


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

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ
«__» _____ 20__ р.

Дипломна робота

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації
гену *ptxD* рослинам *Nicotiana tabacum* для зменшення використання
фосфатів»

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БМ-01

Осипенко Олена Андріївна

Керівник:

доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики та
екобіотехнології, к.т.н., с.н.с.

Маринченко Лоліта Вікторівна


Рецензент:

доцент кафедри промислової біотехнології, к.б.н., с.н.с.

Яловенко Олена Ігорівна



Засвідчую, що у цій дипломній роботі
немає запозичень з праць інших авторів
без відповідних посилань.

Студент (-ка) 

Київ – 2024 рік

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

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології


Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«15» квітня 2024 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

Осипенко Олені Андріївні

1. Тема роботи «Використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гену *ptxD* рослинам *Nicotiana tabacum* для зменшення використання фосфатів», керівник роботи Маринченко Лоліта Вікторівна, к.т.н., с.н.с., затверджені наказом по університету від «27» травня 2024 р. №2117-с
2. Термін подання студентом роботи 6.06.2024
3. Вихідні дані до роботи: генетична конструкція з геном *ptxD*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Nicotiana tabacum*, середовища для культивування тютюну та селективні середовища для відбору трансформантів.
4. Зміст роботи: розробити такі розділи: огляд літератури; матеріали і методи дослідження; результати та обговорення: вирощування сортів рослин, підбір селективного середовища, відновлення культур бактерій, генетична трансформація тютюну, виділення ДНК рослин, полімеразна ланцюгова реакція ДНК трансформованих зразків; охорона праці та довкілля; висновки; перелік використаних джерел.

5. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо): презентація (А4)

6. Дата видачі завдання 15.04.2024

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Проведення пошуку та огляд літературних джерел	22.04.2024	
2	Проведення підготовчих робіт	30.04.2024	
3	Проведення <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації та отримання результатів	21.05.2024	
4	Проведення аналізу результатів та їх аналіз	27.05.2024	
5	Огляд нормативних документів з охорони праці	31.05.2024	
6	Оформлення дипломної роботи та підготовка презентації до захисту	05.06.2024	

Студент
Керівник

Олена ОСИПЕНКО
Лоліта МАРИНЧЕНКО

РЕФЕРАТ

Дипломна робота містить: 86 сторінок, 18 рисунків, 11 таблиць, 80 бібліографічних джерел.

Об'єкт дослідження: *Agrobacterium*-опосередкована трансформація генетичною конструкцією, T-ДНК якої містить ген *ptxD*, в рослини *Nicotiana tabacum*.

Предмет дослідження: ефективність використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для зменшення залежності рослин від фосфорних добрив шляхом вбудовування гену *ptxD* у геном рослин *N. tabacum*.

Мета роботи: проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гену *ptxD* в рослини *Nicotiana tabacum* та визначення складу селективного середовища для регенерації трансформованих рослин, здатних використовувати фосфіти.

Методи дослідження: молекулярно-біотехнологічні (*Agrobacterium*-опосередкована трансформація, полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез), культуральні (культура *in vitro*); фізико-хімічні (спектрофотометрія); статистичні.

Результати роботи та їхня новизна:

- вперше продемонстровано вбудовування покращеної генетичної конструкції, що містить ген *ptxD*, у геном *Nicotiana tabacum* сортів Samsun, Wisconsin та Petit Havana шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з метою забезпечення їх фосфором;
- розроблене удосконалене селективне середовище для регенерації трансформованих рослин.

Рекомендації щодо використання результатів роботи: відпрацьовану методику отримання та селекції трансгенних рослин тютюну з геном *ptxD* буде використано для отримання дводольних рослин, які можуть засвоювати фосфіти як джерела фосфору. Це приведе до зменшення використання фосфатних добрив та підвищення врожайності рослин.

Також рекомендовано розглянути можливість використання подібних генетичних модифікацій для інших культурних рослин, що дасть змогу розширити спектр застосування цієї технології в агрономії.

Пропозиції щодо можливих напрямів розвитку, продовження досліджень: подальші дослідження можуть включати випробування трансгенних рослин у польових умовах для оцінки їхньої ефективності та стабільності в різних агроекологічних зонах. Важливо вивчити довгостроковий вплив генетичної модифікації на рослини та навколишнє середовище. Додатково, подальші дослідження будуть присвячені оптимізації трансформаційних процесів для підвищення ефективності інтеграції генів і стабільності їх експресії. Необхідно також провести аналіз економічної доцільності впровадження трансгенних рослин у комерційне виробництво, включаючи оцінку потенційних вигід та ризиків.

Ключові слова: ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ, *NICOTIANA TABACUM*, ГЕН *PTXD*, ФОСФІТИ, ФОСФАТИ, *AROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ, СЕЛЕКТИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ

ABSTRACT

The thesis comprises: 86 pages, 18 figures, 11 tables and includes 80 bibliographic sources.

Object of the study: *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* plants with a genetic construct containing the *ptxD* gene in the T-DNA.

Subject of the study: the effectiveness of *Agrobacterium*-mediated transformation for reducing plant phosphorus fertilizer dependence by introducing the *ptxD* gene into the *N. tabacum* genome.

Purpose of the study: to conduct *Agrobacterium*-mediated transformation of the *ptxD* gene into *Nicotiana tabacum* plants and to determine the composition of a selective medium for regeneration of phosphine-utilizing transformed plants.

Research methods: molecular biotechnology (*Agrobacterium*-mediated transformation, polymerase chain reaction, electrophoresis), culture methods (*in vitro* culture); physical and chemical methods (spectrophotometry); statistical methods.

Results of the work and their novelty.

- For the first time, the incorporation of an improved genetic construct containing the *ptxD* gene into the genome of *Nicotiana tabacum* cultivars Samsun, Wisconsin, and Petit Havana by *Agrobacterium*-mediated transformation for their phosphorus supply has been demonstrated.
- An improved selective medium has been developed.

Recommendations for the use of the work's results: the developed method for obtaining and selecting transgenic tobacco plants with the *ptxD* gene will be used to obtain dicotyledonous plants that can utilize phosphites as a source of phosphorus. This will lead to a reduction in the use of phosphate fertilizers and an increase in plant yields.

It is also recommended to consider the possibility of using similar genetic modifications for other crops, which will expand the range of application of this technology in agronomy.

Suggestions for possible directions of development and continuation of research: further studies could include testing transgenic plants in field conditions to assess their effectiveness and stability in different agro-ecological zones. It is important to study the long-term impact of genetic modification on plants and the environment. Additionally, further research will be dedicated to optimizing transformation processes to improve gene integration efficiency and expression stability. It is also necessary to conduct an economic feasibility analysis of the introduction of transgenic plants into commercial production, including an assessment of potential benefits and risks.

Keywords: TRANSGENIC PLANTS, *NICOTIANA TABACUM*, *PTXD* GENE, PHOSPHITES, PHOSPHATES, *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION, SELECTIVE MEDIUM.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ptxD – ген фосфітоксидоредуктази

MS – живильне середовище Мурасіге-Скуга [1]

MSR – живильне середовище Мурасіге-Скуга для регенерації [1]

LB – поживне середовище Luria-Bertani [2]

PSR – гени відповіді на фосфорне голодування (Phosphorus starvation response)

Pi – неорганічний фосфат

Phi – фосфіт

PAE – ефективність отримання фосфору (Phosphorus acquisition efficiency)

PUE – ефективність використання фосфору (Phosphorus utilization efficiency)

Ti-плазміда – плазміда *Agrobacterium tumefaciens*, яка індукує утворення пухлин (tumor inducing plasmid)

T-ДНК – трансферна ДНК (transfer DNA)

MES – 2-(N-морфоліно) етансульфонова кислота, буфер

PPT – фосфінотрицин, гербіцид

ЗМІСТ

ВСТУП	11
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	14
1.1 Роль фосфору в життєдіяльності рослин	14
1.2 Засвоєння рослинами фосфору з ґрунтів	18
1.3 Негативний вплив фосфатів на навколишнє середовище та здоров'я людей	22
1.4 Шляхи вирішення проблем використання фосфатів	24
1.4.1 Відновлення фосфору зі стічних вод	24
1.4.2 Відновлення фосфору з біовідходів	26
1.4.3 Збільшення ефективного використання та поглинання фосфору рослинами	29
1.4.4 Використання фосфітів як альтернативного джерела фосфору	30
1.5 Створення генетично модифікованих рослин	34
1.5.1 Огляд існуючих методів	34
1.5.2 Опис <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації	35
1.6 Вибір <i>Nicotiana tabacum</i> як модельного організму	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	41
2.1 Об'єкти досліджень та їх характеристики:	41
2.2 Обладнання:	41
2.3 Матеріали, реактиви та реагенти:	42
2.4 Методи виконання роботи	43
2.4.1 Приготування та стерилізація поживних та живильних середовищ	45
2.4.2 Вирощування рослин <i>Nicotiana tabacum</i>	48
2.4.3 Підбір селективного середовища	49
2.4.4 Відновлення культур <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
2.4.5 Генетична трансформація рослин тютюну	51

2.4.6 Виділення загальної ДНК рослин	52
2.4.7 Полімеразна ланцюгова реакція зразків	53
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	55
3.1 Вирощування рослин <i>Nicotana tabacum</i>	55
3.2 Підбір селективного середовища	56
3.2.1 Підбір концентрації MES для стабілізації рН селективного середовища MSR(Phi)	56
3.2.2 Підбір концентрацій фосфітів та фосфатів для селективного середовища MSR(Phi)	57
3.3 Відновлення культур <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
3.4 Генетична трансформація тютюну	60
3.5 Виділення загальної ДНК рослин	64
3.6 Полімеразна ланцюгова реакція зразків і електрофоретичне підтвердження ампліфікованого маркерного гена <i>bar</i>	68
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ	70
4.1 Загальні положення	70
4.2 Безпека перед, під час та після роботи в лабораторії	72
4.3 Запобігання та реагування на аварійні ситуації у лабораторії	75
4.3.1 Пожежна безпека	75
ВИСНОВКИ	77
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	78

ВСТУП

Актуальність. На цей час світ постійно стикається з проблемою ефективного використання ресурсів, серед яких важливе місце займає фосфор, необхідний для забезпечення росту та розвитку рослин. Зменшення використання фосфатних добрив стає актуальним завданням також в контексті екологічної безпеки з огляду забруднення невикористаними рослинами фосфатами ґрунтових вод та водою.

Сучасні наукові дослідження та патентний пошук підтверджують актуальність проблеми використання фосфору та пошуку альтернативних методів його забезпечення. Ця тенденція включає в себе пошук альтернативних джерел фосфору, таких як переробка відходів, використання мікроорганізмів для підвищення доступності фосфатів у ґрунті, та генетичну модифікацію рослин для підвищення ефективності використання ними фосфору [2-6]. Наприклад, розробка створення сортів рослин, що мають здатність до симбіотичних взаємодій з грибами або бактеріями, що сприяють розчиненню фосфатів у ґрунті, може зменшити потребу у застосуванні хімічних добрив [7]. Також, використання біотехнологій для введення в рослини генів, що кодують фосфат-мобілізуєчі ферменти, може покращити їхню здатність до забезпечення фосфором в умовах його лімітованої кількості.

Отже, пошук ефективних методів забезпечення рослин фосфором стає все більш актуальним у контексті використання біотехнологій. В умовах зростаючого попиту на продовольство та нестабільності виробництва розробка нових підходів для оптимізації вирощування рослин є важливим завданням для сільськогосподарського сектору. У цьому контексті використання біотехнологій, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, для введення гену *ptxD* в рослини стає перспективним напрямком досліджень.

Метою роботи є проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гену *ptxD* в рослини *Nicotiana tabacum* та визначення складу селективного середовища для регенерації трансформованих рослин, здатних використовувати фосфіти.

Для досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

- проаналізувати наукову літературу щодо проблеми засвоєння фосфору сільськогосподарськими рослинами та методів його підвищення, зокрема методами генетичної модифікації;
- підготувати біологічні агенти (*Nicotiana tabacum* та *Agrobacterium tumefaciens*) до процесу трансформації;
- підібрати оптимальне селективне середовище для відбору трансформантів;
- провести *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію генетичною конструкцією, T-ДНК якої містить ген *ptxD* рослинами *Nicotiana tabacum*;
- підтвердити трансформацію цільового гену за маркерним геном *bar*, ампліфікованим з отриманих регенерантів;
- описати принципи забезпечення безпеки під час роботи в лабораторії.

Об'єктом дослідження є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація генетичною конструкцією, T-ДНК якої містить ген *ptxD*, в рослини *Nicotiana tabacum*.

Предметом дослідження є ефективність використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для зменшення залежності рослин від фосфорних добрив шляхом вбудовування гену *ptxD* у геном рослин *N. tabacum*.

Методи дослідження включають молекулярно-біотехнологічні (*Agrobacterium*-опосередкована трансформація, полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез), культуральні (культура *in vitro*); фізико-хімічні (спектрофотометрія); статистичні.

Наукова новизна полягає в такому:

- вперше продемонстровано вбудовування покращеної генетичної конструкції, що містить ген *ptxD*, у геном *Nicotiana tabacum* сортів Samsun, Wisconsin та Petit Havana шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з метою забезпечення їх фосфором;

- розроблене удосконалене селективне середовище для регенерації трансформованих рослин.

Практичне значення даного дослідження. Відпрацьовану методику отримання та селекції трансгенних рослин тютюну з геном *ptxD* буде використано для отримання дводольних рослин, які можуть засвоювати фосфіти як джерела фосфору. Це приведе до зменшення використання фосфатних добрив та підвищення врожайності рослин.

Також рекомендовано розглянути можливість використання подібних генетичних модифікацій для інших культурних рослин, що дасть змогу розширити спектр застосування цієї технології в агрономії.

Апробація. Дипломну роботу було виконано у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом Банникової Марії Олександрівни в рамках тематики «Вивчення особливостей життєдіяльності біотехнологічних рослин після геномних модифікацій», 2023-2027 рр. (державний реєстраційний №0123U100462). Результати роботи було обговорено на семінарі відділу, викладено в очній доповіді (3 місце на секції 2 «Природоохоронні біотехнології, біоенергетика та біоінформатика») та опубліковано в матеріалах XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття»:

- Осипенко О.А., Нітовська І.О. Вибір селективного середовища для відбору трансгенних рослин тютюну, отриманих в результаті опосередкованої агробактеріями трансформації / «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнар.науково-практ. конф., м. Київ, 17 травня 2024 р. Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2024, 331 с. – С. 253–256.
- Осипенко О.А., Маринченко Л.В, Банникова М.О., Нітовська І.О. Генетична модифікація рослин для зменшення використання фосфатів: можливості та виклики / «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнар. науково-практ. конф., м. Київ, 17 травня 2024 р. Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2024, 331 с. – С. 257–260.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Роль фосфору в життєдіяльності рослин

Фосфор (P) є одним з найважливіших елементів живлення рослин, без якого неможлива їх нормальна життєдіяльність. У рослинах знайдено приблизно 68 хімічних елементів, причому 47 з них присутні завжди. Крім води, кисню та вуглекислого газу, для всіх рослин необхідні 14 мінеральних елементів. Серед них нітроген (N), фосфор (P), калій (K), кальцій (Ca), сірка (S) та магній (Mg) потрібні у відносно великих кількостях (більше 1000 мг на кг сухої ваги). Хлор (Cl), залізо (Fe), бор (B), нікель (Ni), мідь (Cu), марганець (Mn), цинк (Zn) та молібден (Mo) потрібні у менших кількостях (менше 100 мг на кг сухої ваги) і тому називаються мікроелементами [1]. Фосфор необхідний для всього життя на Землі, а для рослин він є ключовим елементом фотосинтезу, дихання та біосинтезу нуклеїнових кислот і мембран [2].

Будучи макроелементом, фосфор часто обмежує продуктивність рослин як у природних, так і в сільськогосподарських системах. Це особливо помітно в умовах низького рівня фосфору в ґрунтах що впливає на урожайність у всьому світі. Рослини поглинають фосфор у формі ортофосфату, і цей аспект живлення був ретельно вивчений, включаючи молекулярні, біохімічні, морфологічні та фізіологічні ефекти дефіциту фосфору.

Вміст фосфору в рослинах варіюється від 0,05 до 0,5% сухої маси. Різниця в концентрації неорганічного фосфату (Pi) від ґрунту до клітин рослин збільшується в понад 2000 разів, із середньою фізіологічною концентрацією в ґрунті близько 10 мкМ [3]. Фосфор засвоюється рослинами, головним чином, у формі аніона ортофосфорної кислоти (PO_4^{3-}), а також у вигляді фосфорних ефірів цукрів і спиртів. Деякі рослини, корені яких виділяють слабкі кислоти, можуть засвоювати фосфор із важкорозчинних фосфорних сполук, таких як фосфоритна мука. До таких рослин належать люпин, боби та гречка.

Позитивний вплив фосфорних добрив краще виявляється за наявності достатньої кількості азоту (N) і калію (K).

Фосфор є високорухомим елементом і багаторазово реутилізується в рослині. Він виконує структурну функцію, входячи до складу нуклеїнових кислот і ліпідів. Крім того, фосфор є необхідним компонентом нуклеопротейдів (ФАД, НАД), макроергічних сполук (АТФ), фосфорних ефірів, тріоз, пентоз і гексоз. Завдяки цьому фосфор бере активну участь у синтезі й перетворенні органічних речовин, зокрема, вуглеводів.

Фосфор відіграє фундаментальну роль у регулюванні фізіологічних реакцій і підвищенні стійкості рослин до абіотичного стресу, такого як спека, засолення, посуха, зволоження, високий вміст CO₂ і токсичність важких металів. Він також впливає на активність багатьох ферментів. З моменту виділення фосфосерину в 1932 році, фосфорилування білків було визнано одним з найбільш біологічно значущих і поширених посттрансляційних модифікацій [8].

Фосфорилування білків є оборотною модифікацією, що впливає на активність, стабільність, взаємодію та локалізацію білків. Цей процес каталізується кіназами, які переносять фосфатну групу до гідроксильної групи специфічних залишків амінокислот. Зворотна реакція – дефосфорилування – каталізується фосфатазами [9].

Фосфоліпіди є важливими компонентами клітинних мембран, включаючи тонопласт, ендоплазматичну сітку, апарат Гольджі, оболонку ядра, плазматичні та мітохондріальні мембрани. Вони відіграють значну роль у передачі сигналів під час розвитку рослин і у відповідях на стрес [9]. Під час дефіциту фосфору деякі рослини замінюють свої фосфоліпіди на ліпіди, що не містять фосфору, як це спостерігається у *Arabidopsis thaliana* та *Hordeum vulgare* [10, 11].

Нуклеїнові кислоти складають найбільшу органічну фракцію фосфору в листі рослин, маючи 40-60% загального органічного фосфору. Більшість цієї фракції складається з РНК, особливо рибосомальної РНК, яка відіграє ключову роль у білковому синтезі. Вміст фосфору в рослинах варіює залежно від виду та умов вирощування.

Перетворення фосфору в рослині активно відбувається під час росту органів та збільшення цитоплазми, особливо під час проростання насіння та його досягання, коли фосфор запасається у вигляді фітину.

За дефіциту фосфору порушуються процеси фотосинтезу та дихання, а також інтенсифікується розпад складних органічних сполук. Це проявляється зміною забарвлення листків на блакитно-зелене або фіолетово-зелене з подальшим засиханням. Листки жовтіють, чорніють по краях і опадають. Одночасно затримуються ростові процеси надземної та підземної частини рослини. У кореневій системі рослин відбувається перерозподіл фосфору з апікальної меристеми до бічних коренів, що змінює її структуру і сприяє розвитку бічних коренів. Цей процес затримує подовження клітин в апікальній меристемі, але збільшує кількість і довжину кореневих волосків. Як результат, коренева система стає більш розгалуженою і поверхневою, концентруючись у верхніх шарах ґрунту.

