

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

**Інститут клітинної біології та генетичної інженерії**

На правах рукопису

**Матвєєва Надія Анатоліївна**

УДК 575.222.7:581.1

**СТВОРЕННЯ РОСЛИН – ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ  
СПОЛУК ШЛЯХОМ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ  
ТРАНСФОРМАЦІЇ**

**03.00.20 – БІОТЕХНОЛОГІЯ**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук**

Науковий консультант  
**Кучук Микола Вікторович,**  
доктор біологічних наук, професор  
чл.-кор. НАН України

Київ – 2015

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1. Генетична інженерія рослин .....	31
1.1.1. Способи перенесення чужорідних генів.....	32
1.1.2. Генетична трансформація за допомогою ґрунтових бактерій роду <i>Agrobacterium</i> .....	36
1.2. Використання генноінженерних підходів для створення рослин з корисними ознаками.....	41
1.2.1. Стратегії застосування генетичної інженерії для покращення якостей сільськогосподарських культур.....	41
1.2.1.1 Створення рослин, стійких до абіотичних та біотичних стресових факторів .....	41
1.2.1.2 Створення рослин, стійких до гербіцидів.....	43
1.2.2. Продукування у трансгенних рослинах рекомбінантних сполук з фармацевтичними властивостями та метаболічна інженерія.....	45
1.2.2.1 Антигени <i>Mycobacterium tuberculosis</i> та їх накопичення у трансгенних рослинах.....	47
1.2.2.2 Синтезування інтерферонів у клітинах трансгенних рослин ...	48
1.2.3 Вміст природних біологічно активних сполук у клітинах рослин після трансформації.....	50
1.2.3.1 Фруктани, їх біологічні функції та накопичення у трансгенних рослинах і коренях.....	50
1.2.3.2 Використання фруктанів.....	53
1.2.3.3 Трансгенні рослини, що синтезують фруктани.....	54
1.2.3.4 Використанні генетичної трансформації для підвищення рівня	



аккумуляування артемізіну у рослинах.....	57
1.3. Їстівні рослини та їх використання у генетичній інженерії ..	59
1.3.1 Рослини <i>Cichorium intybus</i> .....	59
1.3.2 Рослини <i>Lactuca sativa</i> .....	60
1.4. Лікарські рослини як об'єкти біотехнологічних досліджень.....	68
1.4.1 Властивості лікарських рослин родини складноцвітих та можливі напрямки їх біотехнологічного використання .....	68
1.4.1.1 Особливості рослин роду <i>Artemisia</i> .....	68
1.4.1.2 <i>Tragopogon porrifolius</i> L.....	70
1.4.1.3 <i>Bidens pilosa</i> L.....	70
1.4.2 Лікарські рослини родин Lemnaceae, Malvaceae, Rutaceae та їх використання у біотехнологічних дослідженнях .....	71
1.4.2.1 <i>Althaea officinalis</i> L .....	71
1.4.2.2 <i>Lemna minor</i> L.....	72
1.4.2.3 <i>Ruta graveolens</i> L .....	74
1.5. Узагальнення огляду літератури .....	76
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	80
2.1. Вихідний матеріал.....	80
2.2. Вирощування рослин в асептичних умовах.....	81
2.3. Агробактерії, які використовували для трансформації.....	83
2.4. Векторні конструкції, які використовували для трансформації.....	83
2.5. Вирощування агробактерій для генетичної трансформації рослин....	85
2.6. Визначення селективної концентрації антибіотика та відбір стійких трансгенних коренів і рослин.....	86
2.7. Оптимізація методики генетичної трансформації рослин .....	86
2.8. Генетична трансформація з використанням <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> та регенерація трансгенних пагонів цикорію.....	87
2.9. Генетична трансформація рослин салату з використанням <i>Agrobacterium tumefaciens</i> та регенерація трансгенних пагонів .....	90
2.10. Оптимізація умов регенерації рослин рути.....	91

2.11 Генетична трансформація рослин салату, цикорію, алтеї, козельців, причепи, рути та полину з використанням <i>A. rhizogenes</i> .....	93
2.12 Субкультивування трансгенних коренів цикорію, салату, алтеї, козельців, рути, полину, причепи .....	94
2.13 Трансформація рослин ряски з використанням <i>A. rhizogenes</i> .....	94
2.14 Виділення загальної ДНК рослин.....	95
2.15 Аналіз трансформованих рослин та «бородатих» коренів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції .....	96
2.16 Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга к-ДНК.....	97
2.17 Визначення наявності білка Ag85B.....	98
2.18 Визначення особливостей росту трансгенних рослин ряски у присутності сполуки шестивалентного хрому.....	101
2.19 Культивування трансгенних та контрольних рослин ряски за різних температурних умов.....	103
2.20 Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів.....	103
2.21 Визначення швидкості росту трансгенних коренів.....	104
2.22 Дослідження впливу регуляторів росту на ріст «бородатих» коренів.....	105
2.23 Визначення вмісту поліфруктанів .....	105
2.24 Визначення особливостей накопичення поліфруктанів у трансгенних рослинах та коренях різних ліній.....	106
2.25 Визначення оптимальних умов екстрагування поліфруктанів.....	106
2.26 Визначення вмісту інтерферону у трансгенних коренях.....	107
2.27 Визначення вмісту загального білка .....	107
2.28 Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин та коренів.....	108
2.29 Визначення антиоксидантної активності.....	109
2.30 Визначення ДНК-протекторної активності екстрактів з трансгенних зразків.....	111

