристики організмів, з якими передбачається проводити експерименти;

– специфічні характеристики піддослідних тварин, які можуть бути використані у роботі;

– обладнання і процедури що застосовуюється в роботі;

– ізолювальне обладнання та засоби захисту.

Тому, для встановлення оцінки рівня біологічної безпеки беруться до уваги організми, які використовуються у дослідженнях (патогенні агенти), доступні засоби, а також обладнання, що використовується в практичній роботі і процедури, необхідні для безпечного проведення роботи в лабораторії. На рівень лабораторної безпеки при проведенні досліджень із патогенними мікроорганізмами впливають два основні фактори – технічний і людський.

Технічний фактор – система організаційних та інженерно-технічних заходів і засобів для захисту персоналу лабораторій, населення та довкілля від впливу патогенних біологічних агентів.

Людський фактор ґрунтується на професійному рівні та ступені відповідальності персоналу лабораторій [110].

Охорона навколишнього середовища – це система заходів щодо раціонального використання природних ресурсів, збереження особливо цінних та унікальних природних комплексів і забезпечення екологічної безпеки. Це сукупність державних, адміністративних, правових, економічних, політичних і суспільних заходів, спрямованих на раціональне використання, відтворення і збереження природних ресурсів землі, обмеження негативного впливу людської діяльності на навколишнє середовище.

Охорона навколишнього природного середовища, раціональне використання природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки життєдіяльності людини – невід’ємна умова сталого економічного та соціального розвитку України. З цією метою Україна здійснює на своїй території екологічну політику, спрямовану на збереження безпечного для існування живої і неживої природи навколишнього середовища, захисту життя і здоров’я населення від негативного впливу, зумовленого забрудненням навколишнього природного середовища, досягнення гармонійної взаємодії

суспільства і природи, охорону, раціональне використання і відтворення природних ресурсів [111].

Заходи з охорони повинні ґрунтуватися на підставі виконання вимог відповідних статей Закону України «Про охорону навколишнього природного середовища», Закону України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення», Земельного, Водного та Лісового кодексів України, інших чинних в Україні нормативно-правових актів та НД із захисту довкілля і здоров'я людини.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано існуючі методи генетичної трансформації рослин та обрано *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію; При дослідженні експресії у дводольних рослинах не варто використовувати регуляторні елементи для однодольних рослин при конструюванні вектору, адже за таких умов ефективність векторної конструкції не буде розкрита повною мірою.

- Отримано покоління T₁ рослин тютюну з насіння трансформованих регенерантів T₀ та підтверджено наявність трансгена *bar* що свідчить про стабільність успадкування генетичної перебудови в ряду поколінь.

- За використання якісних та кількісних методів було встановлено оптимальне поєднання штамів *Agrobacterium tumefaciens* та векторних конструкцій, а саме: штам *GV3101* та вектор pICBV16 показали найвищий рівень експресії; штам *C58* та вектор pCB203 дали прийнятні результати; штам *GV3101* та вектор pCB203 виявили експресію на рівні контролю.

- Проведено кількісну оцінку рівня загального розчинного білку за методом Бредфорта та ферменту β-глюкуронідази використовуючи флуориметричне визначення.