Рослини виділяють у ґрунт органічні кислоти, ферменти, феноли та інші сполуки, що реагують на брак фосфату. Ці речовини здатні хелатувати іони, які зазвичай зв'язують фосфат-аніон, що сприяє вивільненню останнього та розщепленню органічних джерел фосфору. Частина виділених речовин слугує джерелом вуглецю та приваблює ґрунтові мікроорганізми, які допомагають рослинам отримувати фосфат-іони.

Ці мікроорганізми можуть або фіксувати фосфат-іони для рослин, або виділяти сполуки, що переводять органічні та неорганічні форми фосфору у доступний стан. Рослини також вступають у симбіоз з грибами арбускулярної мікоризи (симбіоз між рослинами і грибами з відділу *Glomeromycota*), які допомагають їм отримувати фосфор в обмін на органічний вуглець [8].

Підтримання гомеостазу за умов дефіциту фосфору (рис. 1.1.) забезпечується роботою генів відповіді на фосфорне голодування (Phosphorus starvation response, *PSR*), які координують широкий спектр адаптивних процесів. Ці гени включають механізми, що регулюють поглинання фосфору, перерозподіл його всередині рослини та збереження фосфорних резервів.

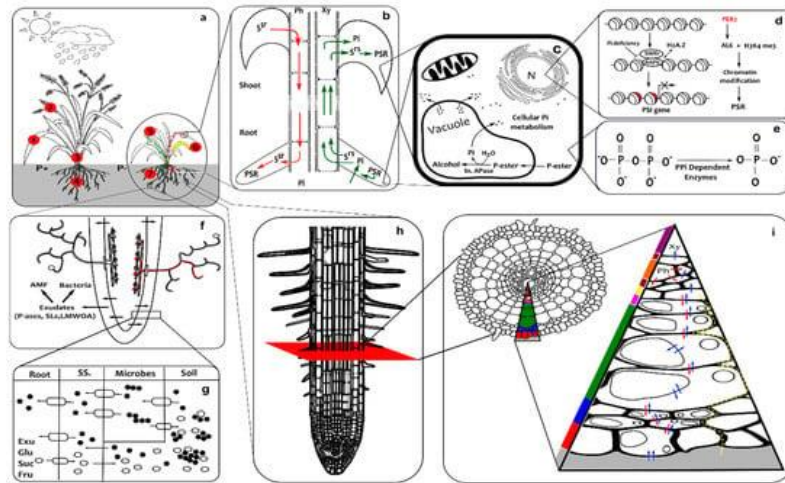


Рисунок 1.1 – Комплексний огляд відповідей на фосфатне голодування та механізми транспорту сигнальних молекул [12]:

- a) ріст рослини, цифри в червоних кружках показують рівні неорганічного фосфату, що відіграє ключову роль у різних процесах росту та розвитку рослин, включаючи фотосинтез;
- b) системні сигнали, які передаються від пагону до кореня через флоему (Systemic Shoot to Root, SSR) та від кореня до пагону через ксилему (Systemic Root to Shoot, SRS);
- c) клітини будь-якої частини рослини, що реагують на дефіцит фосфату, змінюючи вміст ліпідів та вивільнюючи запаси фосфату з вакуолі;
- d) епігенетичні ефекти, зокрема модифікація хроматину, яка впливає на транскрипцію генів у відповідь на дефіцит фосфату;
- e) пірофосфат-залежні гліколітичні ферменти для обходу гліколізу та метаболічна система рециркуляції фосфату;
- f) діяльність ризосфери, включаючи ексудацію кислих фосфатаз, стригалактонів і низькомолекулярних органічних кислот, які стимулюють активність бактерій та залучають арбускулярні мікоризні гриби;
- g) межі ризосфери, де ексудати та цукри секретуються через ефлюксні транспортери та стимулюють бактерії, а також транспорт фосфату;
- h) зміни довжини меристеми та утворення корневих волосків;
- i) поперечний переріз через корінь і шляхи поглинання фосфату, включаючи різні тканини.

PSR-гени активують специфічні фактори транскрипції, які запускають експресію генів, відповідальних за синтез транспортерів фосфату (Pi), протеїнкіназ та інших білків, що беруть участь у метаболічних процесах.

Першочергово, дефіцит фосфору сприймається корневими кінчиками, які сигналізують про активацію ранніх генів *PSR*. Ці гени запускають синтез транспортерів Pi, що підвищують поглинання фосфату з ґрунту. Також активуються протеїнкінази, які модулюють активність різних ферментів і білків, необхідних для адаптації до фосфорного голодування. Внаслідок цього відбувається ремоделювання клітинних мембран та формування бічних коренів, що сприяє збільшенню площі поглинання фосфору.

Через кілька днів після початкового стресу активуються пізні гени *PSR*, які кодують білки, що регулюють процеси рециркуляції та перерозподілу фосфору всередині рослини. Це дає змогу рослині ефективніше використовувати наявні ресурси фосфору, забезпечуючи його доставку до критично важливих органів і тканин. Також під впливом *PSR*-генів рослини збільшують виділення органічних кислот і фітогормонів, що сприяє мобілізації фосфору з ґрунтових резервів [12].

1.2 Засвоєння рослинами фосфору з ґрунтів

Цикл фосфору – це біогеохімічний процес, в якому фосфор переміщується через ґрунт, воду та організми (рис. 1.2).

Важливою відмінністю від інших біогеохімічних циклів є те, що атмосфера не відіграє значної ролі в циклі фосфору, оскільки фосфорні сполуки майже не існують у газоподібній фазі за нормальних умов. Водночас, невеликі кількості фосфору можуть переноситися повітрям у вигляді пилу, який піднімається вітром. У природних екосистемах фосфат надходить у ґрунт внаслідок вивітрювання фосфорвмісних мінералів, таких як апатити ($\text{Ca}_{10}(\text{X})(\text{PO}_4)_6$, де X – це F, Cl, OH або CO_3) [13].



Рисунок 1.2 – Схематичне зображення природного та антропогенного кругообігів фосфору [13]

З часом, рН ґрунту знижується, і кальцієві фосфати перетворюються на аморфні та кристалічні фосфати алюмінію і заліза. Фосфор може потрапляти в систему через органічні добрива, рослинні залишки, хімічні добрива та відходи муніципального походження, а також втрачатися внаслідок збирання врожаю, ерозії, стоку та вивітрювання [15]. Органічні форми фосфору можуть складати від 25% до 60% загального фосфору в ґрунтах, включаючи фосфор, що міститься в рослинних залишках, тваринних відходах, ґрунтовій біоті, органічній речовині ґрунту та розчиненому органічному фосфорі в ґрунті [16].

Органічний фосфор може змінюватися сезонно, відображаючи динамічний характер мінералізації та іммобілізації поживних речовин у ґрунті, які впливають на динаміку фосфору. Фактори, що знижують загальну кількість органічної речовини в ґрунті, такі як надмірна обробка та літній пар, призводять до зниження органічного фосфору.

Більшість органічного фосфору у природних умовах представлено у формі ефірів ортофосфорної кислоти. Ці форми включають інозитолфосфати, нуклеїнові кислоти, нуклеотиди, фосфоліпіди та цукрові фосфати.

У чорноземних ґрунтах близько 10-30% органічного фосфору знаходиться у формі інозитолфосфату, фосфоліпіди становлять 1-2%, нуклеїнові кислоти – менше 1%, а 70% залишаються неідентифікованими [17]. Дослідження з використанням ядерно-магнітно-резонансної-спектроскопії показали, що фосфор у ґрунтах присутній у вигляді фосфонатів, ортофосфатних моноефірів та діефірів. Моноефіри включають різні ізомери інозитолгексакісфосфату, фосфат холіну, продукти розпаду діефірів глюкози б-фосфату, гліцерофосфати та моонуклеотиди [16].

Ортофосфатні діефіри зустрічаються у вигляді ДНК та невідомих діефірів. Хоча значна частина органічного фосфору у ґрунті є біологічно неактивною, його невелика частка є біодоступною і хімічно стійкою. Для визначення біодоступних фракцій фосфору в ґрунті використовують процедури фракціонування з послідовними екстрагентами різної сили [17].

Неорганічні форми фосфору у ґрунті включають фосфатні іони, фосфор, що адсорбується на частинках ґрунту, осади вторинних мінералів, таких як фосфати кальцію, магнію, заліза та алюмінію, а також первинні мінерали, такі як апатит. Апатит повільно вивітрюється з часом, виділяючи ортофосфат у ґрунтовий розчин. Вторинні мінерали фосфору беруть участь у рівноважних реакціях, розчиняючись з вивільненням ортофосфату або випадаючи в осад [15].

Протягом вегетаційного періоду рослини поглинають з ґрунту близько 60 кг P_2O_5 з кожного гектара. Більшість цього фосфору не повертається до ґрунту після збирання врожаю, що вимагає внесення додаткових добрив для підтримання запасів доступного фосфору. Потреба у фосфорних добривах зростає зі збільшенням забезпечення рослин азотом. Фосфорні добрива поділяються на три групи за розчинністю у воді: водорозчинні, розчинні в слабких кислотах та нерозчинні.

Водорозчинні добрива, такі як простий суперфосфат ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) та подвійний суперфосфат ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), містять фосфор у формі, яка слабо рухається в ґрунті. Тому вони концентруються в місці внесення і потребують глибшого внесення для кращого ефекту, який триває 2-3 роки. Добрива, розчинні в слабких кислотах, такі як преципітат і томасшлак, містять фосфор у формах, доступних для рослин. Нерозчинні у воді добрива, такі як фосфоритне та кістяне борошно, погано розчиняються в слабких кислотах і тому є менш доступними для рослин [18].

Сегмент добрив становить приблизно 78% світового ринку фосфатної руди. Найбільшими виробниками фосфатної руди є Китай, Сполучені Штати, Африка, Східна Європа та Близький Схід. Китай, як найбільший виробник фосфатної руди, що забезпечив близько 50% світового виробництва у 2018 році, у жовтні 2008 року запровадив суворі правила експорту фосфатної руди, щоб забезпечити самодостатність у внутрішньому споживанні добрив.

Взагалі світове виробництво фосфатної руди значно зросло з 2000 по 2018 рік. Найбільше зростання відбулося в Китаї, Африці та на Близькому Сході, тоді як у Сполучених Штатах спостерігалось значне зниження. Нещодавно виробництво фосфатної руди суттєво зросло в таких країнах, як Марокко, росія, Саудівська Аравія, Туніс, Йорданія та Перу [19]. Ці джерела можуть вичерпатися за 50-100 років. Відомі інші родовища, але вони менш доступні і містять менше фосфору, що підвищить вартість фосфорних добрив, зробить їх менш доступними для фермерів та підвищить ціну на продовольство [20].

Коли водорозчинні фосфорні добрива вносять в ґрунт, лише невелика їх частка залишається в розчині. Фосфор піддається серії реакцій, які знижують його біодоступність, включаючи адсорбцію на частинках ґрунту та осадження нових малорозчинних фаз фосфору [21, 22].

Розчинність фосфатних сполук залежить від рН ґрунту. У кислих ґрунтах низький рН знижує розчинність фосфатів заліза, тоді як у ґрунтах з високим рН низький рН збільшує розчинення фосфатів кальцію та магнію.

Оптимальний діапазон рН для доступності фосфору становить 6,0-7,0. У кислих ґрунтах аморфні фосфати заліза та алюмінію поступово перетворюються на стійкі кристалічні форми, такі як варисцит та стренгіт. У лужних ґрунтах фосфати кальцію та магнію можуть перетворюватися на менш розчинні форми, такі як гідроксиапатит та фторапатит [23].

Температура також впливає на швидкість реакцій осадження та розчинення. Підвищення температури збільшує швидкість розчинення природних фосфатів та їх осадження в менш розчинні форми, що зменшує доступність нещодавно доданого фосфору [24].

Попри те, що перетворення фосфору в ґрунті з часом зменшує його доступність для рослин, дослідження показують, що значна частина утримуваного фосфору може бути відновлена у наступні роки. Ці дані свідчать про те, що утримання фосфору в ґрунті є оборотним процесом, що дає змогу відновити частину запасів фосфору в наступних вегетаційних періодах [22, 23].

1.3 Негативний вплив фосфатів на навколишнє середовище та здоров'я людей

Надлишок фосфору часто розглядається як забруднення, що сприяє різним екологічним проблемам. Однією з основних загроз, пов'язаних із надлишком фосфору, є евтрофікація – природний процес, під час якого озера, річки та інші водні об'єкти отримують надмірну кількість поживних речовин через вивітрювання гірських порід та ґрунтів [25]. Фосфати підтримують ріст водоростей у водоймах. Коли ці водорості відмирають, їх розкладання споживає значну кількість розчиненого кисню, що може призвести до створення анаеробних умов [26]. Анаеробні умови спричиняють зниження якості води, оскільки це може призвести до утворення оксидів із неприємним запахом, зміну кольору води та зменшення стабільних мінералів. Забруднення води фосфатами також ускладнює процес очищення води, що збільшує витрати на її обробку.

Крім того, це впливає на рекреаційні та природоохоронні властивості водних об'єктів, а також може призвести до втрати худоби.

Методи ведення сільського господарства (рис. 1.3) можуть негативно впливати на якість поверхневих вод, особливо в сільській місцевості. Хімічні добрива, такі як нітрогенні, фосфорні, калійні (NPK), сечовина та гній, широко використовуються для підвищення врожайності. Проте їх надмірне застосування сприяє погіршенню якості водних ресурсів. Фосфати, потрапляючи у водойми, стимулюють ріст водоростей. Ці водорості, розростаючись у великих кількостях, потім розкладаються, споживаючи кисень. Це призводить до дефіциту кисню у воді, що створює несприятливі умови для життя водних організмів.

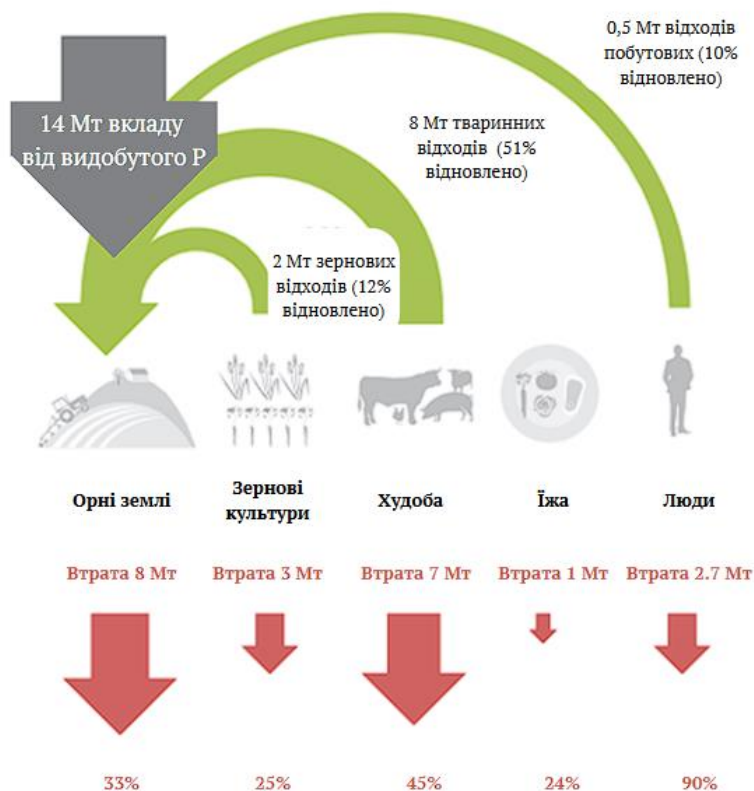


Рисунок 1.3 – Спрощений цикл фосфору в сільському господарстві. Червоні стрілки позначають втрати фосфору у водні системи, а зелені стрілки відображають повернення фосфору на орні землі з різних підсистем. Відсотки під червоними стрілками вказують на відсоткові втрати з кожної підсистеми, а в дужках – відносні втрати від загального надходження фосфору в сільськогосподарські землі [27]

Погіршення якості води може мати серйозні наслідки для екосистем та здоров'я людей. Наприклад, токсини, що виділяються водоростями, можуть мати сублетальний вплив на людей, які використовують забруднену воду для пиття [28].

У людському організмі приблизно 85% загального фосфату знаходиться в кістках і зубах, 10-15% – у м'яких тканинах, а менш ніж 1% – у позаклітинних рідинах. Баланс фосфатів підтримується через тонку рівновагу між кишковим всмоктуванням, нирковим виведенням та переміщенням фосфату до кісток і назад.

Фосфати широко присутні в нашому харчуванні, і щоденне споживання фосфатів з їжею може досягати понад 1500 мг [29]. Останні дослідження показали, що надлишок фосфатів може мати токсичний вплив на серцево-судинну систему та процес старіння.

Також є вагомі докази того, що підвищені рівні фібробластичного фактору росту 23 (FGF23) і паратиреоїдного гормону (ПТГ) у відповідь на надлишок фосфатів сприяють цим несприятливим клінічним наслідкам [30, 31]. Проте, впровадження дієтичних обмежень фосфату може бути невиправданим для осіб з нормальною функцією нирок, хоча зростання випадків захворювань нирок у суспільстві підкреслює важливість подальшого вивчення цього питання.

1.4 Шляхи вирішення проблем використання фосфатів

1.4.1 Відновлення фосфору зі стічних вод

Хоча фосфоровмісні стічні води є забруднювачами, вони також можуть бути важливими для відновлення ресурсу фосфору, сприяючи моделі циклічної економіки. Зважаючи на високий попит на фосфор та його обмежені запаси, відновлення фосфору зі стічних вод може стати корисним рішенням. Стічні води зазвичай очищуються на очисних спорудах, де фосфати можуть бути відновлені з декількох джерел: водні потоки (неочищені стічні води, сеча), осад стічних вод або зола осаду стічних вод (SSA) [32].

Хімічна адсорбція є простою методикою видалення фосфору, але висока вартість виробництва адсорбентів і складність відновлення фосфору після адсорбції обмежують її застосування [33]. Проте, хімічне осадження, таке як утворення монофосфіду кальцію (CaP) і струвіту, показало високу ефективність відновлення фосфору зі стічних вод і може виробляти цінні продукти з мінімальними екологічними ризиками [34]. Фосфорорганічні речовини у стічних водах також можна ефективно відновлювати за допомогою окислення та осадження [35, 36]. Комбінація біологічних технологій та методів хімічного осадження може бути використана для видалення та повторного використання фосфору у стічних водах за допомогою альтернативного анаеробного/аеробного реактора з біофільтрами [37]. Проте, ефективність відновлення в такій системі може бути нижчою порівняно з хімічним осадженням. Відновлений зі стічних вод фосфор зазвичай знаходиться у формі струвіту ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), К-струвіту ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), гідроксиапатиту (HAP , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), віваніту ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) та інших сполук [36-38].

Покращене біологічне видалення фосфору (EBPR) базується на життєдіяльності мікроорганізмів, які видаляють фосфор зі стічних вод. Ці мікроорганізми, що накопичують поліфосфат (PAO), можуть секвеструвати фосфат у вигляді внутрішньоклітинного поліфосфату, що перевищує їх біологічну потребу в аеробних умовах, відоме як "поглинання розкоші". Таким чином можна видалити понад 90% фосфору зі стічних вод, де звичайна біомаса осаду містить близько 2–3% фосфору, а після обробки EBPR вміст фосфору може досягати 4–12%.

Хоча і хімічне осадження, і EBPR є ефективними для видалення фосфору зі стічних вод, вилучений фосфор зазвичай міститься у відходах і не має великої цінності, за винятком випадкового занесення на сільськогосподарські угіддя або спалювання. У деяких європейських країнах зростає використання спалювання мулу через побоювання щодо поширення залишків ліків, важких металів і патогенних мікроорганізмів на орні землі. Крім того, сполуки FePO_4 і AlPO_4 не є біодоступними і мають низьку поживну цінність [14].

1.4.2 Відновлення фосфору з біовідходів

Щорічно ЄС виробляє понад 2 мільярди тонн гною, який містить понад 5 мільйонів тонн пентаоксиду фосфору (P_2O_5) [41]. Це лише десята частина від загального світового виробництва, яке становить приблизно 15-20 мільярдів тонн гною щорічно [42]. Тваринний гній містить неперетравлені харчові відходи, багаті органічними речовинами, сполуками азоту (наприклад, сечовою кислотою із сечі та органічним азотом з фекалій) і фосфором (переважно у формі фітинової кислоти, яка є залишком харчування на основі злаків). Однак гній також містить небажані компоненти, такі як гормони, антибіотики та патогени, що ускладнює його пряме використання як добрива.