2.31	Визначення протимікробної активності екстрактів з рослин та «бородатих» коренів.....	112
2.32	Статистична обробка результатів.....	113
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ		
РОЗДІЛ 3 Оптимізація методики генетичної трансформації для створення «їстівних» рослин - продуцентів рекомбінантних білків та інших біологічно активних сполук.....		
3.1	Трансформація рослин цикорію.....	115
3.1.1	Використання <i>Agrobacterium tumefaciens</i> для отримання трансгенних рослин цикорію з геном <i>esxA</i> антигена ESAT6 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....	115
3.1.1.1	Визначення оптимальних умов генетичної трансформації та отримання трансгенних рослин.....	115
3.1.1.2	Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після трансформації.....	118
3.1.2	Трансформація рослин цикорію з використанням агропінового штаму <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ....	122
3.1.3	Регенерація рослин з трансгенних коренів цикорію.....	124
3.1.4	Молекулярно-біологічний аналіз коренів та рослин цикорію, отриманих після трансформації .....	128
3.2	Генетична трансформація рослин салату .....	132
3.2.1	Використання <i>Agrobacterium tumefaciens</i> для трансформування рослин салату.....	132
3.2.2	Молекулярно-біологічний аналіз рослин салату, отриманих після трансформації .....	134
3.2.3	Трансформація салату з використанням <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	136
3.2.4	Молекулярно-біологічний аналіз трансгенних коренів та регенерованих з них рослин.....	139
РОЗДІЛ 4 Розроблення технології генетичної трансформації стосовно лікарських рослин – продуцентів БАС .....		
		142

4.1 Генетична трансформація рослин ряски з використанням <i>A.rhizogenes</i> .....	142
4.1.1 Збір рослинного матеріалу та уведення рослин ряски у терильну культуру.....	143
4.1.2 Генетична трансформація рослин ряски з використанням <i>A.rhizogenes</i> .....	143
4.1.3 Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після трансформації для підтвердження перенесення трансгенів .....	148
4.2 Отримання культури трансгенних коренів козельців.....	150
4.2.1 Уведення рослин <i>Tragopogon porrifolius</i> у стерильну культуру.....	150
4.2.2 Трансформація рослин козельців з використанням <i>A.rhizogenes</i> .....	150
4.2.3 Молекулярно-біологічний аналіз коренів козельців, отриманих після трансформації, та регенерованих з них рослин для підтвердження перенесення трансгенів.....	152
4.3 Генетична трансформація рослин <i>Althaea officinalis</i> .....	155
4.3.1 Уведення рослин алтеї у стерильну культуру .....	155
4.3.2 Трансформація рослин алтеї з використанням <i>A.rhizogenes</i> .....	156
4.3.3 Молекулярно-біологічний аналіз коренів алтеї, отриманих після трансформації.....	158
4.4 Генетична трансформація рослин <i>Artemisia tilesii</i> .....	162
4.4.1 Трансформація рослин полину з використанням <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	162
4.4.2 Визначення наявності та активності перенесених генів у «бородатих» коренях <i>Artemisia tilesii</i> .....	164
4.5 Генетична трансформація рослин <i>Bidens pilosa</i> .....	168
4.5.1 Отримання культури трансгенних коренів причепи волосистої з використанням <i>A. rhizogenes</i> .....	168

4.5.2 Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів <i>B. pilosa</i> .....	168
4.6 Генетична трансформація рослин <i>Ruta graveolens</i> .....	172
4.6.1 Розроблення методики мікроклонального розмноження рослин рути.....	172
4.6.2 Трансформування рути з використанням <i>A. rhizogenes</i> .....	177
4.6.3 Молекулярно-біологічний аналіз отриманих «бородатих» коренів рути.....	179
4.6.4 Регенерація трансгенних рослин з культури «бородатих» коренів рути.....	180
РОЗДІЛ 5 Визначення впливу генетичної трансформації на морфологічні параметри трансгенних ліній.....	185
5.1 Особливості отриманих трансгенних коренів рослин різних видів.....	185
5.1.1 Фенотипові відмінності ліній «бородатих» коренів .....	185
5.1.2 Виживаність трансгенних та контрольних рослин при дії абіотичного стресового фактору.....	194
5.1.3 Порівняння виживаності контрольних та трансгенних рослин ряски при різних температурних умовах.....	202
5.1.4 Вміст фотосинтетичних пігментів.....	206
РОЗДІЛ 6 Синтез природних та рекомбінантних біологічно активних сполук у трансгенних рослинах та „бородатих” коренях .....	211
6.1 Накопичення рекомбінантних сполук .....	212
6.1.1 Накопичення рекомбінантного злитого білка-аналога секреторних білків AG85B та ESAT6 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> у трансгенних рослинах ряски.....	212
6.1.2 Накопичення інтерферону у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях.....	215
6.1.3 Протівірусна активність екстрактів з трансгенних коренів, які мають ген інтерферону- $\alpha 2b$ людини.....	217

6.1.3.1	Визначення впливу умов екстрагування на противірусну активність екстрактів з трансгенних коренів.....	218
6.1.3.2	Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин та коренів у системі клітин MDBK.....	217
6.1.3.3	Порівняння противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів з використанням різних клітинних ліній .....	222
6.2	Накопичення природних БАС у трансгенних рослинах та коренях.....	228
6.2.1	Накопичення поліфруктанів.....	232
6.2.1.1	Оптимізування умов екстрагування фруктозовмісних цукрів	234
6.2.1.2	Вміст поліфруктанів у трансгенних коренях.....	236
6.2.1.3	Підвищення швидкості росту та рівня накопичення ПФ у «бородатих» коренях за використання регуляторів росту.....	241
6.2.2	Вміст артемізиніну.....	243
6.3	Біологічна активність екстрактів з трансгенних коренів лікарських рослин різних видів.....	246
6.3.1	Протимікробна активність.....	246
6.3.2	Антиоксидантна активність екстрактів .....	249
6.3.3	УФ-протекторна активність.....	255
РОЗДІЛ 7	Створення колекції трансформованих рослин та коренів лікарських та їстівних культур.....	261
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....		263
ВИСНОВКИ.....		274
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		277