- Наведено заходи охорони праці та розроблено стартап проект, розраховано основні економічні показники: основні засоби – 2244,0 тис. грн, оборотні засоби – 1736,6 тис. грн., капіталовкладення 3980,6 тис. грн, собівартість – 1820,5 тис. грн, виручка – 647,0 тис. грн., рентабельність – 35,55%, період окупності – 6,2 років.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біотехнологія: підручник / В.Г. Герасименко та ін. ; за заг. ред. В.Г. Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
2. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навч. посіб. / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
3. Воробйова Л. І., Тагліна О. В. Генетичні основи селекції рослин і тварин: навч. посіб. Харків : Ранок, 2007. 224 с.
4. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
5. Чекалин Н.М. Генетика как теоретическая основа селекции сельскохозяйственных культур: Методы получения генетически модифицированных растений. URL: https://agromage.com/stat_id.php?id=451 (дата звернення 01.06.2020).
6. Пономарьов П.Х., Притульська Н.В., Донцова І.В. Генетично модифіковані організми: трансгенні культури, ферментні препарати, харчові продукти : монографія. Київ : нац. торг.-екон. ун-т, 2014. 208 с.
7. Дробот К.О., Матвеева Н.А., Шаховський А.М. Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia Vulgaris L.*, *Artemisia Annuua L.* Та *Ruta Graveolens L.* З використанням *Agrobacterium Rhizogenes*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Том 19. С. 117–120. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2016_19_26/ (дата звернення 02.06.2020).
8. Сатарова Т.М., Абраїмова О.Є., Вінніков А.І., Черенков А.В. Біотехнологія рослин : навчальний посібник. Дніпро : Адверта, 2016. 136 с.
9. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев : Наукова думка, 1984. 159 с.
10. Лобова О.В., Пилипчук О.О. Навчальне видання. Конспект лекцій для студентів спеціальності 6.090105 – Захист рослин. Київ, 2014. 118 с. URL: <https://nubip.edu.ua/sites/default/files.pdf> (дата звернення 02.06.2020).

11. Krens E.A., Molendijk L., Wullems G.I., Schilperoort R. A. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*.1982. Vol. 296, No 5852. P. 72–74.
12. Li G. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms / Li G., Li R., Liu Q. [et al.]. *FEMS Microbiol Lett*. 2006. Vol. 256. P. 203–208.
13. Gietz R. D., Schiest R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protocols*. 2007. Vol. 2. P. 31–34.
14. Yen-Chun Liu, Luis Vidali. Efficient Polyethylene Glycol (PEG) Mediated Transformation of the Moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Visualized Experiments* : *JoVe*, 19 Apr 2011, (50): e2560. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169274/pdf/jove-50-2560.pdf> (дата зверення 10.10.2020).
15. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ. 2014. 247 с.
16. Матвеева Н.А. Створення рослин – продуцентів біологічно активних сполук шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації : дис...док. біолог. наук. : 03.00.20 / Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Київ, 2015. 316 с.
17. Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V., Fromm M.E. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.1985. Vol. 82, No 17. P. 5824–5825.
18. Chunye Zhang, Hanhua Hu. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Marine Genom*. 2014. Vol. 16. P. 63–66.
19. Nermin Adel Semaary. Optimized electroporation-induced transformation in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *BASE*. 2010. Vol. 14. P. 149–152.
20. Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos / Andreas Klöti et. al. *Plant Cell Rep*. 1993. Vol. 12. P. 671–675.

21. Sylvester Anami, Elizabeth Njuguna, Griet Coussens, Stijn Aesaert, Mieke Van Lijsebettens. Higher plant transformation: principles and molecular tools. *Ime. J. Dev. Biol.* 2013, Vol. 57. P. 483–494.
22. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles / Theodore M. Klein et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 4305–4309.
23. Shrawat A.K., Lörz Horst. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J.* 2006, Vol. 6. P. 575–603.
24. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation / Huixia Shou et. al. *Molecular Breeding.* 2004. Vol. 13. P. 201–208.
25. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA Microinjection / Masani M.Y.A. et. al. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, No 5. e96831. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018445/> (дата звернення 18.09.2020).
26. Stanton B. Gelvin. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2003. Vol. 67, No 1. P. 16-37.
27. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation / Roger P. Hellens et. al. *Plant Molecular Biology.* 2000. Vol. 42. P. 819–832.
28. Todd R Steck. Ti plasmid type affects T-DNA processing in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters.* 1997. Vol. 147. P. 121–125.
29. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome / Shaw G.M.et. al. *Science.* 1984, Vol. 226. P. 1165–1171.
30. Jen G.C., Chilton M.D. The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA

transformation. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 1986. Vol. 83, No 11. P. 3895–3899.

31. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень Agrobacterium-опосередкованої трансформації пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2018. Т. 50, № 3. С. 187–217.