Пташиний послід, що складається з гною, залишків корму, пір'я, підстилки та залишків води, також містить цінні поживні речовини для добрив. Проте ці речовини знаходяться у неправильних пропорціях (N/P) для ефективного використання як добрива. Безпосереднє внесення гною на орні поля може призвести до підвищеного витоку компонентів у поверхневі води, спричинити забруднення, виділення леткого азоту та недостатню аерацію ґрунту. Крім того, гнійний шлам не підходить для транспортування на далекі відстані через високу вартість [43].

Ще одним важливим джерелом фосфору є відходи бойні, які переробляють на м'ясо-кісткове борошно. Через заборону на використання м'ясо-кісткового борошна як корму для тварин і органічних добрив, воно в основному спалюється [44].

Вміст фосфору у біовідходах представлений у таблиці 1.1.

Методи відновлення фосфору поділяють на фізичні, хімічні, термічні та біологічні процеси, що представлено на рисунку 1.4.

Таблиця 1.1 – Вміст фосфору у відібраних біовідходах [45]

Біомаса та біовідходи	Вміст фосфору
Рідка фракція свинячого гною	0,203 г/л
Гній великої рогатої худоби	4,10 г/кг – 18,3 г/кг
Свинячий гній	1,9 г/кг
Пташиний послід	13,6 г/кг
Відходи забою	1,79 г/кг сухої речовини
Кістки великої рогатої худоби	104 г/кг сухої речовини
Свинячі кістки	93,6 г/кг сухої речовини
Кістки птиці	85,2 г/кг сухої речовини
Осад стічних вод	25,68 г/кг
Зола осаду стічних вод	88,4 г/кг
Харчові відходи	4,2 г/кг

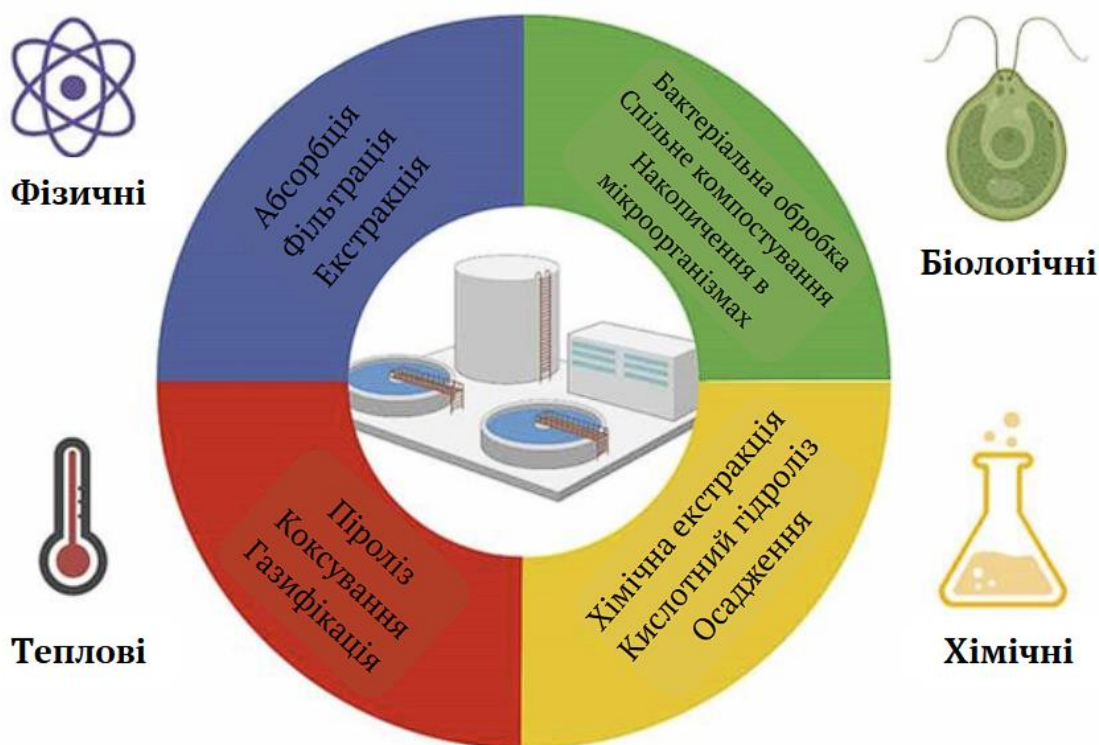


Рисунок 1.4 – Методи відновлення фосфору [45]

Компостування сприяє мінералізації органічного фосфору в неорганічні форми з кращою біодоступністю. Цей процес також зменшує об'єм і кількість води в матеріалі, але пов'язаний із втратою сполук азоту (леткий аміак) [46]. Компостування свинячого гною з обробкою личинками кімнатної мухи досягає подібного ефекту без використання добавок. Отриманий продукт містить на 30% більше поживних речовин порівняно з компостуванням із наповнювачами.

Анаеробне зброджування – метод переробки відходів з одночасним виробництвом енергії (біогазу). Цей процес перетворює органічні форми азоту та фосфору в неорганічні похідні, такі як NH_3 та ортофосфати. Даний метод також зменшує обсяг осаду стічних вод та дезінфікує тваринний гній.

До хімічних методів відновлення належить обробка кислотою і лугом. Після термічної обробки сирий гній, золу або біовугілля почергово піддають кислотній обробці, осаджують, промивають та додають в лужне середовище. В даному середовищі утворюється осад Са-Р. Ця технологія є ефективною та не займає багато часу, проте необхідно видаляти токсичні метали та використовувати реагенти, пропорційно кількості відновленого фосфору [46, 47].

Мембранні технології, такі як мікрофільтрація та ультрафільтрація, допомагають відокремити тверді та рідкі фази, які можуть містити значну кількість завислих речовин через анаеробне зброджування. Цей метод дає змогу концентрувати фосфор у цих твердих залишках, що полегшує їх подальше використання [48].

Попередній гідроліз біовідходів передбачає розщеплення складних органічних сполук на простіші компоненти, що полегшує подальше виділення фосфору. Гідроліз допомагає підвищити доступність фосфору для подальшої обробки [45].

1.4.3 Збільшення ефективного використання та поглинання фосфору рослинами

Підвищення ефективного використання та поглинання фосфору рослинами можна досягти шляхом збільшення ефективності збору фосфору (РАЕ) та ефективності використання фосфору (PUE).

Рослини здатні підвищувати РАЕ, покращуючи здатність поглинати фосфор з ґрунту, та збільшувати PUE, ефективно використовуючи отриманий фосфор для накопичення біомаси або врожаю. В останні десятиліття значна увага приділялася вдосконаленню РАЕ за рахунок зміни архітектури кореневої системи, посилення кореневої ексудації та взаємодії з мікроорганізмами.

Одним із способів підвищення РАЕ є зміна архітектури кореневої системи. Збільшення щільності коренів та бічних розгалужень дає змогу корінню поглинати більше фосфору з верхнього шару ґрунту. Наприклад, рослини з більшими кореневими волосками або зміненою структурою коренів краще поглинають фосфор з ґрунту, підвищуючи таким чином їхню здатність до живлення.

Інший спосіб покращення РАЕ включає посилення кореневої ексудації. Протони, органічні аніони та ферменти, які виділяються корінням, сприяють розчиненню ґрунтового фосфору, роблячи його доступнішим для поглинання рослинами. Це дає змогу рослинам ефективніше засвоювати фосфор із ґрунту, збільшуючи їхню продуктивність.

Взаємодія з мікроорганізмами також відіграє важливу роль у підвищенні РАЕ. Арбускулярні мікоризні гриби збільшують об'єм ґрунту, який використовується для отримання фосфору, а бактерії, які розчиняють фосфат, підвищують доступність фосфору в ґрунті. Ці мікроорганізми працюють у симбіозі з рослинами, допомагаючи їм ефективніше використовувати фосфор [49].

Генетична інженерія також відіграє важливу роль у вдосконаленні РАЕ та PUE. Введення специфічних бактеріальних, грибкових або рослинних генів може призвести до збільшення розміру корневих волосків, покращення

толерантності до Al^{3+} , надекспресії цитоплазматичних транспортерів фосфорних іонів та білків, відповідальних за обмін фосфору в рослинах. Такі генетичні зміни значно покращують здатність рослин до засвоєння та ефективного використання фосфору [50, 51].

1.4.4 Використання фосфітів як альтернативного джерела фосфору

Фосфіт (Phi) є неорганічною хімічною сполукою, яка складається з фосфору і гідроксиду. В фосфітах фосфор має ступінь окиснення +3, що відрізняється від більш розповсюдженого фосфату, де ступінь окиснення фосфору становить +5. У розчині фосфіт може утворювати різні іонні форми, такі як $H_2PO_3^-$ та HPO_3^{2-} , залежно від рН середовища [52]. Вони є побічним продуктом таких галузей, як хімічна та промислова і можуть використовуватися як альтернативне джерело фосфору.

Однак, рослини та більшість інших організмів не можуть засвоювати фосфіти. Навіть трансгенні вищі рослини з геном *ptxD*, що кодує фосфітоксидоредуктазу, яка перетворює фосфіти на фосфати, не можуть рости на середовищах, де фосфіти є єдиним джерелом фосфору.

Фосфіти можуть мати гербіцидну дію за концентрації від 24 кг/га. Їх можна використовувати для пригнічення росту небажаних культур рослин в сільському господарстві. Фосфіти можуть бути використані як гербіциди ґрунтової дії для запобігання появі сходів бур'янів. Фосфіти відомі своїми фунгіцидними властивостями та здатністю контролювати різні патогени, такі як *Rhizium spp.*, ціанобактерії, *Clavireedia jacksonii* і *Microdochium nivale* [53-56]. Фосфіти зазвичай виготовляється у вигляді рідини, що підвищує його рухливість у ґрунті та тканинах рослин. Фосфіт легко поглинається і передається через ксилему і флоему в усі ділянки рослини [57]. Хоча фосфіти легко поглинається листям і/або корінням рослин, реакція рослин на фосфіти як джерело фосфору є змінною.

Фосфітна сполука викликає у рослин захисний відгук, допомагаючи їм боротися з патогенами.

Фосфіти пригнічують фосфорилування та конкурують з фосфатами за активні сайти у ферментах, порушуючи метаболізм шкідливих мікроорганізмів. Це приводить до активації захисних молекул, таких як фітоалексини та білків, які блокують проникнення патогенів.

Рослини поглинають іони фосфіту, які накопичуються через шість тижнів після внесення, з обмеженою транслокацією до коренів таких рослин як *Agrostis stolonifera*, *Agrostis canina* і *Poa annua*. Фосфіт не метаболізується в інші форми і зберігається в тканинах рослин [58]. Це означає, що у разі використання фосфіту як фунгіциду необхідне повторне внесення фосфітних продуктів, оскільки фосфіт видаляється разом із тканинами після скошування.

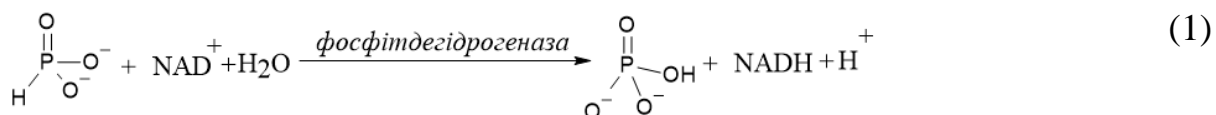
Причина пошкодження рослин в умовах дефіциту фосфатів та високого вмісту фосфіту була досліджена у роботах, що вивчали експресію генів, викликану фосфатним голодуванням. Дослідники виявили, що фосфіт втручається у передачу сигналів, сприймаючись як фосфат, що призводить до того, що рослини не можуть відчувати дефіцит фосфату навіть за низьких його концентраціях. Гени, індуковані фосфатним голодуванням, такі як *LePT2*, *LePS2* і *TPSII*, не експресувалися в томатах за наявності фосфіту у середовищі культивування [52].

Негативний вплив фосфіту на ріст рослин зазвичай спостерігається у разі дефіциту фосфору порівняно з адекватними рівнями фосфору в рослинах. Натомість, позитивні відповіді на фосфіт можна пояснити певним рівнем контролю грибкових захворювань. Хоча лише кілька досліджень надали докази окислення фосфіту за допомогою клітинних ферментів, генетично контрольованих у рослинних клітинах, все більше доказів свідчить про потенціал маніпулювання генами рослин для посилення окислення фосфіту до фосфату у рослинах [59].

Рослини використовують фосфор лише для своїх потреб у живленні, але метаболізм фосфору у бактерій пройшов значний шлях розвитку завдяки виявленню широкого спектру та різноманітних шляхів метаболізму відновлених сполук фосфору.

Вперше про процес біологічного окислення фосфіту до фосфату було повідомлено Адамсом і Конрадом (1953 р.). З того часу дослідники встановили, що різні мікроорганізми можуть використовувати відновлені форми фосфору в аеробних або анаеробних умовах. Генетичний аналіз окислення фосфіту у *E. coli* показав, що фермент С-Р ліаза, який кодується опероном *phn*, може окислювати фосфіт. Проте в останніх дослідженнях з використанням мутантів *E. coli* *phn* серед генів *phoA*, *phoBR* (оперон), *dsbA*, *срхА*, *lpp*, *ugiT*, *ugjM* і *uhjA*, лише фермент *phoA* ВАР (бактеріальна лужна фосфатаза) брав участь в окисленні [60]. Серед усіх досліджених мікроорганізмів особливо ретельно вивчали окислення фосфіту штамом *Pseudomonas stutzeri* WM88.

Генетичний аналіз окислення гіпофосфіту в *Pseudomonas stutzeri* WM88 сприяв ідентифікації двох окремих ділянок хромосоми, оперонів *htxABCDEFGHIJKLM* (кодує гіпофосфіт-2-оксоглутаратдіоксигеназу (*HtxA*)) і *ptxABCDE* (кодує фосфітдегідрогеназу (*PtxD*)), які необхідні для окислення гіпофосфіту та фосфіту, відповідно. У багатьох бактерій гени, задіяні в асиміляції Рі з різних сполук фосфору в навколишньому середовищі, викликають фосфатне голодування. *ptxD* є одним із чотирьох генів в опероні *PtxABCD* *Pseudomonas stutzeri*. *ptxABC* кодує білки, які утворюють транспортну систему АВС бактерій, яка регулює поглинання Рhi клітиною. *PtxD* (фосфітдегідрогеназа) – це клас ферментів NAD-залежної оксидоредуктази, який каталізує окислення відновленого фосфіту до фосфату з подальшим відновленням NAD до NADH [61, 62], як показано у формулі (1):



Активність фосфітдегідрогенази сильно залежить як від температури, так і від рН. Оптимальна температура для ферменту 35 °С з різким зниженням активності як за високої, так і за низької температурах. РТДН досить стабільний за кімнатної температури, тоді як період напіврозпаду за 40,5 °С становить лише 9,6 хв. Найбільш активним є за рН 7,25 [61].

На рисунку 1.5 зображено активний сайт ферменту фосфорибозилпіруватдегідратази (PTDH) з бактерії *Thermus thermophilus*.

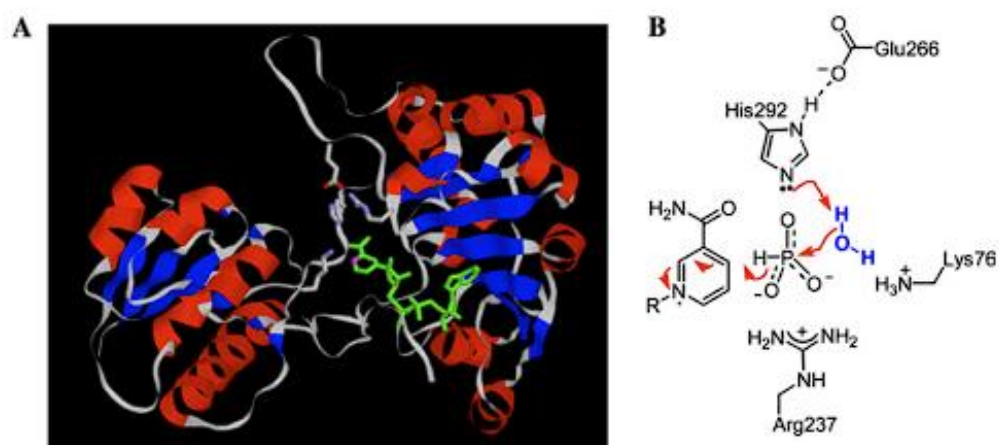


Рисунок 1.5 – Фермент фосфорибозилпіруватдегідратази (PTDH) з бактерії *Thermus thermophilus*: А) Вид активного сайту в гомологічній моделі PTDH; В) Залишки активного сайту в зв'язуванні субстрату та каталізі.

López-Arredondo і Herrera-Estrella [63, 64] вперше виявили, що надмірна експресія фосфітдегідрогенази в арабідопсисі та тютюні привела до окислення Phi до Pi та подальшої асиміляції як добрива трансгенними рослинами. Вони виявили, що трансгенні рослини, сконструйовані для експресії гена *ptxD* *Pseudomonas stutzeri*, потребують на 30–50% менше фосфору за удобрення Phi для досягнення подібного рівня продуктивності порівняно з рослинами, удобреними ортофосфатними добривами [63].

Очікується, що зменшення потреби в добриві на основі Phi не тільки зменшить вартість вирощування, але й стане важливою стратегією для збільшення запасів фосфору на землі. Ефективність використання добрива Phi у трансгенних рослинах наближається до 100% через його високу розчинність і знижену реактивність із компонентами ґрунту та ґрунтовими бактеріями, що забезпечує перевагу перед неефективним ортофосфатним добривом.

Оскільки шкідливий вплив фосфітів не встановлено, то їх доречно використовувати для вирощування безмаркерних трансгенних рослин, які будуть більш прийнятними для використання в польових умовах.

Крім розробки безмаркерних трансгенних рослин, опосередкована Phi селекція та розробка трансгенних рослин може надати кілька переваг порівняно з традиційним відбором трансгенних рослин, що ростуть на середовищі з антибіотиками. Солі Phi нешкідливі як для тварин, так і для людей, тому немає необхідності вживати особливих заходів безпеки. Оскільки до теперішнього часу не виявлено жодної рослини, яка метаболізує Phi, система *ptxD/Phi* може належним чином використовуватися як універсальний домінуючий маркер селекції [57].

1.5 Створення генетично модифікованих рослин

1.5.1 Огляд існуючих методів

Для створення генетично трансформованих рослин можуть бути використані різні методи, серед яких *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, метод «генної гармати», CRISPR/Cas9, електропорація, Ca^{2+} -залежна трансформація, MSN система, мікроін'єкції (рис. 1.6) [62].