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП	- 6-бензиламінопурин
БАС	- біологічно активні сполуки
ВВС	- вірус везикулярного стоматиту
ЗТ-ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією
ІОК	- індолілоцтова кислота
ІФН	- інтерферони
Км	- канаміцин
НОК	- $\alpha$ -нафтилоцтова кислота
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
п. н.	- пара нуклеотидів
ПТП	- перещеплювані субстратзалежні клітини тестикул поросят
ПФ	- поліфруктани
Т-ДНК	- ділянка ДНК агробактерій, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації
Цеф	- цефотаксим
<i>bar</i>	- ген фосфіотрицин-N-ацетилтрансферази
2,4-D	- 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
<i>esxA</i>	- ген антигена ESAT6 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>fbpB</i>	- ген антигена Ag85B <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	- ген інтерферону- $\alpha$ 2b людини
MDBK	- культура перещеплюваних клітин нирки бика
MES	- 2[N-морфоліно]етансульфо кислота
<i>nptII</i>	- ген неоміцинфосфотрансферази II
RB, LB	- правий та лівий повтори, які обмежують Т-ДНК
Tris	- трис-(гідроксиметил)-амінометан

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Біологічні дослідження супроводжували людство протягом усього його існування. Первинний контакт людини з природою, необхідність примітивного пошуку їжі та ліків став базисом та рушійною силою, які через віки призвели до бурхливого розвитку біології як науки, що досліджує навколишній світ, використовує та покращує природні ресурси. Науковий та технічний прогрес двадцятого століття став основою для масштабного розвитку біологічної науки. Прогрес у галузі таких дисциплін як молекулярна біологія, генетика, клітинна біологія дозволив перейти від опису та споглядання до керованого впливу на рослинний світ, конструювання нових форм рослин, які мають покращені якості. У значному ступені цьому сприяли дослідження у галузі нової дисципліни, молекулярної біології, зокрема, встановлення у 1953 році будови ДНК [1], «народження» генетичної інженерії як галузі біологічних досліджень, розроблення рекомбінантних ДНК технологій, унікальних для свого часу методів культивування ізольованих протопластів [2] тощо. Ці наукові розробки дозволили перетворювати клітини рослин, мікроорганізмів, тварин для створення нових форм.

Важливим етапом створення трансгенних рослин є не тільки вибір об'єктів досліджень, але й визначення умов їх культивування *in vitro*, розроблення методів мікроклонального розмноження. Особливо суттєвими етапами є оптимізація протоколів генетичної трансформації, вибір оптимального способу перенесення генів інтересу до геному рослин, селекція та відбір трансгенних рослин. Визначають умови мікроклонального розмноження досліджуваних рослин, у тому числі склад живильного середовища, наявність та концентрацію регуляторів росту тощо), спосіб трансформації та його параметри (наприклад, пряма трансформація або трансформація з використанням бактерій роду *Agrobacterium*), обирають спосіб селекції, зокрема, перенесення до рослин так званих селективних генів



(наприклад, генів стійкості до антибіотиків) та умови селекції трансгенних пагонів (концентрації селективних антибіотиків, час селекції). Ці етапи зазвичай є вирішальними щодо кількості отриманих трансгенних рослин, зменшення часу, необхідного для отримання кінцевого результату і, таким чином, підвищення ефективності роботи. Разом з тим, є актуальним визначення можливості розроблення більш уніфікованого протоколу генетичної трансформації, яких можна застосовувати для отримання трансгенних рослин різних видів. Вдосконалення зазначених методик та розроблення таких підходів дозволить скоротити час отримання рослин із заданими властивостями та підвищити ефективність біотехнологічних досліджень.

Перші практичні біотехнологічні дослідження було спрямовано на створення сільськогосподарських рослин, стійких до шкідників. Вирощування біотехнологічних рослин було розпочато у 1996 р. у США. Нині культивують трансгенні рослини кукурудзи, сої, бавовнику, ріпаку на площах, що сягають майже 200 млн га. Чотири основні культури, кукурудза, соя, бавовник та ріпак, займають 99% усіх площ під трансгенними рослинами. Міжнародна служба з оцінки застосування агробіотехнологій (ISAAA) уже доповідає про десять комерціалізованих трансгенних культур, однак більшість з них культивується на невеликих площах. Серед нових видів рослин є Vt-баклажан, який комерціалізовано у Бангладеш у 2014 р. [3]. Вирощування трансгенної люцерни з низьким вмістом лігніну (Monsanto) розпочато у США та Канаді. Багато часу та коштів було витрачено на проект створення та впровадження у господарський цикл так званого «золотого рису» з підвищеним вмістом каротинів, який планувалося вирощувати на Філіппінах, у Бангладеш та Індонезії. Однак, за звітом Міжнародної служби з оцінки застосування агробіотехнологій та згідно доповіді І.Потрікуса (Ingo Potrykus, Presentation to the Agricultural Biotechnology Industry Conference 2014, Saskatchewan, October 5-8, 2014), для впровадження проекту треба ще декілька років.

У січні 2015 р. ISAAA опублікувала дані щодо вирощування трансгенних рослин у 2014 р. у світі [4]. За період 1996-2011 рр. площі під трансгенними культурами вирости у 94 рази і продовжують розширюватися. Якщо у 1996 р. загальна площа під трансгенними культурами складала 1,7 млн. га (в основному вирощувалася соя), то у 2011 р. вона становила вже 160 млн. га. За даними останньої доповіді, трансгенні культури нині вирощуються на 4% орних земель. Збільшення площ з 2013 року становило 6.3 млн га або 3.6%. США, Аргентина та Бразилія охоплюють 77% усього ринку виробництва трансгенних рослин. Збільшення площ у США за 2014 рік становить 3 млн га, Бразилії – 1,6 млн га. Нині ISAAA визнає США лідером з вирощування біотехнологічних рослин – близько 40% усього ринку. Разом з тим, у ряді країн трансгенні рослини вирощуються у незначній кількості. Так, площі під трансгенними рослинами становлять у Судані лише 0.9% загальних площ, у Колумбії - 0.2%, Австралії -0.1%, Іспанії - 0.3%. Це пов'язано з несприйняттям рослин зі зміненим геномом громадськістю та урядами деяких країн. Однак, слід зазначити, що досі не доведено наявності негативного впливу трансгенних рослин на здоров'я людей, про що може свідчити і такий факт, що у США, де рівень споживання трансгенних рослин є високим, достатньо високою є і тривалість життя.