32. Kohli A., Miro B., Twyman R.M. In book: *Biotech Plants, Volume 1: Concepts & Development*. / Chapter: Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: Kole C., Michler C.H., Abbott A.G., Hall T.C. (eds) *Transgenic Crop Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. P.201-238

33. Albert Lu, Scott Diehn, Mark Cigan. Chapter 1 Maize Protein Expression. In book: *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*. Publisher : Springer-Verlag New York. Editors: Azhakanandam K, Silverstone A, Daniell H, Davey MR. April 2015. P. 3–40

34. Щербак Н.Л. Вивчення lox-опосередкованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах : дис.... канд. біолог. наук. : 03.00.20 / Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Київ, 2015. 148 с.

35. Joan T. Odell, Ferenc Nagy, Nam-Hai Chua. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985. Vol. 313. P. 810–812.

36. Differential gene expression in nematode induced feeding structures of transgenic plant harbouring promoter-gusA fusion constructs / Goddijn O.J.M. et. al. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. 1993. Vol 4, No 5. P. 863–873.

37. Continual green fluorescent protein monitoring of Cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidjs thaliana* / Urwin P.E. et. al. *Viol Plant Microbe*. 1997. Vol. 10. P. 394–400.

38. Benfey P.N., Chua N.-H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*. 1990. Vol.250. P. 959–966.

39. Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter

activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 1992. Vol.18. P. 675–689.

40. McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell.* 1990. Vol. 2. P. 163–171.

41. Brachypodium distachyon promoters as efficient building blocks for transgenic research in maize / Coussens G.et. al. *J Exp Bot.* 2012. Vol. 63. P. 4263–4273.

42. Karimi M., Inze D., Van Lijsebettens M., Hilson P. Gateway vectors for transformation of cereals. *Trends Plant Scitnce.* 2013. Vol.18. P. 1–4.

43. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) polyubiquitin gene (PvUbi1 and PvUbi2) promoters for use in plant transformation / Mann D.G.J.et. al. *BMC Biotechnol.* 2011. Vol.11. P: 74–87.

44. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways / Naqvi S. et. al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. Vol.106. P. 7762–7767.

45. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene / Mariani C.et. al. *Nature.* 1990. Vol. 347. P. 737–741.

46. Byzova M., Verduyn C., De Brouwer D., De Block M. Transforming petals into sepaloid organs in *Arabidopsis* and oilseed rape: implementation of the hairpin RNA-mediated gene silencing technology in an organ-specific manner. *Planta.* 2004. Vol. 218. P. 379–387.

47. Padidam M. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2003. Vol. 6. P. 169–177.

48. Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells / Bortesi L. et. al. *BMC Biotechnol.* 2012. Vol. 12: 40. URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/40> (дата звернення 05.11.2020).

49. Lloyd A.M., Schena M., Walbot V., Davis R.W. Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science.* 1994 Vol. 266. P. 436–439.

50. Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco / Aoyama T. et. al. *Plant Cell*. 1995. Vol. 7. P. 1773–1785.
51. Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in Arabidopsis thaliana / Roslan H.A. et. al. *Plant J*. 2001. Vol. 28. P. 225–235.
52. In plant activation: an inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants / Dugdale B. et. al. *Plant Cell*. 2013. Vol. 25. P. 2429–2443.
53. PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups / Chang W.-C. et. al. *BMC Genomics*. 2008, 9, Article number: 561. URL: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-561> (дата звернення 02.11.2020).
54. GRASSIUS: A Platform for Comparative Regulatory Genomics across the Grasses / Alper Yilmaz et. al. *Plant Physiol*. 2009. Vol. 149, No 1. P. 171–180.
55. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences / Magali Lescot et. al. *Nucleic Acids Res*. 2002. Vol. 1, No 30. P. 325–327.
56. Olga G. Smirnova, Salmaz S. Ibragimova, Alex V. Kochetov. Simple database to select promoters for plant transgenesis. *Transgenic Research*. 2012. Vol. 21. P. 429–437.
57. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants / Sawant S.V. et. al. *J Genet*. 1990. Vol. 78. P. 123–131.
58. Context sequences of translation initiation codon in plants / Joshi C.P. et. al. *Plant Mol Biol*. 1997. Vol. 35. P. 993–1001.
59. Promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation / Rothstein S.J. et. al. *Gene*. 1987. Vol. 53. P. 153–161.
60. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system / Frame B.R. et. al. *Plant Physiol*. 2002. Vol. 129. P. 13–22.

61. Cstrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops / Stavolone L. et. al. *Plant Mol Biol.* 2003. Vol. 53. P. 663–6673.
62. Mitsuhashi I., Ugaki M., Hirochika H. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 1996. Vol. 37, No 1. P. 49–59.
63. Nagaya S., Kawamura K., Shinmyo A., Kato K. The MSP terminator of *Arahidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol.* 2010. Vol. 51. P. 328–332.
64. De Roeder E.J., Vargo-Gogola T.C., Diehn S.H., Green P.J. Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol.* 1998. Vol. 117. P. 1445–1461.
65. Genome level analysis of rice mRNA 3'-end processing signals and alternative polyadenylation / Shen Y. et. al. *Nucl Acids Res.* 2008. Vol. 36. P. 3150–3161.
66. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene / An G. et. al. *Plant Cell.* 1989. Vol.1. P. 115–122.
67. Gil A., Proudfoot N.J. Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit beta-globin mRNA 3' end formation. *Cell.* 1987. Vol. 49. P. 399–406.
68. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells / Ingelbrecht I.L. et. al. *Plant Cell.* 1989. Vol.1. P. 671–680.
69. Knirseh L., Clerch L.B. A region in the 3' UTR of MnSOD RNA enhances translation of a heterologous RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. Vol. 272. P. 164–168.
70. Ali S., Taylor W.C. Quantitative regulation of the *Flaveria Mel* gene requires interactions between the 3' untranslated region and sequences near the amino terminus. *Plant Mol Biol.* 2001. Vol. 46. P. 251–261.

71. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 1962. Vol. 59. P. 223–239.
72. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein / Prasher D.C. et. al. *Gene*. 1992. Vol. 111. P. 229–233.
73. Niedz R.P., Sussman M.R., Satterlee J.S. Green fluorescent protein: an in vivo reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep*. 1995. Vol. 14. P. 403-406.
74. Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997. Vol. 94. P. 2122–2127.
75. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*. 1987. Vol. 6. P. 3901–3907.
76. Miki B., Mchugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*. 2004. Vol. 107. P. 193-232.
77. Ow D.W., Wood K.V., Deluca M., de Wet J.R., Helinski D.R., Howell S.H. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*. 1986. Vol. 234. P. 856–859.
78. Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants / Millar A.J. et. al. *Plant Mol Biol Rep*. 1992. Vol. 10. P. 324–337.
79. Xu X., Xie Q., McClung C.R. Robust circadian rhythms of gene expression in *Brassica rapa* tissue culture. *Plant Physiol*. 2010. Vol. 153. P. 841–850.
80. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 1951. Vol. 62, No 3. P. 293–300.
81. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys Pla*. 1962. Vol.15, No 3. P. 473 – 497.
82. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: пер. с англ./под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. Москва : Мир. 1991. 408 с.

83. Матвеева Н. А., Кіщенко О. М., Шаховський А. М., Кучук М. В.. Синтез інсуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*. *Біотехнологія*. 2011. Т.4. № 3. С. 56–63.
84. Stewart N.C. Jr., Laura E. Via a rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR application. *BioTechnique*. 1993. Vol. 14, No 5. P. 748–749.
85. Lipp Joao K.H., Brown T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 Rif^r:pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Rep.* 1993. Vol. 12. P. 422–425.
86. Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 626 p.
87. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. Vol. 5. P. 387–405.
88. Schöb H., Kunz C., F. Meins Jr. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet.* 1997. Vol. 256, No 5. P. 581–585.
89. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* / Marillonnet S. et. al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, No 18. P. 6852–6857.
90. Qiu W., Park W., Scholthof H. B. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2002. Vol. 15, No 3. P. 269–280.
91. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003. Vol. 33, No 5. P. 949–956.
92. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. No 72. P. 248–254.