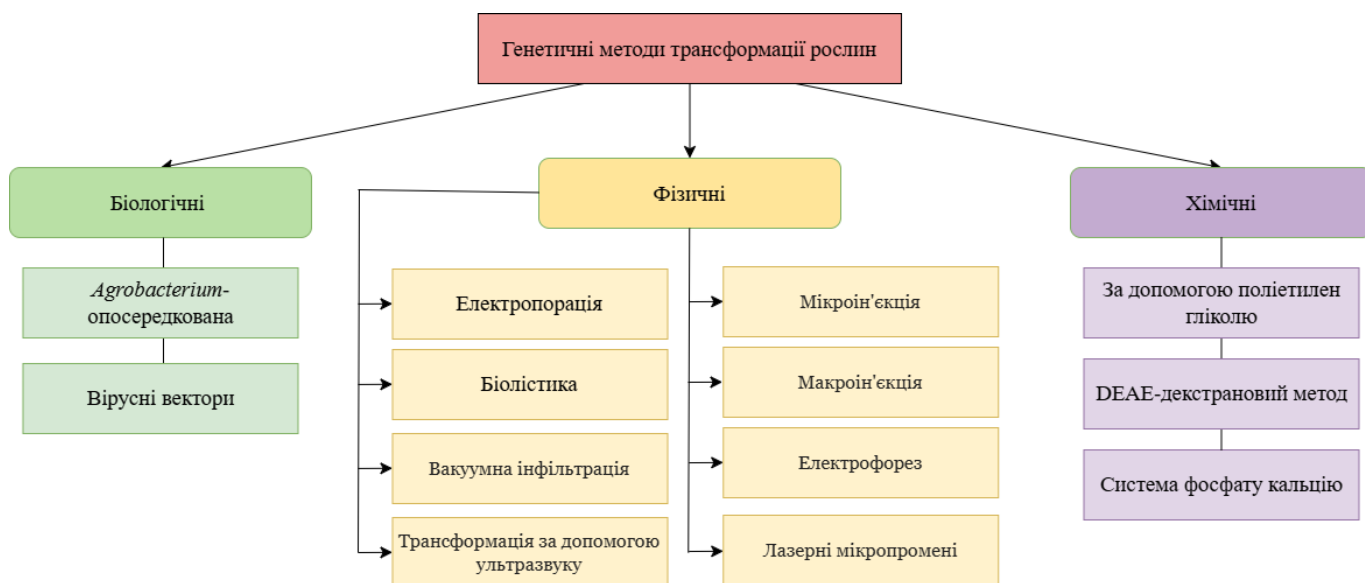


Рисунок 1.6 – Схема генетичних модифікацій рослин

Біологічні методи трансформації використовують плазміди, які є кільцевими позахромосомними дволанцюжковими молекулами ДНК, що містяться в бактеріях, дріжджах і деяких еукаріотичних клітинах.

Для створення рекомбінантних плазмід зазвичай використовують рестриктази та ДНК-лігази. Рестриктази розрізають донорну ДНК і плазмиду в певних місцях, а ДНК-лігази з'єднують ці фрагменти, утворюючи химерну молекулу ДНК, що містить як донорний ген, так і плазмідну ДНК. Рекомбінантна плазміда потім вводиться в бактеріальні клітини, де вона реплікується автономно завдяки наявності власного оріджина реплікації. Для відбору трансформованих клітин в плазмиду вводять селективний ген, наприклад, ген стійкості до антибіотиків. Інший метод створення плазмідних векторів використовує «Stitch PCR» – полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), яка дає змогу об'єднати різні фрагменти ДНК. Також існують системи рекомбінантного клонування, що дають змогу модифікувати геном різних організмів, включаючи гриби.

Небіологічні методи створення генетично модифікованих рослин включають кілька різноманітних підходів. Одним із таких методів є біолістика, або "генна гармата", яка використовує високошвидкісні частинки золота або вольфраму, покриті плазмідною ДНК, для проникнення в клітини рослин. Інший метод – електропорація, за якої електричні імпульси створюють тимчасові пори в клітинних мембранах, даючи змогу ДНК проникати в клітину. Мікроін'єкція передбачає введення ДНК безпосередньо в клітини за допомогою мікроскопічних голок. Хімічна трансдукція використовує хімічні речовини для підвищення проникності клітинних мембран. Використання волокон карбиду кремнію передбачає механічне проникнення ДНК в клітини рослин. Ліпосомна трансфекція, або ліпофекція, використовує ліпосоми для доставки ДНК до клітин, де ліпосоми зливаються з клітинними мембранами, випускаючи ДНК всередину клітин. Ці методи дають змогу ефективно створювати генетично модифіковані рослини з бажаними властивостями.

1.5.2 Опис *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

Біологічні трансформаційні системи переважно використовують трансформацію рослин за допомогою *Agrobacterium*, зокрема, опосередковане

A. tumefaciens перенесення Т-ДНК. *A. tumefaciens* є природним інструментом для генетичної інженерії. Це рухлива грам-негативна аеробна бактерія з роду *Rhizobiales*, яка викликає утворення корончастих галлів (рис. 1.7) та має здатність передавати Ті-плазмиду у рослинну клітину. Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є простим, ефективним та практичним протоколом для перенесення чужорідної ДНК. Проте, цей процес має недоліки

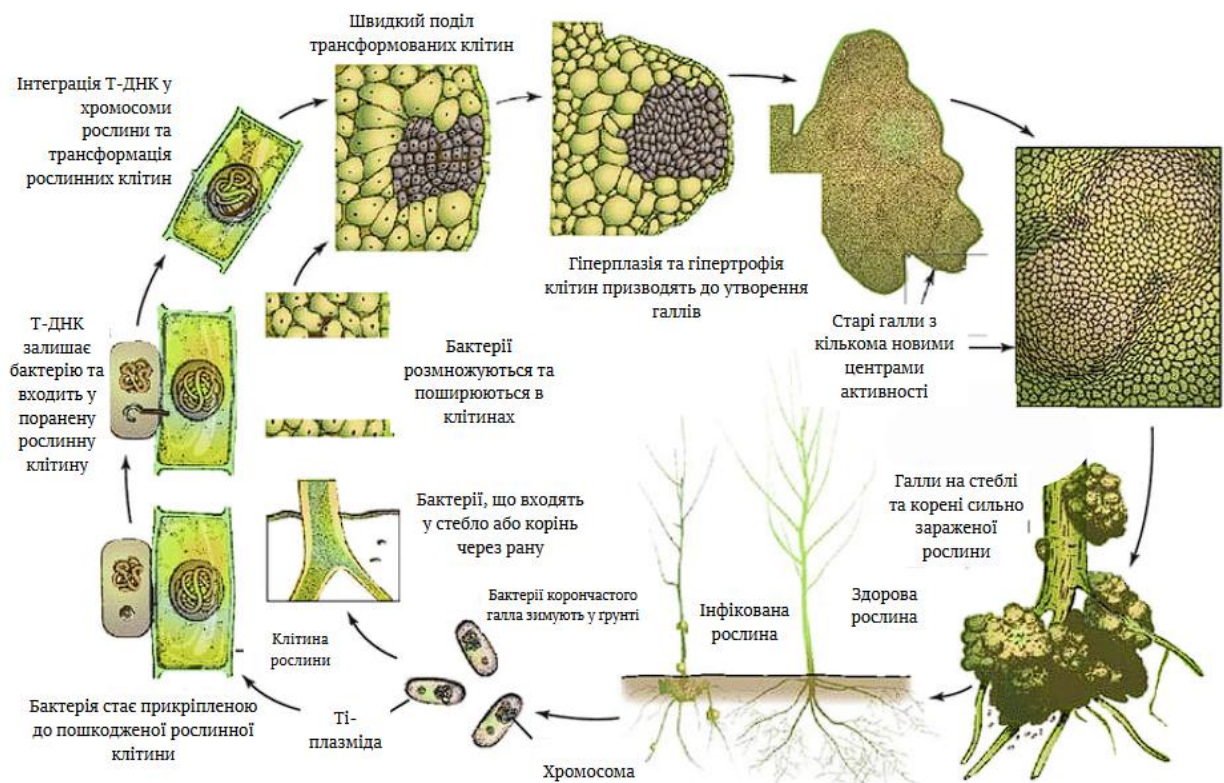


Рисунок 1.7 – Цикл розвитку корончастих галлів. Показано, як бактерії *Agrobacterium tumefaciens* інфікують рослину та перетворюють її клітини на галли, які поширюються по всій рослині [67]

Передача Т-ДНК від *Agrobacterium* до клітин рослин і її інтеграція в геном господаря є одним із найцікавіших явищ, що привернуло увагу біотехнологів і генетичних інженерів. Цей процес (рис.1.8) починається зі сприйняття зовнішнього сигналу від пораненої рослини, який передається до Ті-плазмиди, активуючи механізм розрізання та транспортування Т-ДНК. Після точного розрізання Т-ДНК утворюється прохід між бактеріальною та рослинною клітинами, що дає змогу доставити Т-ДНК до рослинної клітини.

Agrobacterium забезпечує захист Т-ДНК від рослинних нуклеаз, її доставку до ядра клітини рослини і придушення розвитку будь-якої резистентності у рослини. Генетичні інженери зауважили, що якщо *Agrobacterium* може передавати власну Т-ДНК, то можна інтегрувати бажаний ген у Т-ДНК і автоматично транспортувати його до рослинної клітини. Для реалізації цієї ідеї було важливо повністю зрозуміти механізм доставки Т-ДНК до рослинної клітини. Багаторічні дослідження привели до кращого розуміння цього процесу і значного успіху у створенні векторів на основі *Agrobacterium*.

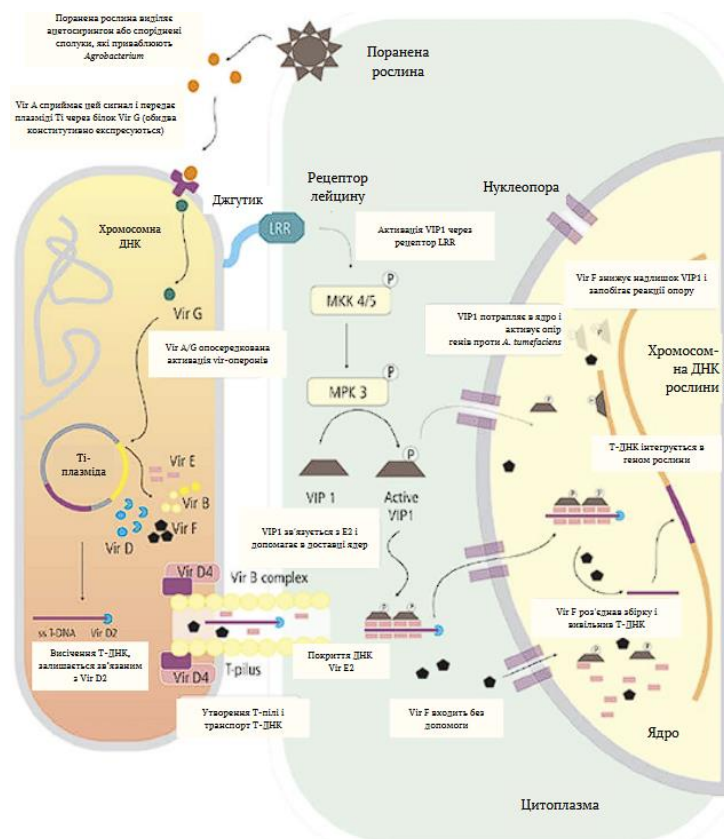


Рис. 1.8 – Загальний механізм перенесення Т-ДНК від *Agrobacterium* до рослини [67]

Процес *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації включає кілька етапів:

- ізоляція генів інтересу з обраного організму;
- розробка функціональної трансгенної конструкції, що має ген інтересу, промотори та маркерні гени для активації експресії й оптимізації кодонів для полегшення успішної трансформації і експресії;

- введення трансгену до Ti-плазмиди;
- введення плазмиди, яка містить T-ДНК, в *Agrobacterium*;
- ко-культивування трансформованих клітин *Agrobacterium* з клітинами рослин для передачі T-ДНК до хромосоми рослини;
- регенерація трансформованих рослин;
- тестування в лабораторії, теплиці та на полі для визначення характеристик або експресії трансгену.

Бінарна векторна система базується на тому, що використовується вектор, який містить сайти ініціації реплікації як для *E. coli*, так і для *A. tumefaciens*, але не несе гену *vir*. *Agrobacterium tumefaciens*, який використовується як реципієнт, несе модифіковану Ti-плазмиду, що не викликає пухлин ("роззброєну"). Ця плазміда містить усі *vir*-гени, але з неї видалена частина (або вся) T-ДНК (що робить неможливим транспортування T-ДНК). У цій системі неонкогенна Ti-плазміда синтезує продукти *vir*-генів, які мобілізують фрагмент T-ДНК бінарного клонувального вектора.

Найбільшою перевагою бінарного вектора є їхній менший розмір і зручність маніпулювання. Система бінарних векторів містить оріджини ДНК-реплікації *E. coli* та *A. tumefaciens*. У будь-якому випадку у бінарному векторі не присутні гени *vir* (які присутні на другому допоміжному векторі). Усі етапи клонування відбуваються в *E. coli*, перш ніж вектор вводиться в *A. tumefaciens*. Оскільки передача T-ДНК починається з правого кінця, маркер, який буде використовуватися для виявлення вставленої T-ДНК в хромосомну ДНК рослини, розташовується поруч з лівим кінцем. Якщо вибраний маркер розташований поруч з правим краєм, буде передано лише невелику частину T-ДНК, що призведе до отримання рослини без гена інтересу [67, 68].

1.6 Вибір *Nicotiana tabacum* як модельного організму

Nicotiana tabacum, або тютюн, є одним із найбільш досліджуваних організмів у сфері біології рослин. Ця рослина, яка є природним аллотетраплоїдом, була сформована близько 6 мільйонів років тому шляхом

гібридизації двох диплоїдних батьківських видів [69]. Від зерна до наступного покоління займає лише 3 місяці, і кожна рослина може виробляти до мільйона насінин. Тютюн швидко розповсюджується, займаючи сотні або тисячі акрів, що робить його привабливим об'єктом для досліджень.

Перші спроби генетичної інженерії рослин були проведені саме на тютюні. Від моменту відкриття можливості перенесення генів тютюн залишається найбільш популярною системою для досліджень. Були вирощені перші трансгенні рослини, і всі експерименти, пов'язані з трансформацією рослин, експресією генів та стійкістю генів, були розроблені саме на тютюні. Багато перших досягнень в галузі генетичної інженерії рослин були основані на роботі з тютюном.

В даний час *Nicotiana benthamiana* використовується для виробництва рекомбінантних білків, антитіл та спеціальних хімічних сполук для застосування в медицині та промисловості. Дослідження в області культури тканин та генетичної маніпуляції на тютюні настільки великі, що їх не можна об'єднати в одну компіляцію [69].

Трансформація тютюну стала можливою завдяки ефективній регенерації та тривалому періоду досліджень *Agrobacterium*, починаючи з робіт Брауна у 1958 році.

Виявлено, що фактори, які викликають утворення пухлин, зберігаються в тканинах тютюну після багатьох поділів клітин. Тютюн виявився ідеальним хазяїном для *Agrobacterium*, утворюючи великі гали після зараження стебел і широко використовується для дослідження коронкових галлів. Виділення Ті-плазмід *Agrobacterium* і демонстрація вставлення бактеріальної ДНК в ДНК клітин-господарів стали ключовими віхами для розробки векторів для трансформації рослин.

Система трансформації протопластів тютюну незабаром була замінена простішою системою, що включає інкубацію листових дисків з *Agrobacterium*. Листкові диски тютюну реагують на цитокінін і ауксин в культуральних середовищах, що дає змогу регенерувати пагони, коріння та

стимулювати утворення калюсу за допомогою відповідних комбінацій гормонів. Це робить процес трансформації більш ефективним [69].

Висновок розділу: внаслідок проведеного огляду літератури, важливо відзначити ключову роль фосфору в життєдіяльності рослин та значення розвитку методів трансформації, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, на прикладі модельного організму *Nicotiana tabacum*, для подальшого вивчення та вирішення проблем використання фосфатних добрив у рослинництві.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти досліджень та їх характеристики:

Nicotiana tabacum L., відомий як тютюн звичайний, є однією з найбільш економічно важливих технічних культур у світі, що є основним видом для комерційного виробництва курильного тютюну. На цей час *N. tabacum* є класичним модельним об'єктом генетики рослин і широко використовується в генетичній інженерії. Оскільки *N. tabacum* є цінною сільськогосподарською культурою, яка є добре вивченою, а її референтний геном доступний у відкритій базі даних.

Вид *N. tabacum* включає багато сортів, які відрізняються за ефективністю регенераційного процесу. У дослідженні з трансформації рослинного матеріалу використовували сорти *Nicotiana tabacum* Petit Havana, Wisconsin, Samsun, які не засвоюють фосфіти. Цей вибір сортів був обґрунтований попередніми дослідженнями та потребою в модифікованих методах ефективною трансформації та відбору трансформантів.

Agrobacterium tumefaciens – це грамнегативна бактерія, яка є патогеном рослин. Вона відома своєю здатністю викликати пухлини на стеблах і коренях дводольних рослин, включаючи тютюн. *Agrobacterium tumefaciens* використовується як вектор для введення чужорідної ДНК (гени *ptxD* та *bar* від *Pseudomonas stutzeri*) в клітини рослин в процесі, відомому як *Agrobacterium*-опосередкована трансформація.

2.2 Обладнання:

- автоматичні дозатори на 10, 20, 100, 200, 1000, та 5000 мкл (Biohit, Фінляндія);
- електронні ваги (Sartorius, Німеччина);
- центрифуги: «Centrifuge 5418», «Centrifuge 5430 R» (Eppendorf, Німеччина);
- термошейкер «BioSan TS-100» (BioSan, Латвія);
- орбітальний шейкер «BioSan OS-20» (BioSan, Латвія);

- термостат ТВЗ-23 (Медлаботехника, СРСР);
- вортекс: «V-1 plus» (BioSan, Латвія);
- ламінарний бокс «Gelaire HF 72» (Gelaire, Австралія);
- спектрофотометр «BioPhotometer plus» (Eppendorf, Німеччина);
- рН метр «HI1230» (Hanna instruments, США);
- скороварка «Berghoff 1101871 Vita 9л» (Berghoff, Бельгія);
- стерилізатор сухоповітряний «ГП-80МО» (РСТ, Росія);
- мікрохвильова піч «LG MH6329H» (LG, Південна Корея);
- транслюмінатор (LKB bromma, США);
- камера для електрофорезу «MSCHOICEST» (Clever scientific, Великобританія);
- джерело живлення для електрофоретичної камери «EPS 500/400» (Pharmacia, Швеція);
- фотоапарат «Canon EOS 600D» (Canon, Японія).

2.3 Матеріали, реактиви та реагенти:

- агар-агар мікробіологічний (Хімлаборреактив, Україна);
- стрептоміцин (Arterium, Україна);
- цефтріаксон (Arterium, Україна);
- 20 мМ калій дигідрофосфіт K_3PO_3 ;
- буфер MES (Carl Roth GmbH, Німеччина);
- агаризоване середовище Мурасіге-Скуга (Murashige and Skoog medium, MS);
- агаризоване середовище Мурасіге-Скуга для регенерації (Murashige and Skoog medium for regeneration, MSR);
- агаризоване та рідке середовища LB (Luria Bertani) для вирощування культур бактерій;
- хлорид кальцію $CaCl_2$ (ч., Реахім, Україна);
- хлорид натрію NaCl (х.ч., Альфарус, Україна);
- гіпохлорит натрію NaOCl (тех. Кожен День, Україна);

- гідроксид калію KOH (х.ч., Sigma, США);
- фосфітна кислота H₃PO₃ (х.ч., Sigma, США).
- органічні сполуки:
- сахароза (х.ч., Duchefa Biochemie, Нідерланди);
- 70 % та 96 % етиловий спирт (ч., Фармацевтична фабрика, Україна);
- ацетат натрію (рН 5,2) (ч.д.а, Реакім, Україна);
- 0,5 М етилендіамінтетраоцтова кислота, ЕДТА (рН 8,0) (х.ч., Sigma, США);
- праймери:
- bar3F;
- bar4R;
- буферні розчини:
- 1 М трис-Cl (2-аміно-2-оксиметил-пропандіол-1,3) (х.ч., Альфаварус, Україна);
- трис-ЕДТА (TE) буфер: 10 мМ трис (рН 8,0), 1 мМ ЕДТА, рН 8,0;
- літій боратний (lithium borate, LB) буфер: 10 мМ LiOH x H₂O (Sigma-Aldrich, США) та 25 мМ H₃BO₃ (Химреактив, Україна), рН 8,2;
- 10 × буфер Б (10 × Buffer B) (Thermo Fisher Scientific, США);
- СТАВ + PVP буфер: 2% СТАВ (Sigma, США), 100 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 1,4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 1,0% PVP40 (Sigma, США), 8 мМ аскорбінової кислоти (Sigma, США);
- ферменти:
- РНК-аза А (Thermo Fisher Scientific, США);
- протеїназа К (Thermo Fisher Scientific, США);
- Таq-полімераза (5 U / мкл) (Thermo Fisher Scientific, США)

2.4 Методи виконання роботи

Загальну схему отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* представлено на рисунку 2.1.