З кінця минулого століття було розпочато розроблено стратегії створення рослин, які не вражаються хворобами [5-7], стійких до шкідників [8], рослин, які відрізняються підвищеною стійкістю до таких негативних природних стресових факторів як посуха, низькі температури, заболочення ґрунтів [9-11]. Використання рослин з трансформованим геномом дозволяє підвищити врожайність, використовувати нові агротехнічні прийоми, зменшити «хімічне» навантаження на ґрунти та рослини, використовуючи менше гербіцидів, пестицидів [12].

Генноінженерні підходи використовуються не тільки для покращення виживаності та стійкості до стресів сільськогосподарських культур, але й також для створення рослин, які є продуцентами цінних біологічно активних

сполук (БАС) [13]. Це можуть бути сполуки, які природно синтезуються в рослинах, а також невластиві для рослин певного виду, або такі, які притаманні бактеріям, вірусам, тваринам [14, 15]. Серед перших можна відзначити фруктозовмісні цукри, що мають пребіотичні, гепатопротекторні, протидіабетичні, протипухлинні властивості, регулюють обмін кальцію, нормалізують вагу. Такі сполуки накопичуються у ряді рослин, зокрема, родини Compositae. Іншим прикладом цінних природних БАС може бути артемізинін, сполука з антималярійними властивостями, що синтезується у рослин роду *Artemisia*. Дослідження природного артемізиніну було відзначено у 2015 р. Нобелівською премією, що є свідченням актуальності таких робіт. Нині сполуку отримують з рослин *A. annua* або шляхом хімічного перетворення попередника артемізиніну, артемізинової кислоти, синтезованої у трансгенних дріжджах. Разом з тим, актуальними є дослідження щодо підвищення синтезу БАС у рослинах, а також визначення можливості синтезу БАС у малодосліджених видах, наприклад, у *A. tilesii*. Розроблення біотехнологій створення рослин-продуцентів БАС дозволяє отримувати цінні речовини та використовувати їх при виробництві лікарських засобів.

Також було запропоновано використання рослин-продуцентів бактеріальних та вірусних антигенів для створення так званих «їстівних» вакцин – рослин, які вживаються безпосередньо у їжу та можуть застосовуватися для імунізації людей та тварин [16]. У цьому напрямку практично спрямованим є дослідження можливості перенесення генів цитокінів до геному рослин для отримання рекомбінантних біологічно активних сполук з імуномодельючими та противірусними властивостями. Наприклад, протягом останніх десяти років опубліковано результати ряду досліджень щодо перенесення до геному рослин гена *ifn- $\alpha$ 2b* інтерферону- $\alpha$ 2b людини [17-20]. Така зацікавленість пов'язана з доведеною ефективністю використання інтерферону для лікування вірусних інфекцій, а також онкозахворювань [21, 22]. Важливим напрямком біотехнології є також

створення рослин-продуцентів антигенів бактерій. Зокрема, використовуються нові підходи для розроблення більш ефективної вакцини нового покоління проти туберкульозу, продуцентом складових якої можуть бути саме трансгенні рослини. Однак, опубліковані дослідження свідчать про досить широку варіабельність як кількості, так і активності рекомбінантного білка, синтезованого у рослинах різних видів. Отже, на часі є розширені дослідження, спрямовані на вивчення можливості синтезу рекомбінантних білків у рослинній системі та визначення видів рослин, які здатні синтезувати ці сполуки у біологічно активній формі.

Протягом більше сорока років з метою отримання рослин з новими властивостями було розроблено методи культивування рослин у асептичній культурі, методи, спрямовані на регенерацію пагонів рослин, культивованих *in vitro*, а також ряд методів генетичної трансформації рослин, включаючи такі методи як агробактеріальна трансформація, електропорація, ПЕГ-індукована та біолістична трансформація [23-27]. Розроблено біотехнологічні прийоми для перенесення генів як до ядерної, так і до хлоропластної ДНК [28], а також способи селективного відбору трансгенних рослин [29]. На основі розроблених біотехнологій увага приділяється створенню трансгенних рослин, які можуть бути використані як біопродуценти білків медичного призначення. Рекомбінантні білки, що експресуються в трансгенних рослинах, є основою створення вакцин для захисту людей та тварин від таких вкрай небезпечних хвороб, як холера, туберкульоз, гепатит В та ін. Наприклад, останнім часом розробляються нові підходи для створення більш ефективної вакцини проти туберкульозу нового покоління [30], продуцентом складових якої можуть бути і трансгенні рослини [31, 32].

Використання у якості об'єктів біотехнологічних досліджень рослин, які традиційно застосовують у медицині, дозволяє отримати суперпродуценти БАВ та одночасно сприяти збереженню природних популяцій рослин, що особливо важливо при використанні рідкісних та зникаючих видів лікарських рослин [33]. Разом з тим, ці рослини досить

рядко використовують у якості об'єктів генетичної інженерії, хоча перенесення до геному таких рослин генів, що кодують синтез білків медичного призначення, дозволяє отримати нові форми, які продукують не тільки природні, але й рекомбінантні сполуки, тобто, одночасно декілька цінних сполук для їх використання у медицині та ветеринарії. Увагу привертають також рослини, у яких синтезується білок у досить високих кількостях. Так, рослини ряски *Lemna minor* L., що накопичують багато білка, використовують як білкову добавку до кормів [34, 35]. Рослини цього виду швидко розмножуються та можуть вирощуватися в умовах біореакторів, що дозволяє отримати значну кількість цільового продукту за короткий час.