93. Horsh R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 1985. Vol. 227, No 4691. P. 1229–1231.

94. Gallois Patrick, Marinho Paulo. Leaf Disk Transformation Using *Agrobacterium tumefaciens*-Expression of Heterologous Genes in Tobacco Methods. *Mol Biol*. 1995. Vol. 49. P. 39–48.

95. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashito T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant*. 1994. Vol.6. P. 271–282.

96. Bhullar S., Chakravarthy S., Advani S. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: ciselements in a novel DNA context versus domain swapping. *Plant Physiol*. 2003. Vol. 132, No 2. P. 988–998.

97. Acharya S., Ranjan R., Pattanaik S. Efficient chimeric plant promoters derived from plant infecting viral promoter sequences. *Planta*. 2014. Vol. 239, No 2. P. 381–396.

98. Omirulleh S., Abraham M., Golovkin M. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol*. 1993. Vol. 21, No 3. P. 415–428.

99. Guivarc'h A. , Caissard J. C., Azmi A. In situ detection of expression of the gus reporter gene in transgenic plants: ten years of blue gene. *Transgenic Research*. 1996. Vol. 5, No 5. P. 281–288.

100. Міжнародна класифікація товарів і послуг для реєстрації знаків (Ніццька класифікація) [Електронний ресурс]. URL: <https://nice.uipv.org/>.

101. Кодекс законів про працю України, затверджений Законом № 322-VIII від 10.12.71 ВВР, 1971, додаток до № 50, ст. 375. Дата оновлення: 19.08.2018. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/322-08> (дата звернення: 01.11.2020).

102. Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій : Наказ Міністерства охорони здоров'я від 21.05.2007 № 246. Дата оновлення: 14.02.2012.

URL:<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0846-07> (дата звернення: 25.11.2020).

103. Закон України «Про охорону праці» від 14.10.1992 № 2694-ХІІ. Відомості Верховної Ради України (ВВР), 1992, № 49, ст.668. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12>. (дата звернення: 01.11.2020).

104. Про затвердження Загальних вимог стосовно забезпечення роботодавцями охорони праці працівників : наказ Міністерства надзвичайних ситуацій України 25.01.2012 № 67. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0226-12> (дата звернення: 01.11.2020).

105. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге видання, доповнене та перероблене / К.Н. Ткачук, М.О. Халімовський, В.В. Зацарний, Д.В. Зеркалов За ред. К.Н. Ткачука і М.О. Халімовського. Київ: Основа, 2006. с.234.

106. Заіченко В. І. Курс лекцій з дисципліни «Виробнича санітарія» (для студентів 4 курсу денної форми навчання напряму підготовки 6.170202 «Охорона праці»). Харків: ХНУМГ, 2014. 162 с.

107. Про затвердження Правил охорони праці для виробництв електроізоляційних матеріалів : наказ Державного комітету України з промислової безпеки, охорони праці та гірничого нагляду в ід 12 травня 2008 року № 100. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/en/z0487-08>. (дата звернення: 01.11.2020).

108. Жидецький В. Ц., Джигирей В. С., Мельников О. В. Основи охорони праці. 2-ге вид. Львів: Афіша, 2000. 348 с.

109. ДСТУ 7748:2015 Безпека праці. Біологічна безпека. Загальні вимоги. [Чинний від 2016-01-01]. Вид. офіц. Київ : Держстандарт України, 2016. 9 с.

110. Салига Ю.Т., Лучко І.В., Рославський В.П. Основи безпеки для науково-дослідних установ біологічного профілю. Львів : Растр-7, 2017. 218 с.

111. Закон України «Про охорону навколишнього природного середовища» № 1264-ХІІ від 25 червня 1991 року. Відомості Верховної Ради України, 1991, № 41, ст.546. Дата оновлення – 13.04.2020. URL : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1264-12#Text> (дата звернення: 01.11.2020).