В роботі використано метод культури тканин *in vitro* для створення калюсних культур та регенерації рослин.

Молекулярні методи, такі як виділення загальної ДНК, ПЛР та електрофорез продуктів ампліфікації ДНК, використовували для виявлення трансгенів у рослинах тютюну, які були отримані за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* [68, 69].

Статистичний метод використовували для забезпечення достовірності отриманих результатів, кожним штамом обробляли по 30 квадратів листків кожного сорту тютюну (всього 360 оброблених суспензіями *Agrobacterium t* листкових дисків).



Рисунок 2.1 – Схема проведення дослідження

2.4.1 Приготування та стерилізація поживних та живильних середовищ

Першим етапом експерименту було приготування поживних середовищ для культивування бактерій і живильних середовищ для вирощування рослин.

Для культивування бактерій застосовували агаризовані та рідкі поживні середовища, розроблене Luria та Bertani (лізогенний бульйон, Lysogeny broth, LB). Для приготування середовища використовували компоненти, які вказані в таблиці 2.1. Їх розчиняли в дистильованій воді, перемішування відбувалося за допомогою магнітної мішалки. Для досягнення оптимального рН середовища (7,0) було використано 1N розчин гідроксиду натрію (NaOH). Для приготування агаризованих поживних середовищ додавали 7-8 г/л агар-агару [70].

Автоклавування середовища проводили за тиску 1 атм та за температури 121-124 °C протягом 20 хвилин.

Таблиця 2.1 – Компоненти середовища LB [1]

Компонент	Кількість, г/л
NaCl	10
Пептон	10
Дріжджовий екстракт (bacto-yeast extract)	5
Агар-агар	15
Дистильована (деіонізована) вода до 1 л	

Для вирощування рослин готували живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) за стандартною методикою [69]. Компоненти маточних розчинів середовища Мурасіге-Скуга представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Компоненти маточних розчинів середовища Мурасіге-Скуга [2]

Компонент	Кількість, г/л
Маточний розчин макросолей	
KNO_3	19,0
NH_4NO_3	16,5
KH_2PO_4	1,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
Маточний розчин мікросолей	
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 мг розчиняють в 400 мл дистильованої (деіонізованої) води. Додають по 2,5 мг в середовище
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	
Fe-хелат	
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,52
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,45
Вітаміни Мореля	
Біотин (B7)	0,005
Нікотинова кислота (PP)	0,5
Тіамін·HCl (B1)	0,5
Піридоксин·HCl (B6)	0,5
Са-пантотенат (B5)	0,5

Під час приготування маточних stokів вітамінів та солей всі складники розчиняли у невеликих кількостях деіонізованої води для забезпечення кращого розчинення та запобігання утворенню нерозчинних відкладень.

Для приготування стоку Fe-хелату застосовували такий підхід:

- у циліндр наливали 50 мл дистильованої води і додавали 1114 мг $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, підігрівали та перемішуючи до повного розчинення;

- в іншому циліндрі також підігрівали та розчиняли у 50 мл дистильованої води Na_2EDTA ;

- потім змішували отримані розчини $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та Na_2EDTA та доводили до кінцевого об'єму 200 мл за допомогою дистильованої води. Процес змішування виконували за підігрівання.

Після приготування мікросолі, макросолі, Fe-хелат, вітаміни Мореля та сахарозу змішували у дистильованій воді у кількостях, які наведені в таблиці 2.3. Далі рН за допомогою 1N гідроксид натрію (NaOH) доводили до значень 5,6-5,8; додавали дистильовану воду та агар-агар.

Таблиця 2.3 – Компоненти середовища Мурасіге-Скуга (MS)

Компонент	Кількість на 1 л
Вітаміни Мореля	2 мл
Мікросолі	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Макросолі	50 мл
Сахароза	20 г
Агар-агар	7-8 г
NaOH	Для регулювання рН, залежно від показника

Приготоване живильне середовище розливали у термостійкі скляні банки об'ємом 500 мл, у які заздалегідь додавали по 4 г агару в кожну.

Середовище стерилізували в автоклаві під тиском 1 атм за температури 121-124 °С протягом 20 хвилин [71].

Для регенерації рослин після ко-культивування готували живильне середовище Мурасіге-Скуга для регенерації (Murashige and Skoog medium for regeneration, MSR) за стандартною методикою приготування середовища MS, з додаванням фітогормонів – 6-бензиламінопурину (БАП) та α -нафтилоцтової кислоти (НОК) для пагоноутворення [72]. Компоненти, які були використані, вказані в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4 – Компоненти середовища Мурасіге-Скуга для регенерації (MSR)

Компонент	Кількість на 1 л
Вітаміни Мореля	2 мл
Мікросолі	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Макросолі	50 мл
Сахароза	20 г
Агар-агар	7-8 г
NaOH	Для регулювання рН, залежно від показника
6-бензиламінопурин	1 мг
α -нафтилоцтова кислота	0,1 мг

2.4.2 Вирощування рослин *Nicotiana tabacum*

Насіння *Nicotiana tabacum* сорту Petit Havana замочували в 70% етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім спиртовий розчин замінювали на 10% розчин NaOCl, де насіння витримували 2 хвилини. Після цього насіння чотирикратно відмивали стерильною дистильованою водою, поступово збільшуючи час експозиції з 2 до 15 хвилин з кроком 1, 7 та 5 хвилин відповідно.

Далі проводили пророщування насіння на агаризованому середовищі MS за відповідних температурних умов і без додавання гормонів [71]. Цей крок був критичним для отримання життєздатних проростків, готових до трансформації. Далі, проростки були пересаджені у банки зі свіжим MS середовищем, де їх культивували протягом 6 місяців за температури 23 °C та освітленні 16 годин світла / 8 годин темряви у культиваційній кімнаті (рис. 2.2) з регулярною пересадкою кожні 4 тижні.



Рисунок 2.2 – Культиваційна кімната для вирощування рослин

2.4.3 Підбір селективного середовища

Для створення селективного середовища для відбору трансформантів, було розроблено MSR(Phi) на основі MSR, яке містило фосфітну кислоту як джерело фосфору.

Цей етап вимагав ретельного контролю рН середовища та оптимізації його параметрів. Рівень рН культурального середовища має бути таким, щоб не порушувати рослинну тканину. У допустимих межах рН також визначає, чи залишаться солі в розчинній формі; впливає на поглинання інгредієнтів

середовища та регуляторів росту рослин, на хімічні реакції (особливо ті, що каталізуються ферментами) і на ефективність гелеутворення агару [73].

pH середовища для регенерації *Nicotiana tabacum* має бути в межах 5,6-5,8, оскільки цей діапазон оптимально сприяє поглинанню іонів та вегетативному органогенезу рослини. Результати дослідження показали, що перші 48 годин є критичними для процесу органогенезу, під час яких відбувається значний іонний обмін між живильним середовищем і експлантами, а клітинні поділи починаються в субепідермальній хлоренхімі та в глибших шарах паренхіми [74].

Для підтримки сталого pH середовища використовуються буфери – сполуки, які можуть підтримувати рівень pH на вибраному рівні: ефективні буфери мають підтримувати pH з невеликими змінами під час культивування. Сполуки, які використовувалися в культуральних середовищах рослин для цілей, таких як виділення та культивування протопластів, а також культивування клітин за дуже низької щільності інокуляції, – TRIS (трис(гідроксиметил)амінометан, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$), трицин (трис(гідроксиметил)метилгліцин, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$), HEPES ((4-(2-гідроксиетил)-1-піперазин(2-етансульфонова кислота)), $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$).

Для середовища MSR(Phi) було обрано MES, який має значну буферну здатність в діапазоні pH 5-6, до якого доводять живильні середовища, і має лише низьку здатність до зв'язування з мікроелементами.

Подальший підбір оптимального співвідношення фосфатів та фосфітів в селективному середовищі був важливим для забезпечення ефективності та специфічності відбору трансформантів.

2.4.4 Відновлення культур *Agrobacterium tumefaciens*

Для трансформації використовували штами *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 та C58. Варіанти колоній GV4.1 та C9.1 мали генетичні конструкції, T-ДНК яких містила лише ген *ptxD*, тоді як варіанти GV8.2 та C3.2, крім гена

ptxD, містила також маркерний ген *bar*.

Штами зберігали в замороженому стані з гліцериним за температури мінус 70 °С. Для відновлення бактерій їх висівали штриховим методом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем LB, що містило стрептоміцин (50 мг/мл). Антибіотик стрептоміцин використовується для усунення розвитку небажаних бактерій, не перешкоджаючи розвитку *Agrobacterium*, адже в них є плазміда зі стійкістю до даного препарату [75]. Чашки інкубували у термостаті за температури +26 °С протягом 24 годин. Після інкубації окремі колонії переносили мікробіологічною петлею в рідке середовище LB у колби об'ємом 250 мл, які потім ставили в шейкер без світла на 24-48 годин за температури +26 °С з кількістю обертів 150 хв⁻¹.

Використовували метод спектрофотометрії для вимірювання оптичної щільності суспензії бактерій за довжини хвилі 600 нм (OD₆₀₀). Для цього бактеріальні суспензії центрифугували (1500 хв⁻¹ протягом 15 хвилин) для відбору супернатанту, а осад біомаси розчиняли в середовищі для інокуляції за допомогою вортекса. Оптимальне значення OD₆₀₀ для трансформації мало бути в межах від 0,5 до 1.

2.4.5 Генетична трансформація рослин тютюну

Процес трансформації вирощених рослин включав обробку листкових дисків бактеріальними суспензіями, після чого їх культивували на регенераційному середовищі (MSR(Phi)) до появи проростків.

У цьому дослідженні ми зосередилися на трансформації трьох сортів тютюну (*Nicotiana tabacum*): Petit Havana, Wisconsin та Samsun за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Метою було вивчення ефективності генетичної трансформації з використанням різних селективних середовищ і штамів бактерій.

Експланти тютюну (листові диски) інокулювали у бактеріальній суспензії протягом 30-45 хвилин на шейкері з частотою обертання 90 об/хв, після чого їх просушували на стерильному фільтрувальному папері в

асептичних умовах. Далі експланти переносили на агаризоване середовище MSR для ко-культивування *Agrobacterium tumefaciens* та *Nicotiana tabacum* протягом 48 годин за температури +22 °С у темряві. Після ко-культивування для видалення бактерій на чашки Петрі розливали приготоване середовище для елімінації бактерій з додаванням антибіотику цефтріаксону до концентрації 500 мг/л та переносили по 14 листкових дисків.

Оскільки тільки варіанти колоній C3.2 та GV4.1 містили генетичну конструкцію з геном стійкості *bar*, що обумовлює стійкість рослин, середовище MSR(Phi), доповнене цефтріаксоном і фосфіотрицином (PPT), використовували для селекції трансформованих рослин. Трансформовані рослини повинні мати цей ген і, відповідно, повинні вирости на цьому середовищі.

Крім того, були вирощені контрольні рослини для перевірки регенерації рослин на середовищі MSR без додавання фосфітів і негативний контроль, де рослини проходили всі етапи, окрім інокуляції бактеріальною суспензією.

2.4.6 Виділення загальної ДНК рослин

Для виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу, асептично відрізали 30 регенерантів трансформованих та контрольних (нетрансформованих) зразків. 0,02-0,07 г гомогенату переносили у пробірку Eppendorf об'ємом 1,5 мл. Додавали 100 мкл деіонізованої води і залишили на 10 хвилин. Потім додавали 600 мкл підігрітого до 70 °С буферу СТАВ + PVP і перемішували суміш на шейкері протягом 1 хвилини. Склад буферу СТАВ + PVP представлений в таблиці 2.5.

Далі додавали 500 мкл суміші хлороформу: ізоамілового спирту (24:1) і змішували 5 хвилин при 500 об/хв. Після цього центрифугували суміш за 12000 об/хв протягом 5 хвилин. Відбирали 300 мкл верхньої водної фази, яка містить ДНК, і переносили її у чисту пробірку Eppendorf об'ємом 1,5 мл.

Додавали 210 мкл ізопропанолу, перемішували обертанням і залишали на 5 хвилин за кімнатної температури.

Відцентрифугували суміш за 12000 об/хв протягом 20 хвилин. Зливали супернатант і додавали 800 мкл 70% етанолу, після чого ресуспендували осад. Центрифугували суміш ще раз протягом 5 хвилин за 12000 об/хв і обережно зливали супернатант.

Таблиця 2.5 – Компоненти буферу СТАВ + PVP [77]

Назва	Кількість (на 1000 мл)
СТАВ	20 г
NaCl	82 г
EDTA	40 мл
Tris HCl	16 г
PVP 40	20 г
Аскорбинова кислота	0,88 г
DIESA	0,9 г
Дистильована (деіонізована) вода	Довести до 1 л
pH	8,5

Після цього центрифугували ще 2 хвилини, відбирали залишки етанолу дозатором і висушували осад за температури 55 °С. Розчиняли ДНК у 100 мкл деіонізованої води з pH 8,0.

Наявність і чистоту ДНК у зразках визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичну щільність зразків за довжин хвиль 230, 260, 280 та 340 нм та отримували коефіцієнти чистоти ДНК за співвідношеннями A260/230 (забруднення фенолами) та A260/280 (забруднення протеїнами).

2.4.7 Полімеразна ланцюгова реакція зразків

Для виявлення у зразках виділеної ДНК гену *bar* використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з праймерами bar3F з bar4R. Компоненти для реакційної суміші ПЛР представлено в таблиці 2.6.

Таблиця 2.6 – Компоненти реакційної суміші ПЛР Master Mix

Назва	Кількість (на 1 зразок), мкл
Вода молекулярно-біологічної чистоти (mQ)	9,3
Буфер Б	2
MgCl ₂	1,6
dNTP	2
Праймери	По 0,5
ДНК полімераза	0,1
Барвник (кресол та сахароза)	2
Зразок ДНК	2

Реакцію проводили за таких умов: спочатку денатурація ДНК за температури 94 °С протягом 4 хвилин, після чого повторювали денатурацію ДНК за температури 94 °С протягом 30 секунд. Далі здійснювали відпал за температури 58 °С протягом 30 секунд, а потім елонгацію за температури 72 °С протягом 30 секунд.

Ці стадії (денатурацію протягом 94 °С, відпал і елонгацію) повторювали 35 разів. Після цього завершували процес остаточною елонгацією за температури 72 °С протягом 5 хвилин.

Після полімеразної реакції робили електрофорез в агарозному гелі, виготовленому з літій-боратного буферу з додаванням до нього бромистого етидію. Як маркер використовували «100 bp DNA Ladder». Детекцію молекул проводили в транслюмінаторі «2011 MACROVUE».

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вирощування рослин *Nicotiana tabacum*

Вирощування сортів рослин *Nicotiana tabacum* є важливим етапом у біотехнологічних дослідженнях, особливо за підготовки рослин до подальшої генетичної трансформації. Простерилізоване насіння *Nicotiana tabacum* було висіяне на агаризоване середовище Мурасіге-Скуга (MS). Це середовище є стандартним для культивування багатьох видів рослин у лабораторних умовах завдяки своєму багатому складу мінеральних солей, вітамінів та амінокислот, які забезпечують оптимальний ріст і розвиток рослинних клітин та тканин. Насіння пророщували в чашках Петрі (рис. 3.1) за температури 22 °С і світлового режиму 16 годин світла та 8 годин темряви. Ці умови були обрані для імітації природних умов вирощування та стимулювання рівномірного проростання.

Отримані проростки були пересаджені в банки з агаризованим середовищем MS для подальшого культивування в асептичних умовах. Такий підхід мінімізує ризик контамінації і забезпечує стабільні умови для росту рослин.

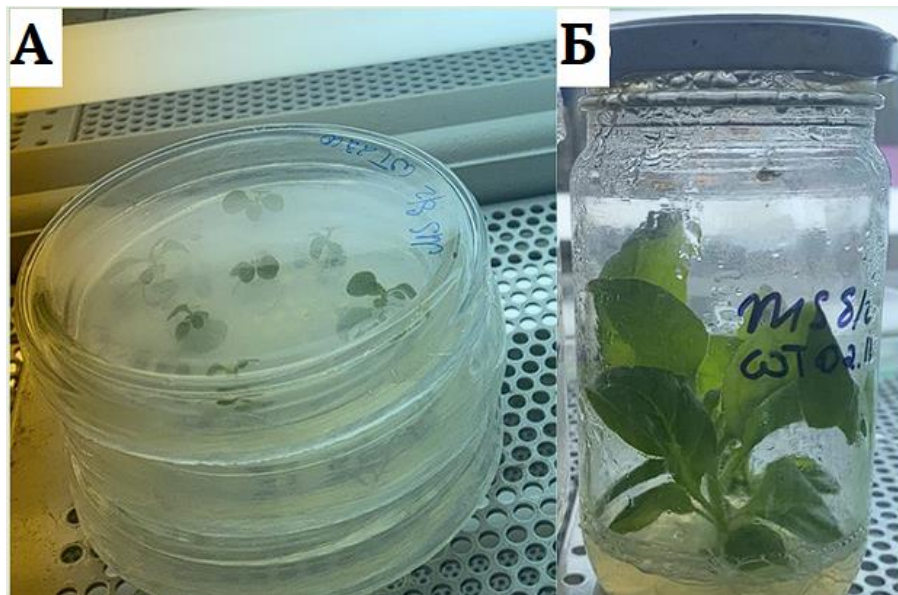


Рисунок 3.1 – Рослина *Nicotiana tabacum* сорту Petit Havana через: А) 1 місяць культивування; Б) 4 місяці культивування.

Культивування проводили з регулярною пересадкою на свіже середовище кожні 4 тижні. Це давало змогу забезпечити рослини необхідними поживними речовинами і запобігати накопиченню токсичних метаболітів.

Загалом було пророщено 30 насінин, 28 проростків яких було пересаджено в асептичних умовах в стерильні банки. З них вижило 89%.

Дані рослини використовували для трансформації після досягнення ними оптимального розміру.

Отже, в ході роботи було отримано стерильні рослини *Nicotiana tabacum*. Використання середовища Мурасіге-Скуга за даного режиму сприяло успішному пророщуванню насіння і здоровому розвитку проростків. Регулярна заміна середовища кожні 4 тижні забезпечила стабільні умови для росту та розвитку рослин.

3.2 Підбір селективного середовища

В даному дослідженні використовували середовище MSR з частковим або повним заміщенням фосфатів на фосфіти для оцінки ефективності селекції трансформованих рослин тютюну сорту Petit Havana.

Для підготовки селективного середовища використовували модифіковане середовище MSR – MSR(Phi), в якому частково або повністю замінювали фосфати фосфітами.

3.2.1 Підбір концентрації MES для стабілізації рН селективного середовища MSR(Phi)

Було встановлено, що після додавання розчину фосфітної кислоти в середовище MSR з різною концентрацією фосфатів кінцеве рН середовища було занадто закислене. Результати вимірювань рН за різних концентрацій доданої кислоти наведено в таблиці 3.1.

Значення рН після додавання фосфітної кислоти (3,28-4,92) не є оптимальним для регенерації рослин, оскільки регенерація відбувається за рН 5,6-5,7 [78].

Таблиця 3.1 – Залежність рН від доданої фосфітної кислоти

Концентрація фосфату	Концентрація фосфітів	Початове значення рН	Значення рН після додавання фосфіту
0%	100%	6	3,28
25%	75%	6	3,47
50%	50%	6	3,67
75%	25%	6	4,92
100%	0%	6	6

Для стабілізації рН до середовища MSR(Phi) додавали MES (2-(N-морфоліно) етансульфонова кислота). З літературних джерел відомо, що 0,05 М буфер MES є токсичним для культур тютюну, проте 0,01 М буфер MES є нетоксичним і ефективним для стабілізації рН [79].

Тому було розраховано, що для забезпечення концентрації 0,01 М в середовище необхідно додавати 1,9 г/л буферу MES.

Подальші виміри рН за різних концентрацій фосфітної кислоти показали, що дана кількість буферу є достатньою для підтримання стабільного рН на рівні 5,6-5,7. Це забезпечувало оптимальні умови для росту і регенерації рослин.