Серед рослин, які використовуються у традиційній та народній медицині та становлять інтерес у дослідженнях, можна назвати ті, що належать до родини Складноцвітих, оскільки більшість з них відомі як продуценти біологічно активних сполук. До цієї родини відносять такі відомі їстівні культури як *Lactuca sativa* L., *Cichorium intybus* L., *Cichorium endivia* L., *Helianthus tuberosus* L., *Helianthus annuus* L., *Scorzonera hispanica* L., а також рослини, з лікувальними властивостями – *Matricaria chamomilla* L., *Tagetes erecta* L., *Artemisia* sp., *Tanacetum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Leontodon helveticus* L., *Bidens tripartita* L., *Calendula officinalis* L., *Echinacea purpurea* Moench.

Лише деякі з лікарських рослин наведених вище видів використовували у нечисленних біотехнологічних дослідженнях, а для ряду видів (наприклад, *Bidens pilosa*, *Artemisia tilesii*, *Tragopogon porrifolius*) досі не розроблено методики культивування та мікроклонального розмноження *in vitro*, а також генетичної трансформації. Разом з тим, останнім часом, наприклад, виявлено спектр лікувальних властивостей екстрактів з рослин причепи волосистої, що дозволяє виділити рослини цього виду як дуже перспективні, зокрема, для створення засобів для лікування онкозахворювань [36].

Отже, нині ведуться дослідження зі створення рослин з трансформованим геномом. Використання таких рослин може сприяти

збільшенню продуктивності сільськогосподарських культур, поліпшенню якості продуктів. Культивування трансгенних рослин може зменшити забруднення довкілля гербіцидами та пестицидами. Ще одним з позитивних аспектів використання трансгенних рослин є можливість їх застосування у якості фабрик для виробництва вакцин та інших фармацевтичних препаратів. Це може суттєво знизити вартість профілактики та лікування небезпечних хвороб.

В той же час, досі є необхідним оптимізувати протокол методики перенесення чужорідних генів стосовно кожного досліджуваного виду рослин. У зв'язку з цим, розроблення оптимізованого підходу, визначення ключових параметрів методики генетичної трансформації, що впливають на ефективність процесу, та дозволяють застосовувати її для трансформування широкого кола рослин незалежно від їх видової приналежності, є актуальним, оскільки дає можливість підвищення ефективності процесів генетичної трансформації рослин.

Розширення кола досліджуваних видів - об'єктів генетичної інженерії, у тому числі використання для цих цілей лікарських рослин, створення рослин, що продукують рекомбінантні сполуки, визначення можливості одночасного підвищення рівня накопичення у трансгенних рослинах природно синтезованих біологічно активних сполук та синтез рекомбінантних білків, які кодуються перенесеними до геному рослин чужорідними генами, відбір продуктивних ліній біотехнологічних рослин, отримання на основі цих рослин нових лікарських форм для лікування вірусних, бактеріальних та інших захворювань є на часі актуальним напрямком біотехнології. Розроблення високоефективних стратегій генетичної трансформації нових видів рослин, у тому числі лікарських, отримання лікарських рослин-продуцентів біологічно активних сполук, зокрема, таких, що синтезують рекомбінантні білки медичного призначення та інші БАС, дозволить використати широкі можливості біотехнологічних підходів. Результати таких робіт та отримані трансгенні рослини можуть бути використані в інтересах медицини та фармакології.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дослідження проводились в рамках бюджетних тем відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (Державний реєстраційний номер 0115U000025, 2015-2019), «Вивчення функціонування рослинних систем, які містять гетерологічний генетичний матеріал» (Державний реєстраційний номер 0110U002445, 2010-2014 рр.), «Вивчення поведінки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цінними агрономічними та фармацевтичними властивостями» (Державний реєстраційний номер теми 0107U002734, 2007-2011), «Створення культур ізольованих та трансгенних коренів *in vitro* та аналіз їх біологічної активності» (Державний реєстраційний номер 0110 U006083, 2010-2014).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було отримання шляхом генетичної трансформації з використанням бактерій роду *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*) і вивчення ліній трансгенних рослин або «бородатих» коренів, які продукують природні та рекомбінантні біологічно активні сполуки і білки з УФ-протекторною, антиоксидантною, противірусною та антимикробною дією.

У завдання входило:

1. Дослідити закономірності впливу умов кокультивування експлантів з агробактеріальною суспензією на частоту трансформації, з'ясувати оптимальні параметри процесу, які сприяють підвищенню частоти трансформації;
2. Оптимізувати методику отримання трансгенних коренів та рослин з метою підвищення її ефективності для створення з високою частотою біотехнологічних рослин різних видів;
3. З використанням *A. tumefaciens*- та *A. rhizogenes* отримати трансгенні рослини або «бородаті» корені *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A.*

*officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* (клас Дводольні) з генами, які кодують синтез антигенів мікобактерій, або з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини, або лише з генами агробактерій;

4. Визначити можливість використання *A. rhizogenes* для створення трансгенних рослин *L. minor* (клас Однодольні) та отримати трансформовані рослини ряски;

5. За використання отриманих ліній визначити вплив генетичної трансформації на фізіологічні параметри росту;

6. Визначити можливість накопичення природних для досліджуваних видів біологічно активних сполук (поліфруктани, артемізинін) та рекомбінантних білків, а також біологічну активність екстрактів з трансгенних ліній;

7. Відібрати трансгенні лінії з підвищеним вмістом БАС, які можуть бути джерелом природних та рекомбінантних сполук медичного призначення;

8. Створити колекцію трансгенних рослин та коренів – продуцентів БАС.