3.2.2 Підбір концентрацій фосфітів та фосфатів для селективного середовища MSR(Phi)

Для приготування селективного середовища використовували компоненти середовища MSR з частковим або повним заміщенням фосфату на фосфіти. Концентрований 10% розчин фосфітної кислоти додавали в простерилізоване середовище з різними концентраціями фосфатів – 0%, 25%, 50%, 75% та 100% (приготовлені розчини макросолей мали різну кількість дигідрофосфату калію) перед застиганням агару та розливали у чашки Петрі.

Після застигання середовища в чашки Петрі розкладали листові диски нетрансгенних рослин тютюну сорту Petit Navana, розміром приблизно 1x1 см, які отримували за допомогою вирізання в асептичних умовах з листків (5-7 см в довжину) скальпелем.

Використання середовища MSR з частковою або повною заміною фосфатів на фосфіти показало, що на середовищах, які містили 100%, 75% та 50% фосфатів, не спостерігалось візуальних змін листових дисків нетрансгенних рослин тютюну сорту Petit Navana. На середовищах, що містили 25% та 0% фосфатів, листові диски білили та некротизувалися (рис. 3.2).

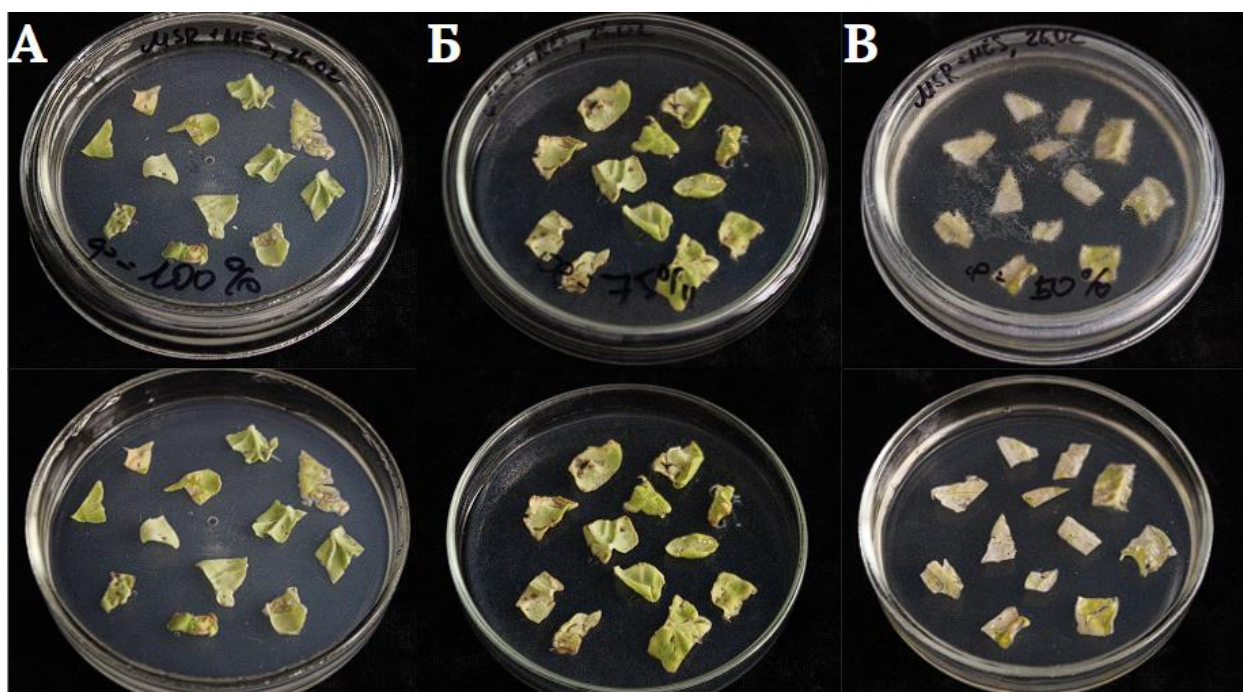


Рисунок 3.2 – Вибір селективного середовища за реакцією на регенерацію нетрансгенних рослин з рослинних дисків: А) 100% фосфатів та 0% фосфітів; Б) 75% фосфатів та 25% фосфітів; В) 50% фосфатів та 50% фосфітів

Отримані результати свідчать про те, що середовище, яке містить 50% фосфітів і 50% фосфатів, є селективним середовищем для трансформованих рослин *Nicotiana tabacum* сорту Petit Navana. На такому середовищі не відбувалось регенерації.

3.3 Відновлення культур *Agrobacterium tumefaciens*

Для ефективної трансформації рослин необхідно використовувати високоякісні культури бактерій. У даному дослідженні було проведено відновлення та підготовку двох штамів *Agrobacterium tumefaciens* (C58 та GV3101), які зберігались в замороженому стані.

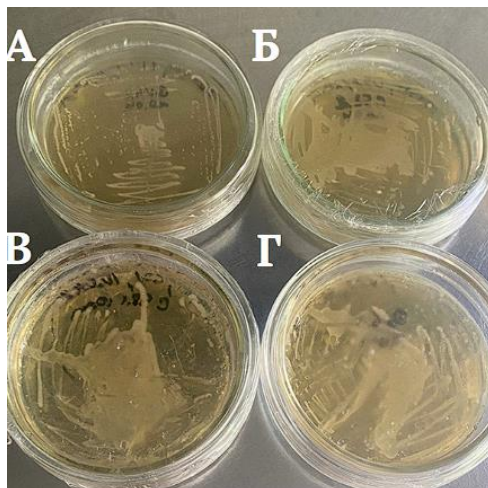


Рис. 3.3 – Відновлення штамів *Agrobacterium tumefaciens* C58 та GV3101 на чашках Петрі : А) GV4.1; Б) C3.2; В) C9.1; Г) GV 8.2

Варіанти колоній C3.2 та GV 8.2, окрім гену *ptxD* в T-ДНК генетичної послідовності, мав також ген *bar*.

Отримані значення оптичної щільності для штамів представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Результати спектрофотометрії щільності бактеріальних клітин

Варіант колонії <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Оптична щільність ($\lambda=600$ нм)
C9.1	0,64 \pm 0,02
C3.2	0.77 \pm 0,06
GV4.1	0.55 \pm 0,03
GV8.2	0.91 \pm 0,01

Отже, було відновлено та підготовлено культуру *Agrobacterium tumefaciens* для генетичної трансформації рослин. Отримані значення оптичної щільності (OD_{600}) для всіх штамів знаходились в межах оптимальних показників (від 0,5 до 1), що забезпечує успішну інокуляцію рослинних клітин.

3.4 Генетична трансформація тютюну

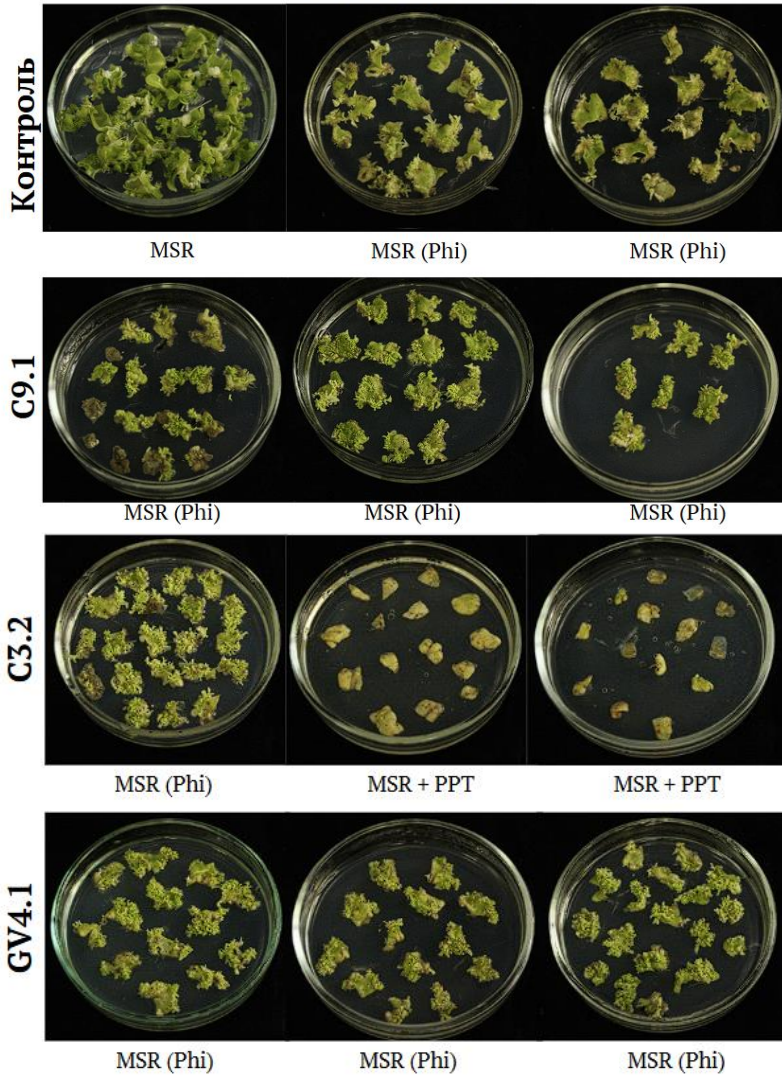
У цьому дослідженні ми зосередилися на трансформації рослин тютюну таких сортів: Petit Havana, Wisconsin та Samsun за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*.

В контролі – на середовищі MSR (з фосфатами) – регенеранти почали з'являтися вже через 2 тижні, тоді як на дослідних чашках Петрі – через 3 тижні. Наявні результати (рис. 3.4) свідчать про регенерацію трансформованих рослин на селективному середовищі MSR(Phi) – фосфатів : фосфітів = 1:1, що може свідчити про успішну трансформацію геном *ptxD*.

Спостерігались відмінності в частоті регенерації між рослинам різних сортів *Nicotiana tabacum*. Для рослин сортів Petit Havana та Samsun селективне середовище з 50% фосфатів та 50% фосфітів було селективним: дослідні зразки продемонстрували більшу частоту регенерації порівняно з контролем. Сорт Wisconsin, натомість, показав подібну до контролю частоту регенерацію. Це свідчить про необхідність підбору середовища з меншою кількістю фосфатів для цього сорту.

Рослини сортів Wisconsin та Samsun, отримані в результаті трансформації дослідженою генетичною конструкцією, Т-ДНК якої містить ген *ptxD*, регенерували на середовищі MSR(Phi), доповненому фосфінотрицином, що свідчить про вбудовування гену *ptxD* в рослинний геном. Водночас, рослини, оброблені колонією бактерій *Agrobacterium tumefaciens* GV8.2, не показали регенерації на аналогічному середовищі. Це можна пояснити тим, що цей варіант був розроблений для трансформації однодольних рослин, тоді як тютюн належить до дводольних. Узагальнені результати представлені в таблиці 3.3.

Petit havana



Середовища:

MSR - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації

MSR(Phi) - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації з додаванням 50% фосфітів та 50% фосфатів

MSR + PPT - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації з додаванням гербіциду фосфілотрицину

Рисунок 3.4 – Частота регенерації *Nicotiana tabacum* сорту Petit Havana

Wisconsin

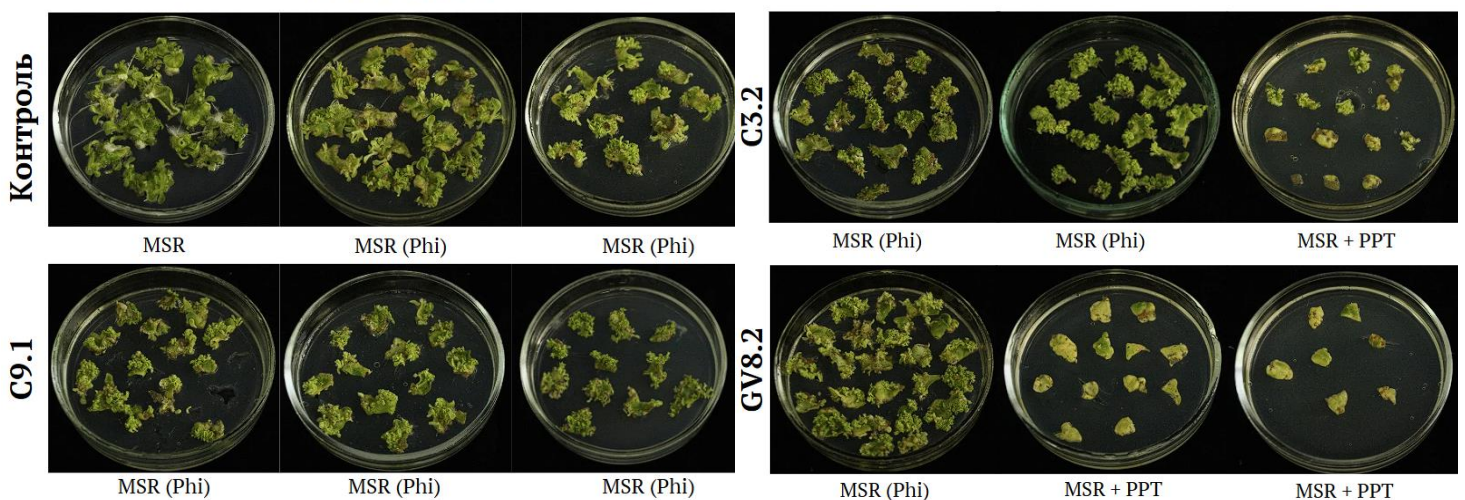


Рисунок 3.5 – Частота регенерації *Nicotiana tabacum* сорту Wisconsin

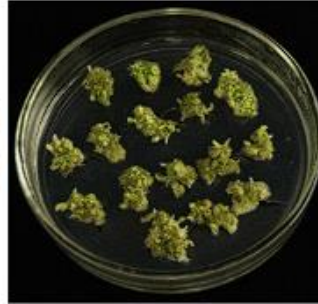
Samsun

КОНТРОЛЬ

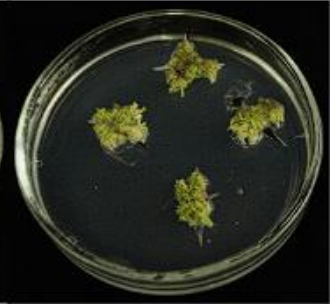


MSR

C9.1



MSR (Phi)



MSR (Phi)

C3.2

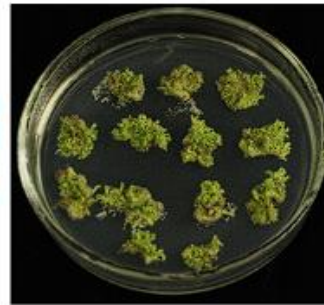


MSR (Phi)

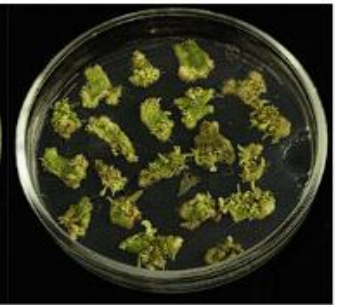


MSR + PPT

GV4.1



MSR (Phi)



MSR (Phi)

GV8.2



MSR (Phi)



MSR + PPT

Середовища:

MSR - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації
MSR(Phi) - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації з додаванням 50% фосфітів та 50% фосфатів
MSR + PPT - середовище Мурасіге-Скуга для регенерації з додаванням гербіциду фосфінотрицину

Рисунок 3.6 – Частота регенерації *Nicotiana tabacum* сорту Samsun

Таблиця 3.3 – Узагальнена таблиця *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин тютюну

Сорти <i>N. tabacum</i>	Варіанти штаму <i>A. tumefaciens</i>	Частота регенерації			
		нетрансформованих листяних дисків на середовищі MS	нетрансформованих листяних дисків на селективному середовищі MSR(Phi)	трансформованих листяних дисків на селективному середовищі MSR(Phi)	трансформованих листяних дисків на середовищі MSR з фосфіотрицином
Petit Havana	C9.1	100%	73%	89.7%	Не проводився
	C3.2			96%	0%
	GV4.1			100%	Не проводився
	GV8.2			Втрачений	
Samsun	C9.1	100%	80%	100%	Не проводився
	C3.2			93.75%	84.2%
	GV4.1			92%	Не проводився
	GV8.2			100%	0%
Wisconsin	C9.1	100%	100%	100%	Не проводився
	C3.2			100%	66.7%
	GV4.1			100%	Не проводився
	GV8.2			100%	0%

Отже, внаслідок *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну регенерація була успішною для сортів Petit Havana та Samsun на середовищі MSR(Phi) з 50% фосфатів та 50% фосфітів.

Для сорту Wisconsin необхідно проведення додаткових досліджень для визначення селективного середовища.

Використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації варіантом штаму C3.2 дослідженої покращеної конструкції гену *ptxD* показало успішну регенерацію трансформантів за маркерним геном стійкості до фосфінотрицину *bar*, тоді як варіант GV8.2 не виявив ефективної регенерації трансформантів для дводольних рослин. Ці результати важливі для подальших біотехнологічних досліджень. Інші варіанти штамів (C9.1, GV4.1) не містили в генетичній конструкції маркерного гену *bar*, тому відбір на середовищі з фосфінотрицином не проводили.

3.5 Виділення загальної ДНК рослин

Для аналізу використовували 22 регенеранти *Nicotiana tabacum* сортів Petit Havana та Samsun, що були отримані в результаті трансформації *Agrobacterium tumefaciens*, 9 з яких варіантами штамів C3.2 та GV4.1 із плазмідною, яка мала, крім цільового гену, ген стійкості до фосфінотрицину – *bar*. Інші 15 зразків, трансформовані варіантами колоній GV8.2 та C9.1, не мали цієї стійкості.

Для перевірки чистоти та наявності ДНК у виділених зразках використовували спектрофотометричний аналіз та електрофоретичне розділення. Спершу виділену ДНК з дослідних зразків та контролів аналізували спектрофотометричним методом. Отримані результати спектрофотометрії представлені в таблиці 3.4.

Як позитивний контроль перенесення гену *bar* були використані підтверджені трансформовані лінії рослин D212, D3111, D3211, D3331, F312, J1122 з цією послідовністю.

Таблиця 3.4 – Концентрація та коефіцієнти поглинання загальної ДНК, виділеної з трансформованого та нетрансформованого тютюну

Зразок	Розведення	C, мкг/мл	A 260/280	A 260/230
1	2	3	4	5
D212 (контроль позитивний)	20	164±23	2,55	0,77
D3111 (контроль позитивний)	020	493±15	1,17	0,77
D3211 (контроль позитивний)	20	137±14	1,22	1,20
D3331 (контроль позитивний)	20	397±23	1,63	0,94
F312 (контроль позитивний)	20	82±9	3,59	0,52
J1122 (контроль позитивний)	20	146±13	2,78	0,62
Petit Havana (нетрансформований)	20	255±15	2,07	0,73
Petit Havana C9.1 (1)	20	97±8	2,86	2,70
Petit Havana C9.1 (2)	20	216±9	2,01	1,85
Petit Havana C3.2 (1)	20	172±13	2,18	0,54
Petit Havana C3.2 (2)	20	59±7	-	0,44
Petit Havana GV4.1 (1)	20	174±10	2,55	0,61
Petit Havana GV4.1 (2)	20	216±10	2,29	0,82
Petit Havana GV4.1 (3)	20	124±9	2,67	0,41
Petit Havana GV4.1 (4)	20	277±13	1,87	0,60
Samsun (нетрансформований)	20	307±6	2,12	1,57
Samsun C9.1 (1)	20	107±6	2,52	3,09
Samsun C9.1 (2)	20	75±7	1,75	0,61
Samsun C9.1 (3)	20	141±9	2,75	2,66
Samsun C3.2 (1)	20	32±12	-	-
Samsun C3.2 (PPT, 1)	20	124±7	2,73	0,75

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5
Samsun C3.2 (2)	20	42 \pm 4	-	-
Samsun C3.2 (PPT, 2)	20	228 \pm 8	1,71	0,68
Samsun C3.2 (3)	20	32 \pm 4	-	-
Samsun C3.2 (4)	20	62 \pm 4	6,19	6,19
Samsun GV4.1 (1)	20	73 \pm 4	-	0,62
Samsun GV4.1 (2)	20	56 \pm 4	-	0,62
Samsun GV4.1 (3)	20	43 \pm 4	-	0,38
Samsun GV8.2 (1)	20	150 \pm 7	2,95	2,69
Samsun GV8.2 (2)	20	125 \pm 4	0,97	1,56

Для оцінки чистоти ДНК і РНК використовують співвідношення поглинання за довжин хвиль 260 нм і 280 нм. Співвідношення приблизно 1,8 зазвичай вважається «чистим» для ДНК; якщо воно значно нижче ($\leq 1,6$), це може свідчити про наявність білків, які сильно поглинають за довжини 280 нм або поблизу цієї довжини хвилі. Співвідношення 260/230 також широко використовується як додатковий показник чистоти ДНК щодо фенольних забруднень, і значення для «чистої» ДНК зазвичай знаходяться в діапазоні від 2,0 до 2,2. Якщо співвідношення значно нижче очікуваного, це може вказувати на присутність забруднень, які поглинають за 230 нм, таких як гуанідин HCL, EDTA, вуглеводи, ліпіди, солі або фенол.