**Об’єкт дослідження** – створення нових ліній біотехнологічних рослин та рослинних систем – продуцентів природних та рекомбінантних біологічно активних сполук і білків, що характеризуються УФ-протекторною, антиоксидантною, противірусною та антимікробною дією.

**Предмет дослідження** – розробка та вдосконалення біотехнологічних підходів з використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для отримання трансгенних рослин та ліній «бородатих» коренів, збагачених на природні і рекомбінантні біологічно активні сполуки та білки.

**Методи дослідження.** Для виконання роботи з отримання трансгенних рослин використовувалися наступні методи:

- Метод культивування рослинних тканин *in vitro* та регенерації пагонів;
- Метод генетичної трансформації з використанням *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*;



- Молекулярно-біологічні методи (ПЛР, ЗТ-ПЛР, наявність та експресія трансгенів в геномі трансформованих рослин);
- Фізіологічні методи (визначення швидкості росту та ін.);
- Біохімічні методи (визначення вмісту синтезованих сполук та антиоксидантної активності);
- Метод високоефективної рідинної хроматографії (визначення вторинних метаболітів);
- Метод статистичної обробки (для аналізу експериментальних даних).

### **Наукова новизна.**

Автором запропоновано підходи для оптимізації методики генетичної трансформації та їх застосування при отриманні біотехнологічних лікарських рослин різних видів. Уперше методом *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні рослини *C. intybus* та *L. sativa* з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини або генами антигенів *M. tuberculosis*.

Уперше було:

- використано *A. rhizogenes* для трансформування рослин *L. minor* та створено напряду без отримання культури «бородатих» коренів трансгенні рослини, які несуть гени антигенів ESAT6 та AG85B *M. tuberculosis* і синтезують цільовий білок;

- практично доведено можливість генетичної трансформації лікарських або їстівних рослин *L. sativa*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* з використанням *A. rhizogenes* та створено культури «бородатих» коренів, у тому числі такі, що мають ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини.

- кількісно визначено можливість одночасного накопичення як природних для рослин БАС, так і рекомбінантних білків у трансгенних лініях.

- створено колекцію «бородатих» коренів та трансгенних рослин лікарських і їстівних видів *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor* – продуцентів БАС.

**Практичне значення одержаних результатів.** Автором уперше розроблено високоефективну методику трансформації, що може бути використана для створення біотехнологічних рослин різних видів, родів та родин – *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor*. Визначені параметри процесу трансформації та розроблена оптимізована методика за використання *A. tumefaciens* або *A. rhizogenes* можуть бути застосовані для високоефективної генетичної трансформації рослин та отримання з високою частотою трансгенних рослин і «бородатих» коренів. Створені трансгенні рослини і «бородаті» корені є джерелом біологічно активних сполук, зокрема, рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$  людини для профілактики та лікування вірусних інфекцій; джерелом отримання антигенів *M. tuberculosis* для розробки вакцин нового покоління для захисту від туберкульоз; фруктозовмісних цукрів, які мають пребіотичні та інші властивості; сполук з антимікробними та протималярійними властивостями.

**Особистий внесок здобувача.** Загальна концепція роботи, ідея та напрямки досліджень, основні наукові положення сформульовано автором особисто. Здобувачем особисто проведено аналіз наукової літератури, вибір об'єктів досліджень, підготовлено та написано наукові статті, сформульовано висновки щодо результатів проведеної роботи. Особистий внесок здобувача полягає також у проведенні експериментів з оптимізації умов регенерації, умов трансформування та здійснення генетичної трансформації *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor* з використанням *A. tumefaciens* або *A. rhizogenes*. Здобувачем проведено аналізи отриманих ліній трансгенних рослин та «бородатих» коренів (фізіологічні, біохімічні, мікробіологічні дослідження). У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у визначенні завдань, виборі методів, проведенні експериментів з трансформації, проведенні аналізів (визначення антиоксидантної, протимікробної активності, тощо),

обговоренні результатів та їх інтерпретації, узагальнення експериментальних даних, формулюванні висновків, участі у написанні статей.

**Апробація роботи.** Результати досліджень були представлені на VI міжнародній науково-практичній конференції «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», 2014 р., Ялта, Україна; IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Биотехнология XXI столетия», 2015 р., Київ; міжнародній конференції «Plant physiology and genetics – Achievements and challenges», 2014, Софія, Болгарія; Міжнародній науково-практичній конференції «Плодові, лікарські, технічні, декоративні рослини: актуальні питання інтродукції, біології, селекції, технології культивування», 2014, Київ; Міжнародній конференції «Геноміка рослин та біотехнологія» 2013, Київ; Всеросійській науковій конференції з міжнародною участю «Инновационные направления современной физиологии растений», 2013, Москва, Росія; міжнародній науково-практичній конференції «Селекція, генетика та насінництво сільськогосподарських культур», 2013, Полтава, Україна; Третій національній конференції з міжнародною участю «Екологічна інженерія та охорона навколишнього середовища», 2013, Софія, Болгарія; Міжнародній конференції «Biotechnology and plant breeding. Perspectives towards food security and sustainability» 2012, Радзікув, Польща; Міжнародній науковій конференції «Дендрологія, квітникарство та садово-паркове будівництво», 2012, Ялта; Шостій всеукраїнській науково-практичній конференції «Биотехнология 21 столетия», 2012, Київ; «Ukrainian-German Symposium on physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology», 2010, Берегово, Україна; Науково-практичній конференції «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 2011, Новий Світ, Україна; IV, V, VI, VIII, IX, X міжнародних наукових конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів», 2009, 2010, 2011, 2013, 2014 та 2015 років, Україна; II міжнародній науковій конференції «Агробиоразнообразие для улучшения питания, здоровья и качества жизни», 2015, Нітра, Словаччина та на семінарах відділу (2009-2015 р.р.).

### Публікації.

За результатами дисертації опубліковано 51 наукова робота, з них 34 статті у періодичних наукових виданнях та монографіях, 16 тез у матеріалах конференцій, 1 патент на корисну модель, у тому числі

Статті у фахових та іноземних наукових виданнях:

1. **Матвєєва Н.А.** Вміст фотосинтетичних пігментів у трансгенних рослинах цикорію з геном туберкульозного антигена ESAT 6 / **Н.А. Матвєєва, О.Ю.Кваско** // Вісник Донецького національного університету Сер.А: Природничі науки. – 2010, вип.2. – С.249-253. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, зроблено висновки, написано статтю)*
2. **Матвєєва Н.А.** Салат-латук як об'єкт біотехнологічних досліджень та продуцент рекомбінантних білків / **Н.А. Матвєєва** // Біотехнологія – 2010. – №1. – С. 9-16.
3. **Матвєєва Н.А.** Фруктани. Біосинтез у природі та в трансгенних рослинах / **Н.А.Матвєєва** // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т.8, №2.– С.312-319.
4. **Матвєєва Н.А.** Біосинтез пребіотика інуліну в рослинах цикорію в культурі *in vitro* / **Н.А. Матвєєва, Т.В. Берегова, О.Ю. Кваско** // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2011. – №57. – С.7-8. *(Здобувачем проведено експерименти, опрацьовано отримані дані, написано статтю)*
5. **Матвєєва Н.А.** Перенесення в рослини ряски *Lemna minor* L. генів туберкульозних антигенів ESAT6 та AG85В шляхом *Agrobacterium rhizogenes* – опосередкованої трансформації / **Н.А. Матвєєва, О.М.Кіщенко, А.М.Шаховський, М.В.Кучук** // Біотехнологія – 2011. – Т.4, № 2. – С. 46-53. *(Здобувачем розроблено методику трансформації,отримано трансгенні рослини, зроблено висновки, написано статтю)*
6. **Матвєєва Н.А.** Особливості накопичення поліфруктанів у трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L / **Н.А. Матвєєва, О.Ю. Кваско** // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 1. – С.65-69. *(Здобувачем*

- визначено напрямок досліджень, проведено порівняння вмісту ПФ у екстрактах, зроблено висновки, написано статтю)*
7. **Матвєєва Н.А.** Синтез інуліну в «бородатих» коренях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* / **Н.А. Матвєєва**, О.М.Кіщенко, А.М.Шаховський, М.В.Кучук // Біотехнологія – 2011. –Т.4, №3. – С.56-63. *(Здобувачем створено трансгенні рослини цикорію, проведено частину аналізів, зроблено висновки, написано статтю)*
  8. **Матвєєва Н.А.** Вплив шестивалентного хрому на ріст трансгенних рослин ряски в умовах *in vitro* / **Н.А. Матвєєва**, В.П.Дуплій // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. –Т.9, №2. – С.240-246. *(Здобувачем сплановано та проведено експерименти, зі співавтором проаналізовано дані, написано статтю)*
  9. **Matvieieva N.A.** Regeneration of transgenic plants from “hairy” roots of *Cichorium intybus* L. Var foliosum Hegi / **N.A. Matvieieva**, О.М. Kishchenko, А.О. Potrochov, А.М. Shakhovsky, М.У. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2011. – Vol.45, №5. – P. 277-281. *(Здобувачем отримано трансгенні корені, визначено умови регенерації, отримано трансгенні рослини, проаналізовано результати, зі співавторами написано статтю)*
  10. Effective *Agrobacterium*-mediated transformation of chicory (*Cichorium intybus* L.) with *Mycobacterium tuberculosis* antigene ESAT6 / **N.A. Matvieieva**, М.У. Vasylenko, А.М. Shahovsky, М.О. Bannykova, О.У. Kvasko, N.V. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2011. – Vol. 45, №1. – P. 7-12. *(Здобувачем оптимізовано умови трансформації, отримано трансгенні рослини, спільно зі співавторами проведено аналіз результатів, зроблено висновки, написано статтю)*
  11. **Матвєєва Н.А.** Ріст рослин при різних температурних умовах: чи відрізняються рослини Антарктики / **Н.А. Матвєєва**, С.Е. Чапкевич, К.О. Дробот, В.П. Дуплій / Укр. антарктичний журнал. – 2011-2012. – №10-11. – С. 257-262. *(Здобувачем проведено частину аналізів, зі співавторами проаналізовано результати, написано статтю)*

12. **Матвєєва Н.А.** Отримання «бородатих» коренів рослин *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis* з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / **Н.А. Матвєєва** // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т.10, №2. – С.262-268.
13. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with human interferon  $\alpha 2b$  gene / **N.A. Matvieieva**, Yu.I. Kudryavets, A.A. Likhova, Shakhovsky A.M., N.A. Bezdeneznyh, O.Yu. Kvasko // Cytol. Genet. – 2012. – Т.46, № 5. – С.285-290. (Здобувачем підготовлено рослини та екстракти для досліджень, спільно зі співавторами обговорено результати та висновк та підготовлено статтю)
14. **Матвєєва Н.А.** Використання регуляторів росту рослин для інтенсифікації росту біомаси та підвищення вмісту поліфруктанів в культурі «бородатих коренів» цикорію / **Н.А. Матвєєва**, В.А.Циганкова, С.Е.Чапкевич, М.В.Кучук, С.П.Пономаренко // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т.10, №2. – С.269-278. (Здобувачем розроблено методологію тестування регуляторів та проведено зі співавторами експерименти, проаналізовано результати, узято участь у написанні статті)
15. **Matvieieva N.A.** Features of lettuce transgenic plants with *ifn- $\alpha 2b$*  gene regenerated after *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / N.A. Matvieieva, A.M. Shahovsky, M.V. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2012. – Vol.46, №3. – P. 150-154. (Здобувачем створено трансгенні корені, розроблено методуку регенерації пагонів, зроблено висновки, написано статтю)
16. **Matvieieva N.A.** Reduction of hexavalent chromium by duckweed (*Lemna minor*) in *in vitro* culture / **N.A. Matvieieva**, V.P. Dupliy, V.O. Panov // Hydrobiol. J. – 2013. – Vol. 49, № 1. – С.58-67. (Здобувачем розроблено схему експерименту, спільно зі співавторами проведено дослідження, зроблено висновки, написано статтю)
17. Мазник К.С. Оптимізація екстрагування фруктанів з культивованих *in vitro* «бородатих» коренів цикорію / К.С. Мазник, **Н.А. Матвєєва** // Biotechnol. Acta – 2013. – Т.6, № 3. – P. 83-89. (Здобувачем розроблено схему експерименту, проаналізовано результати, зроблено висновки, зі співавтором написано статтю)