Згідно з наведеними результатами, співвідношення поглинання за довжини хвилі 260 нм і 280 нм (A_{260}/A_{280}) для більшості зразків знаходилось в діапазоні від 1,85 до 2,78. Це свідчить про те, що ДНК в цих зразках є чистою, без значних забруднень білками. Значення A_{260}/A_{280} для P.h2.2 та S4.2 значно нижче очікуваного, що може свідчити про значні забруднення білками. Значення A_{260}/A_{230} для P.h2.2 не доступне, тому остаточний висновок про чистоту цього зразка зробити неможливо.

Електрофоретичне розділення загальної ДНК (рис. 3.7) проводили для візуальної оцінки кількості ДНК, виявлення генетичної спорідненості, виявлення вірусів та інших патогенів у рослинах.

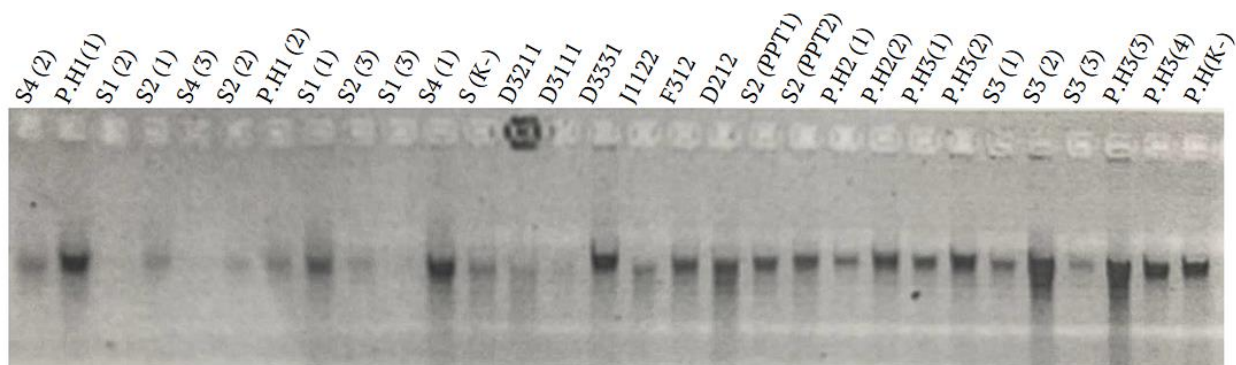


Рисунок 3.7 – Електрофореграма загальної ДНК, виділеної з рослин-регенерантів сортів Petit Havana та Samsun, розділених в 1,2 % агарозному гелі, LB-буфері, із 0,5 мкг/мл бромистого етидію, де S – Samsun, P.H – Petit Havana; 1 – C9.1, 2 – C3.2, 3 – GV4.1, 4 – GV8.2, PPT – середовище з фосфінотрицином, (1,2...) – номер зразка

На електрофореграмі (рис.3.7) можна спостерігати, що інтенсивність смуг ДНК в зразках Petit Havana (P.H) та Samsun (S) подібна. Це свідчить про те, що кількість ДНК в цих зразках приблизно однакова. Профілі ДНК зразків Petit Havana та Samsun дуже схожі, що свідчить про генетичну близькість сортів.

На електрофореграмі немає жодних смуг ДНК, які б свідчили про наявність вірусів або інших патогенів у рослинах-регенерантах.

Таким чином, електрофоретичний аналіз продемонстрував, що кількість ДНК у зразках Petit Havana та Samsun приблизно однакова, профілі ДНК цих сортів дуже схожі, що свідчить про їхню генетичну близькість, у рослинах-регенерантах не виявлено вірусів або інших патогенів.

3.6 Полімеразна ланцюгова реакція зразків і електрофоретичне підтвердження ампліфікованого маркерного гена *bar*

Додатково проводили електрофоретичне розділення ампліфікованих послідовностей на маркерний ген *bar* з барвником «6X DNA Loading», щоб підтвердити наявність цільової послідовності ДНК у зразках, результат зображено на рис.3.8. Полімеразна ланцюгова реакція була виконана згідно з програмою, описаної в методиці.

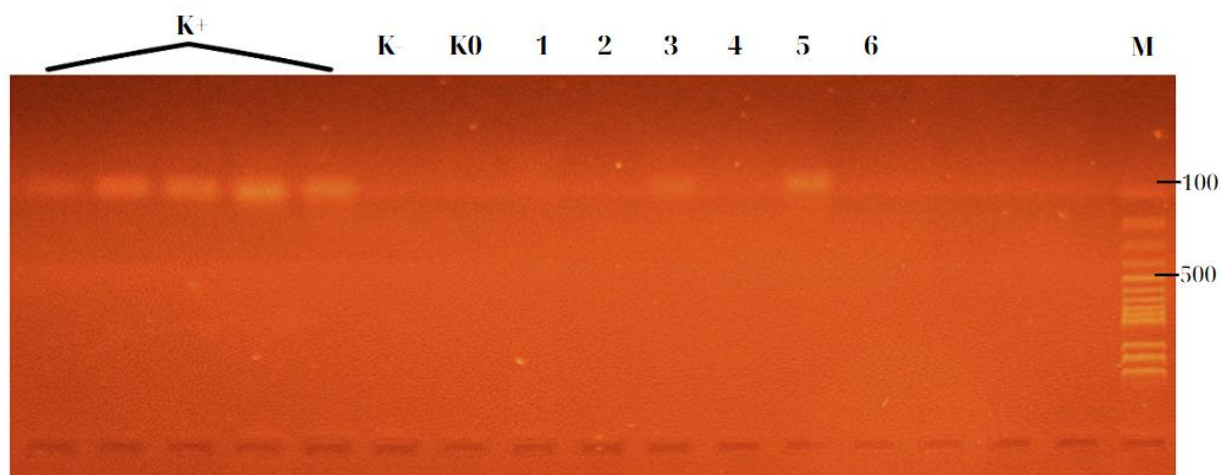


Рисунок 3.8 – Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з використанням праймерами *bar3F* та *bar4R*, розділених в 1,2 % агарозному гелі, LB-буфері, з 0,5 мкг/мл бромистого етидію, розділених протягом 30 хв. K^+ – позитивний контроль з рослин, який містили ген *bar*; K^- – негативний контроль (ДНК з нетрансформованої рослини); $K0$ – негативний контроль виділення (mQ замість ДНК); 1-6 – загальна ДНК виділена з відповідних трансформованих рослин; 3,5 – рослини, які успішно отримали ген *bar*; М – маркер «DNA Ladder»

В зразках 3 (Samsun C3.2 (PPT1)) та 5 (Samsun C3.2 (PPT2)) постерігаються чітко видимі смуги ДНК очікуваного розміру (приблизно 140 п.н.), що свідчить про успішну ампліфікацію гену *bar* в цих рослинах. В зразках 1 (Petit Havana C3.2(1)), 2 (Petit Havana C3.2(2)), 4 (Samsun GV8.2 (1)) та 6 (Samsun GV8.2 (2)) смуги ДНК очікуваного розміру не спостерігаються,

що може свідчити про те, що ген *bar* не був успішно ампліфікований в цих рослинах.

В негативних контролях (К-, К0) смуги ДНК очікуваного розміру не спостерігаються, що підтверджує специфічність ампліфікації.

Отже, результати ПЛР аналізу свідчать про успішну трансформацію та ампліфікацію гену *bar* в окремих зразках рослин, що є важливим етапом у підтвердженні генетичної модифікації.

Висновок до розділу: в даному дослідженні було успішно проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію рослин тютюну сортів Petit Havana та Samsun ген *ptxD*. Було розроблено та оптимізовано селективне середовище MSR(Phi) з 50% фосфатів та 50% фосфітів для регенерації трансформованих рослин. Використання варіанту штаму С3.2 показало успішну регенерацію трансформантів за маркерним геном стійкості до фосфінотрицину *bar*. Електрофоретичний та ПЛР аналізи підтвердили вбудовування маркерного гену *bar* в геном трансформованих рослин.

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

Дослідження, виконані в дипломній роботі, проводили із дотриманням усіх вимог, визначених документами з охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва. Роботу проводили в науково-дослідній лабораторії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, де використовували горючі, вибухонебезпечні та токсичні препарати, а також застосовували теплові та електричні прилади. Для запобігання ризикам для життя і здоров'я під час роботи в лабораторії було передбачено відповідні заходи безпеки та правила поведінки, викладені в Інструкції № 2 з охорони праці для працівників лабораторії [79].

4.1 Загальні положення

- Робота у лабораторії вимагає дотримання суворих правил охорони праці та безпеки для забезпечення захисту здоров'я працівників і збереження довкілля. Відповідно до стандартів, до виконання робіт допускаються лише ті особи, які пройшли вступний і первинний інструктаж з охорони праці, спеціальне навчання та перевірку знань, а також стажування на робочому місці.

- Під час роботи в лабораторії працівники зобов'язані регулярно проходити періодичні медичні огляди та повторні інструктажі з охорони праці. У разі потреби проводяться також позапланові та цільові інструктажі. Це забезпечує підтримання високого рівня обізнаності працівників щодо безпечних методів роботи та правил поведінки в умовах підвищеної небезпеки.

- Лабораторні працівники можуть піддаватися впливу таких небезпечних і шкідливих виробничих факторів, як підвищена загазованість повітря робочої зони, підвищена напруженість магнітного поля, високі рівні шуму, недостатнє освітлення робочої зони, а також наявність хімічних речовин і емоційних перевантажень. Щоб мінімізувати ці ризики, працівники

повинні використовувати засоби індивідуального захисту (ЗІЗ) та дотримуватися правил безпеки.

- Працівник лабораторії зобов'язаний використовувати лабораторне обладнання лише за його призначенням, знати правила користування та перевірки справності ЗІЗ, а також вміти користуватися первинними засобами пожежогасіння. Особлива увага приділяється перевірці цілісності заземлення корпусів електроприладів і утриманню робочого місця в чистоті та порядку.

- Забороняється зберігати в лабораторних приміщеннях легкозаймисті рідини цілодобово, а також працювати з судинами, що працюють під тиском, без відповідного спеціального навчання та посвідчення. Працівники, які обслуговують електрообладнання, повинні мати належну кваліфікацію з електробезпеки. Кухонні дії, як-от розігрівання їжі в лабораторному посуді, категорично заборонені.

- Працівники, допущені до роботи з ртуттю, повинні пройти спеціальне навчання та інструктаж з охорони праці. У разі виявлення несправностей обладнання або порушень інструкцій, працівник має негайно повідомити про це завідувача лабораторії. Залишати нагрівальні прилади без нагляду заборонено.

- Кожен працівник повинен вміти надавати першу допомогу постраждалим. У разі травмування або захворювання працівник зобов'язаний припинити роботу, повідомити безпосереднього керівника та звернутися за медичною допомогою. Про всі ситуації, що загрожують життю та здоров'ю, або про нещасні випадки, працівники повинні негайно повідомляти керівництво.

- Працівники повинні слідкувати за справністю спецодягу, своєчасно здавати його в хімчистку та підтримувати чистоту робочого місця. Невиконання вимог цієї інструкції може призвести до відповідальності.

4.2 Безпека перед, під час та після роботи в лабораторії

- Перед тим як розпочати роботу в лабораторії, необхідно дотримуватися строгих вимог безпеки. Перш за все, працівники повинні перевірити та підготувати спецодяг і засоби захисту, необхідні для безпечної роботи. Крім того, необхідно перевірити роботу вентиляції витяжних шаф, щоб забезпечити належну вентиляцію приміщення.

- Перед пуском в роботу будь-якого лабораторного приладу обов'язково ретельно перевірити його технічний стан. Лише після усунення всіх виявлених дефектів можна включати прилади. Усі електронагрівальні прилади мають бути установлені на листовому азбесті товщиною 8-10 мм для максимальної безпеки.

- Працівники повинні уникати введення голови всередину витяжної шафи під час роботи з реактивами. Також не рекомендується працювати в лабораторії наодинці, оскільки це може бути небезпечно в разі виникнення аварії. Додатково, необхідно утримувати проходи, виходи та підходи до протипожежного інвентарю вільними від перешкод.

- Перед тим як збовтувати розчини, їх необхідно закрити притертими пробками. Це допомагає запобігти випадковому розливанню розчинів та зменшує ризик потрапляння небезпечних речовин в оточуюче середовище.

- Не нахилятися над посудиною, в якій відбувається нагрівання рідких їдких та отруйних хімічних речовин. Це важлива вимога безпеки, оскільки нагрівання деяких речовин може призвести до викиду небезпечних парів або речовин. Уникайте нахилення над посудиною, щоб уникнути можливого отруєння чи травмування.

- Якщо потрібно визначити хімічну речовину по запаху, рекомендується тримати ємність з речовиною на деякій відстані від себе. Це допомагає уникнути вдихання небезпечних парів або газів.

- Переливання їдких рідин слід проводити за допомогою скляного сифонного пристрою або насоса з антикорозійних матеріалів у витяжній шафі. Це зменшує ризик потрапляння рідини на шкіру або одяг працівника.

- Під час перевезення бутлів з кислотами, лугами та іншими їдкими і отруйними речовинами необхідно звертати особливу увагу на збереження тари і наявність упаковки, таких як стружки або азбестові прокладки. Це допомагає запобігти пролиттю речовин під час перевезення та забезпечує додатковий шар захисту для працівників.

- Під час наповнення ємності з розчинами слід дотримуватися певних обмежень. Ємність слід наповнювати не більше, ніж на 3/4 її об'єму, щоб запобігти переливанню розчину під час нагрівання або переміщення.

- Отруйні речовини слід зберігати у вентильованих, закритих і опечатаних шафах відповідно до спеціальних інструкцій. Ключ від таких шаф повинен зберігатися у завідувача лабораторією, щоб уникнути неправомірного доступу до небезпечних речовин. Отруйні речовини слід нагрівати в круглодонних колбах на азбестовому сітці. Це допомагає зменшити ризик випадкового викиду речовин та мінімізує контакт з ними. Отруйні речовини слід подрібнювати в закритих ступках у витяжній шафі. Це допомагає уникнути потрапляння парів або пилу отруйних речовин у повітря та запобігти можливому отруєнню працівників.

- Пролиті хімічні розчини слід негайно нейтралізувати і прибрати за допомогою тирси або сухого піску. Після цього ділянки підлоги або столу слід обробити хлорним вапном і ретельно промити водою. Нейтралізація слід проводити з використанням засобів індивідуального захисту, таких як протигази, респіратори, хлорвінілові або гумові рукавички. Після нейтралізації пролитих розчинів необхідно прибрати та обробити поверхні для уникнення подальшого контакту з небезпечними речовинами.

- У лабораторній практиці широко використовуються ламінарні бокси для забезпечення стерильних умов під час проведення експериментів та досліджень. Одним з важливих елементів обладнання таких боксів є УФ-лампи, які використовуються для стерилізації робочої поверхні перед початком роботи. Варто відзначити, що УФ-випромінювання, яке вони виділяють, має свої небезпечні аспекти, оскільки висока сорбційність цього

типу випромінювання може негативно впливати на біохімічні процеси в організмі. З метою забезпечення безпеки працівників під час використання УФ-ламп у ламінарних боксах рекомендується застосовувати спеціальні окуляри зі світлофільтрами як засіб індивідуального захисту.

- Щодо джерел ІЧ-випромінювання, вони зазвичай зустрічаються у вигляді термостатів із сушильною шафою. Важливою характеристикою таких пристроїв є їхні властивості щодо випромінювання ІЧ-випромінювання, яке може впливати на тепловий баланс навколишнього середовища та предметів, що перебувають у зоні випромінювання. Один з найбільш ефективних заходів захисту від ІЧ-випромінювання - це використання теплоізоляційних матеріалів для приладів. Такі матеріали можуть бути тепловідвідними, тепловбираючими, тепловідбивними або комбінованими, і вони застосовуються для зменшення теплового навантаження на пристрої та уникнення можливих порушень теплового балансу в робочих приміщеннях.

- Після завершення робіт у лабораторії, найважливішим аспектом є забезпечення безпеки та підготовка приміщення до закриття. Дотримання вимог цього етапу має вирішальне значення для запобігання можливих аварій та забезпечення безпеки працівників та оточуючого середовища. Однією з перших дій після завершення робіт є вимкнення всіх електричних приладів та іншого обладнання, а також закриття водопровідних кранів. Це дозволяє уникнути виникнення небезпеки пожежі або аварійних ситуацій, пов'язаних з витокami води чи електропостачанням. Наступним кроком є видалення відходів, які можуть бути потенційно небезпечними, таких як горючі речовини, відпрацьовані рідини, сміття та промаслені ганчірки. Це важливо для підтримання чистоти та порядку у лабораторії, а також для уникнення загрози забруднення навколишнього середовища. Завершальним етапом є перекриття загального газового та водопровідного кранів, а також відключення електроживлення. Це не лише забезпечує економію ресурсів, а й уникає можливих аварій або небезпеки витоку газу чи води після закінчення робіт.

4.3 Запобігання та реагування на аварійні ситуації у лабораторії

Під час проведення робіт у лабораторії можуть виникнути непередбачені обставини, які створюють небезпеку для працівників та навколишнього середовища. Основними аварійними ситуаціями, з якими можуть зіткнутися працівники, є пожежа, вибух, ураження електричним струмом, а також потрапляння кислоти або лугу на шкіру або в очі, а також виділення або утворення їдких, отруйних, вогне-або вибухонебезпечних речовин.

У разі виникнення аварійної ситуації працівник лабораторії повинен негайно припинити роботу та відключити електроприлади. Якщо це необхідно, необхідно провести огорожу небезпечного місця та повідомити про подію завідувачеві лабораторії чи його заступнику. Також, інші працівники лабораторії, які перебувають у непосредній близькості, повинні відреагувати на сигнал тривоги та допомогти у наданні першої медичної допомоги або усуненні аварійної ситуації.

4.3.1 Пожежна безпека

В разі виникнення пожежі або займання горючих речовин працівники лабораторії мають негайно повідомити про це керівництво лабораторії та виконати необхідні заходи для тушіння вогню. Для цього вони повинні використовувати відповідні вогнегасники та інші засоби пожежогасіння, дотримуючись встановлених процедур та правил безпеки.

Крім того, у разі загоряння фосфору, металевого натрію або калію, необхідно вжити відповідні заходи безпеки, використовуючи лише рекомендовані матеріали для гасіння пожежі. Кожен працівник лабораторії повинен бути обізнаний з процедурами та методами тушіння різних видів пожеж та знати, як правильно застосовувати вогнегасники та інші засоби пожежогасіння.

З метою запобігання пожежам і мінімізації ризику травм, встановлені витяжні шафи та вогнегасники різних типів, які слід використовувати залежно від характеру пожежі. Один з типів - вуглекислотні вогнегасники. Вони ефективно використовуються для гасіння пожеж класу В (горючі рідини та

гази) та класу С (електроустаткування під напругою). Ще одним типом вогнегасників є порошкові вогнегасники, які мають широкий спектр застосування. Вони ефективні для гасіння пожеж класу А (тверді речовини), В та С. Навчання з пожежної безпеки та першої медичної допомоги проводиться регулярно для всього персоналу, щоб забезпечити готовність до дій у надзвичайних ситуаціях. Важливо також правильно використовувати засоби індивідуального захисту, такі як респіратори та рукавички, для уникнення травматичних ситуацій.

Висновок до розділу: розділ про охорону праці наголошує на важливості безпеки та здоров'я працівників у лабораторійних умовах. Він охоплює такі аспекти, як управління ризиками, профілактика аварій, захист від шкідливих випромінювань – та правила поведінки у випадку надзвичайних ситуацій. Висновок підкреслює необхідність дотримання стандартів безпеки та впровадження заходів захисту для забезпечення безпечних умов праці в лабораторії.

ВИСНОВКИ

1. За даними наукових літературних джерел встановлено, що методами генетичної інженерії можливо отримати трансформовані рослини, що містять ген *ptxD*, який кодує фермент фосфітоксидоредуктазу, що каталізує перетворення недоступних для рослин фосфітів на доступні фосфати;

2. Для процесу трансформації були підготовлені біологічні агенти: рослини *Nicotiana tabacum*: сортів Petit Havana, Wisconsin та Samsun; та бактерії *Agrobacterium tumefaciens*: штами GV3101 та C58, T-ДНК плазмід клітин яких містили генетичні конструкції – цільовий покращений ген *ptxD*, або ген *ptxD* в поєднанні із маркерним геном стійкості до фосфінотрицину *bar*.

3. Оптимізовано склад селективного середовища для регенерації листових дисків трансформованих рослин: середовище MSR (Phi) має містити 50% фосфітів і 50% фосфатів, а додавання 1,9 г MES на 1 л середовища стабілізує рН на оптимальному для регенерації рослин тютюну рівні – 5,6-5,7.

4. Проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію рослин *Nicotiana tabacum* з використанням гена *ptxD* з *Pseudomonas stutzeri*. Процедура включала ко-культивування рослин *Nicotiana tabacum* з бактеріями *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію рослин на оптимізованому селективному середовищі MSR (Phi).

5. В результаті проведення полімеразної ланцюгової реакції на маркерний ген *bar* підтверджено, що 3 з 6 вибраних, регенерованих на середовищі з фосфінотрицином рослин, містять ген у своєму геномі.

6. Забезпечення безпеки під час роботи в лабораторії включало дотримання стандартних процедур безпеки: використання захисного одягу, рукавичок, масок та захисних окулярів. Використання хімічних речовин та біологічних агентів проводилося з урахуванням відповідних інструкцій та регламентів для мінімізації ризиків для здоров'я персоналу та навколишнього середовища.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
2. Bertani G. STUDIES ON LYSOGENESIS I // *Journal of Bacteriology*. 1951. Vol. 62, № 3. P. 293–300. DOI:10.1128/jb.62.3.293-300.1951
3. Dalcorso G., Manara A., Piasentin S., Furini A. Nutrient metal elements in plants. Oxford University Press. 2014. DOI:10.1039/c4mt00173g
4. Schachtman D., Reid R., Ayling S. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell // *Plant physiology*. 1998. Vol. 116, № 2. P. 447–453. DOI: 10.1104/pp.116.2.447
5. Raghothama K.G. Phosphorus and Plant Nutrition: An Overview URL: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/agronmonogr46.c11>
6. Xu X. et al. Phosphorylation-Mediated Signalling in Plants // *Annual Plant Reviews online*. 2019. P. 909–932. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0702
7. Wahab A. et al. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Regulating Growth, Enhancing Productivity, and Potentially Influencing Ecosystems under Abiotic and Biotic Stresses // *Plants (Basel, Switzerland)*. 2023. Vol. 12, № 17. P. 3102. DOI: 10.3390/plants12173102
8. Das D. et al. Phosphate starvation response transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis // *Nature Communications*. 2022. Vol. 13, № 1. DOI: 10.1038/s41467-022-27976-8
9. Nakamura Y. Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein–Lipid Interactions // *Trends in Plant Science*. 2017. Vol. 22, № 12. P. 1027–1040. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.09.002
10. Essigmann B. et al. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, № 4. P. 1950–1955. DOI: 10.1073/pnas.95.4.1950

11. Hafsi C. et al. Implication of phospholipase D in response of *Hordeum vulgare* root to short-term potassium deprivation // *Journal of Plant Physiology*. 2009. Vol. 166, № 5. P. 499–506. DOI:10.1016/j.jplph.2008.07.007
12. Ajmera I., Hodgman T.C., Lu C. An Integrative Systems Perspective on Plant Phosphate Research // *Genes*. 2019. Vol. 10, № 2. P. 139. DOI:10.3390/genes10020139
13. Pierzynski G.M., McDowell R.W., Thomas Sims J. Chemistry, Cycling, and Potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils // *Agronomy Monographs*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2015. P. 51–86. DOI:10.2134/agronmonogr46.c3
14. Jupp A.R. et al. Phosphorus recovery and recycling – closing the loop // *Chemical Society Reviews*. 2021. Vol. 50, № 1. P. 87–101. DOI:10.1039/D0CS01150A
15. Sample E.C., Soper R.J., Racz G.J. Reactions of Phosphate Fertilizers in Soils // *The Role of Phosphorus in Agriculture*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2015. P. 263–310. DOI: 10.2134/1980.roleofphosphorus.c12
16. Liu J. et al. Investigation of Soil Legacy Phosphorus Transformation in Long-Term Agricultural Fields Using Sequential Fractionation, P K-edge XANES and Solution P NMR Spectroscopy // *Environmental Science & Technology*. 2014. Vol. 49, № 1. P. 168–176. DOI: 10.1021/es504420n
17. Stewart J.W.B., Tiessen H. Dynamics of Soil Organic Phosphorus // *Biogeochemistry*. 1987. Vol. 4, № 1. P. 41–60.
18. Волошин М. Д. Технологія неорганічних речовин. Частина 3. Мінеральні добрива : навчальний посібник / М. Д. Волошин, Я. М. Черненко, А. В. Іванченко, М. А. Олійник. — Дніпродзержинськ : ДДТУ, 2016. С. 10-30.
19. Qaswar M. et al. Soil carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P) stoichiometry drives phosphorus lability in paddy soil under long-term fertilization: A fractionation and path analysis study // *PLOS ONE*. 2019. Vol. 14, № 6. P.

e0218195. DOI: 10.1371/journal.pone.0218195

20. Cordell D., Drangert J.-O., White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought // *Global Environmental Change*. 2009. Vol. 19, № 2. P. 292–305. DOI:10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009

21. McLaughlin M.J. et al. The chemical nature of P accumulation in agricultural soils—implications for fertiliser management and design: an Australian perspective // *Plant and Soil*. 2011. Vol. 349, № 1–2. P. 69–87. DOI:10.1007/s11104-011-0907-7

22. Johnston A.E. et al. Phosphorus // *Advances in Agronomy*. Elsevier, 2014. P. 177–228. DOI:10.1016/B978-0-12-420225-2.00005-4

23. Racz G.J., Soper R.J. Reaction products of orthophosphates in soils containing varying amounts of Calcium and Magnesium // *Canadian Journal of Soil Science*. 1967. Vol. 47, № 3. P. 223–230. DOI:10.4141/cjss67-035

24. Sheppard S.C., Racz G.J. Effects of soil temperature on phosphorus extractability. ii. soil Phosphorus in six carbonated and six non-carbonated soils // *Canadian Journal of Soil Science*. 1984. Vol. 64, № 2. P. 255–263. DOI:10.4141/cjss84-026

25. Mueller D.K., Helsel D.R. Nutrients in the Nation's Waters--Too Much of a Good Thing? // *Circular*. 1996. C.24. DOI:10.3133/cir1136

26. Correll D.L. The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review // *Journal of Environmental Quality*. 1998. Vol. 27, № 2. P. 261–266. DOI:10.2134/jeq1998.00472425002700020004x

27. Tirado R., Allsopp M. Phosphorus in agriculture. Problems and solutions [Электронный ресурс] // Greenpeace. 2012. URL: <https://www.greenpeace.to/greenpeace/wp-content/uploads/2012/06/tirado-and-allsopp-2012-phosphorus-in-agriculture-technical-report-02-2012.pdf> (дата звернення: 28.05.2024).

28. Badamasi H. et al. CODEN(USA): CRJHA5 Impacts of Phosphates on Water Quality and Aquatic Life, 2019. URL: https://www.researchgate.net/publication/339209495_CODENUSA_CRJHA5_Im

pacts_of_Phosphates_on_Water_Quality_and_Aquatic_Life.

29. Sabbagh Y. et al. Intestinal Npt2b Plays a Major Role in Phosphate Absorption and Homeostasis // Journal of the American Society of Nephrology. 2009. Vol. 20, № 11. P. 2348–2358. DOI:10.1681/ASN.2009050559

30. Ferrari S.L., Bonjour J.-P., Rizzoli R. Fibroblast Growth Factor-23 Relationship to Dietary Phosphate and Renal Phosphate Handling in Healthy Young Men // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005. Vol. 90, № 3. P. 1519–1524. DOI:10.1210/jc.2004-1039

31. Almaden Y. et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro // Journal of Bone and Mineral Research. 1996. Vol. 11, № 7. P. 970–976. DOI:10.1002/jbmr.5650110714

32. Deng L., Dhar B.R. Phosphorus recovery from wastewater via calcium phosphate precipitation: A critical review of methods, progress, and insights // Chemosphere. 2023. Vol. 330. P. 138685. DOI:10.1016/j.chemosphere.2023.138685

33. Du J. et al. Organic carbon distribution and soil aggregate stability in response to long-term phosphorus addition in different land-use types // Soil and Tillage Research. 2022. Vol. 215. P. 105195. DOI:10.1016/j.still.2021.105195

34. Peng L. et al. A comprehensive review of phosphorus recovery from wastewater by crystallization processes // Chemosphere. 2018. Vol. 197. P. 768–781. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.01.098

35. Qiu G. et al. Phosphorus recovery from fosfomycin pharmaceutical wastewater by wet air oxidation and phosphate crystallization // Chemosphere. 2011. Vol. 84, № 2. P. 241–246. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.04.011

36. Lei Y. et al. Electrochemically mediated calcium phosphate precipitation from phosphonates: Implications on phosphorus recovery from non-orthophosphate // Water Research. 2020. Vol. 169. P. 115206. DOI:10.1016/j.watres.2019.115206

37. Wang R. et al. Effects of heavy metals and metal (oxide) nanoparticles on enhanced biological phosphorus removal // Reviews in Chemical Engineering. 2019. Vol. 36, № 8. P. 947–970. DOI:10.1515/revce-2018-0076

38. de-Bashan L.E., Bashan Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003) // *Water Research*. 2004. Vol. 38, № 19. P. 4222–4246. DOI:10.1016/j.watres.2004.07.014
39. Wilsenach J.A., Schuurbiens C.A.H., van Loosdrecht M.C.M. Phosphate and potassium recovery from source separated urine through struvite precipitation // *Water Research*. 2007. Vol. 41, № 2. P. 458–466. DOI:10.1016/j.watres.2006.10.014
40. Wu Y. et al. Potentials and challenges of phosphorus recovery as vivianite from wastewater: A review // *Chemosphere*. 2019. Vol. 226. P. 246–258. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.03.138
41. Hermann L. Phosphorus and Energy Recovery from Manure and Digestion Residues // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 2013. Vol. 188, № 1–3. P. 176–178. DOI:10.1080%2F10426507.2012.741165
42. Crowell R. This global map of manure could help save farming as we know it // *Science*. 2019. DOI:10.1126/science.aax9536
43. Szogi A.A., Vanotti M.B. Prospects for phosphorus recovery from poultry litter // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100, № 22. P. 5461–5465. DOI:10.1016/j.biortech.2009.03.071
44. Staroń P. et al. Residues from the thermal conversion of waste from the meat industry as a source of valuable macro- and micronutrients // *Waste Management*. 2016. Vol. 49. P. 337–345. DOI:10.1016/j.wasman.2016.01.018
45. Witek-Krowiak A. et al. Phosphorus recovery from wastewater and bio-based waste: an overview // *Bioengineered*. 2022. Vol. 13, № 5. P. 13474–13506. DOI:10.1080/21655979.2022.2077894
46. Szogi A.A., Vanotti M.B., Ro K.S. Methods for Treatment of Animal Manures to Reduce Nutrient Pollution Prior to Soil Application // *Current Pollution Reports*. 2015. Vol. 1, № 1. P. 47–56. DOI:10.1007%2Fs40726-015-0005-1
47. Shashvatt U. et al. CO₂-assisted phosphorus extraction from poultry litter and selective recovery of struvite and potassium struvite // *Water Research*. 2018. Vol. 143. P. 19–27. DOI:10.1016/j.watres.2018.06.035

48. López-Fernández R., Aristizábal C., Irusta R. Ultrafiltration as an advanced tertiary treatment of anaerobically digested swine manure liquid fraction: A practical and theoretical study // *Journal of Membrane Science*. 2011. Vol. 375, № 1–2. P. 268–275. DOI:10.1016/j.memsci.2011.03.051
49. Campos P. et al. Phosphorus Acquisition Efficiency Related to Root Traits: Is Mycorrhizal Symbiosis a Key Factor to Wheat and Barley Cropping? // *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. DOI:10.3389/fpls.2018.00752
50. Han Y., White P.J., Cheng L. Mechanisms for improving phosphorus utilization efficiency in plants // *Annals of Botany*. 2021. Vol. 129, № 3. P. 247–258. DOI:10.1093/aob/mcab145
51. Nadeem M. et al. Understanding the Adaptive Mechanisms of Plants to Enhance Phosphorus Use Efficiency on Podzolic Soils in Boreal Agroecosystems // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. DOI:10.3389/fpls.2022.804058
52. Varadarajan D.K. et al. Phosphite, an Analog of Phosphate, Suppresses the Coordinated Expression of Genes under Phosphate Starvation // *Plant Physiology*. 2002. Vol. 129, № 3. P. 1232–1240. DOI:10.1104/pp.010835
53. Cook P.J., Landschoot P.J., Schlossberg M.J. Inhibition of *Pythium* spp. and Suppression of *Pythium* Blight of Turfgrasses with Phosphonate Fungicides // *Plant Disease*. 2009. Vol. 93, № 8. P. 809–814. DOI:10.1094/PDIS-93-8-0809
54. Inguagiato J.C., Kaminski J.E., Lulis T.T. Effect of Phosphite Rate and Source on Cyanobacteria Colonization of Putting Green Turf // *Crop Science*. 2017. Vol. 57, № S1. DOI:10.2135/cropsci2016.06.0469
55. Aamlid T.S. et al. Evaluation of a Petroleum-Derived Spray Oil for Control of *Microdochium* Patch and Turfgrass Spring Performance on Nordic Golf Greens // *Agronomy Journal*. 2018. Vol. 110, № 6. P. 2189–2197. DOI:10.2134/agronj2018.07.0475
56. Dempsey J.J. et al. Phosphite-mediated enhancement of defence responses in *Agrostis stolonifera* and *Poa annua* infected by *Microdochium nivale* // *Plant Pathology*. 2022. Vol. 71, № 7. P. 1486–1495. DOI:10.1111/ppa.13584
57. Achary V.M.M. et al. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management

and pathogen control // *Plant Biotechnology Journal*. 2017. Vol. 15, № 12. P. 1493–1508. DOI:10.1111/pbi.12803

58. McDonald A.E., Grant B.R., Plaxton W.C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response // *Journal of Plant Nutrition*. 2001. Vol. 24, № 10. P. 1505–1519. DOI:10.1081/PLN-100106017

59. Chang B., Guertal E. Phosphite, phosphate, and their interactions in soil and turfgrass // *Grass Research*. 2023. Vol. 3, № 1. P. 0–0. DOI:10.48130/GR-2023-0013

60. Yang H. et al. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase // *Plant Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 5, № 6. P. 735–745. DOI:10.1111/j.1467-7652.2007.00281.x

61. Relyea H.A., van der Donk W.A. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase // *Bioorganic Chemistry*. 2005. Vol. 33, № 3. P. 171–189. DOI:10.1016/j.bioorg.2005.01.003

62. White A.K., Metcalf W.W. The *htx* and *ptx* Operons of *Pseudomonas stutzeri* WM88 Are New Members of the *Pho* Regulon // *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186, № 17. P. 5876–5882. DOI:10.1128/JB.186.17.5876-5882.2004

63. López-Arredondo D.L. et al. Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops // *Annual Review of Plant Biology*. 2014. Vol. 65, № 1. P. 95–123. DOI:10.1146/annurev-arplant-050213-035949

64. López-Arredondo DL, Herrera-Estrella L. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nat Biotechnol*. 2012 Sep;30(9): 889-93. DOI: 10.1038/nbt.2346.

65. Dubrovna O.V., Morgun B.V. Current status of research on *Agrobacterium*-mediated wheat transformation // *Fiziologija rastenij i genetika*. 2018. Vol. 50, № 3. P. 187–217. DOI:10.15407/frg2018.03.187

66. Liu J. et al. The chemical nature of soil phosphorus in response to long-term fertilization practices: Implications for sustainable phosphorus management //

Journal of Cleaner Production. 2020. Vol. 272. P. 123093.
DOI:10.1016/j.jclepro.2020.123093

67. Arya A., Kumar A. Agrobacterium Pathology and Ti Plasmid based Vector Design, 2018. DOI:10.13140/RG.2.2.18345.49769/1

68. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — Москва: Мир, 2002. — С. 374-380

69. Kovarik A. et al. A plant culture (BY-2) widely used in molecular and cell studies is genetically unstable and highly heterogeneous // Botanical Journal of the Linnean Society. 2012. Vol. 170, № 3. P. 459–471. DOI:10.1111/j.1095-8339.2012.01280.x

70. The Tobacco Plant Genome. Cham: Springer International Publishing, 2020. DOI:10.1007/978-3-030-29493-9

71. Sussex I.M. The Scientific Roots of Modern Plant Biotechnology // The Plant Cell. 2008. Vol. 20, № 5. P. 1189–1198. DOI:10.1105/tpc.108.058735

72. Dhaese P. et al. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of Agrobacterium tumefaciens // Nucleic Acids Research. 1979. Vol. 7, № 7. P. 1837–1849. DOI:10.1093/nar/7.7.1837

73. Гнатюк І.С., Маринченко Л.В., Банникова М.О. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Дедиференціація та вторинна диференціація в культурі *in vitro*. Лабораторний практикум [Електронний ресурс]. URL: <https://ela.kpi.ua/items/a7f2b433-c2fe-4127-a124-26c471bec367> (дата звернення: 01.06.2024).

74. Магомедалиева В.К. Особенности морфогенеза и регенерации Катрана бугорчатого *in vitro* fundamental research. / В.К. Магомедалиева // Biol. Sci. – 2013.– Т. 10. – С. 114-118

75. George E.F., Hall M.A., Klerk G.-J.D. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems // Plant Propagation by Tissue Culture. Dordrecht: Springer Netherlands. P. 115–173. DOI:10.1007/978-1-4020-5005-3_4

76. Pasqua G. et al. Effects of the culture medium pH and ion uptake in in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco // Plant Science. 2002. Vol. 162, № 6. P. 947–955. DOI:10.1016/S0168-9452(02)00048-1

77. Ahmad H. An efficient DNA extraction protocol for medicinal plants [Електронний ресурс] // Habib Ahmad - Academia.edu. 2013. URL: https://www.academia.edu/34044437/An_efficient_DNA_extraction_protocol_for_medicinal_plants.

78. Erickson J.L. et al. Agrobacterium-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14, № 1. DOI:10.1186/1471-2229-14-127

79. Parfitt D.E., Almehdi A.A., Bloksberg L.N. Use of organic buffers in plant tissue-culture systems // Scientia Horticulturae. 1988. Vol. 36, № 3–4. P. 157–163. DOI:10.1016/0304-4238(88)90049-0

80. Ovsyannikova L. Інструкція з техніки безпеки для працюючих в лабораторії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України // Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. 2022.