18. Створення та вивчення культури трансгенних коренів *Althaea officinalis* L з геном інтерферону альфа 2b людини / **Н.А. Матвєєва**, Ю.Й. Кудрявець, О.А. Ліхова, О.Ю. Кваско, А.М. Шаховський // *Biotechnol. Acta* – 2013. – Т. 6, № 2. – С.74-79 (Здобувачем оптимізовано умови трансформації та створено трансгенні корені, підготовлено матеріал для досліджень, написано статтю)
19. Increase in the synthesis of polyfructan in the cultures of chicory “hairy roots” with plant natural growth regulators / V.A. Tsygankova, A.I. Yemets, S.P. Ponomarenko, **N.A. Matvieieva**, S.E. Chapkevich, N.V. Kuchuk // *Int. J. Biomed.* – 2013. – Vol.3, №2. – P.139-144. (Здобувачем оптимізовано умови вирощування «бородатих» коренів, екстрагування ПФ, розроблено схему та проведено експерименти з культивування коренів та визначення вмісту ПФ)
20. Screening plant biodiversity *in vitro* for new natural products / N. V. Kuchuk, V. B. Belokurova, **N. A. Matvieieva**, A. A. Peterson, M. Yu. Vasylenko, I. M. Kurchenko, L.E. Kurbatova, T. Torok, J. C. Hunter-Cevera // *Industrial Biotechnol.* – 2014. – Vol.10, №5. – P. 363-368. (Здобувачем проведено дослідження трансгенних коренів, узято участь у написанні статті)
21. **Матвєєва Н.А.** Накопичення фруктозовмісних вуглеводів в культурі трансгенних коренів лікарських рослин / **Н.А. Матвєєва**, К.О. Дробот // *Фізіол. та біохім. культурних рослин.* – 2015. – Т.47, №1. – С.74-79. (Здобувачем спільно зі співавтором проведено аналізи, зроблено висновки, написано статтю)
22. **Матвєєва Н.А.** Отримання та культивування «бородатих» коренів рослин *Bidens pilosa* L. / **Н.А. Матвєєва**, А.М. Шаховський // *Вісник Укр. тов-ва генетиків та селекціонерів.* – 2015. – Т.13, №1. – С. 46-50 (Здобувачем оптимізовано методику та створено трансгенні рослини, проаналізовано результати, написано статтю)
23. **Матвєєва Н.А.** Вплив трансформації на накопичення біологічно активних сполук у «бородатих» коренях *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* // **Н.А. Матвєєва**, К.О. Дробот // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики,*

- Укр. тов-во генетиків та селекціонерів ім.М.І.Вавілова; редкол. / В.А.Кунах (голова ред.) [та ін.]. – К.: Укр. тов-во генетиків та селекціонерів ім.М.І.Вавілова, 2015. – Т.17. – С.205-208. (Здобувачем створено трансгенні рослини, проведено частину аналізів, написано статтю)
24. High frequency genetic transformation of *Cichorium intybus* L. using *nptII* gene as a selective marker / **N. Matvieieva**, A Shakhovsky, O. Kvasko, N. Kuchuk // Cytol. Genet. – 2015. – Vol.49, № 4. – P. 220-225. (Здобувачем оптимізовано методику трансформації, визначено ефективність використання селективних генів, створено трансгенні лінії, написано статтю)
25. **Matvieieva N.A.** An efficient regeneration system and antimicrobial activity of *Ruta graveolens* L. plants / **N.A. Matvieieva**, K.O. Drobot, L.A. Pasichnyk, N.V.Zhytkevych // Ecol. Engineer. Environ. Protection. – 2015. – № 1. – P. 33-39. (Здобувачем розроблено схему експерименту, проведено експерименти щодо визначення протимікробної активності ґрунтових та умовно патогенних мікроорганізмів, підготовлено статтю)
26. **Matvieieva N.** *Artemisia tilesii* Ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / N.Matvieieva, A.M. Shakhovsky, V.B. Belokurova, K.O. Drobot // Preparative Biochem. and Biotechnol. – online: 02.04.2015, Режим доступу: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2015.1031393> (Здобувачем обґрунтовано ідею, розроблено схему та проведено експерименти, створено трансгенні корені, зроблено висновки, зі співавторами написано статтю)
27. Peterson A. Accumulation of recombinant Ag85B and ESAT6 fusion protein – analog secretory *Mycobacterium tuberculosis* proteins – in transgenic *Lemna minor* L. plants/ A. A. Peterson, M. Yu. Vasylenko, **N. A. Matvieieva**, M. V. Kuchuk // Biotechnol. Acta. – 2015. – № 5. – P. 39-47 (Здобувачем проведено мікроклональне розмноження отриманих ним раніше трансгенних рослин, узято участь у обговоренні результатів та висновків, у написанні статті)



28. **Matvieieva N.** *Agrobacterium*-mediated transformation of Compositae plants. I. Construction of transgenic plants and “hairy” roots with new properties / **N. Matvieieva** // *Biotechnol. Acta.* – 2015. – Vol. 8, № 1. – P.19-31.
29. **Matvieieva N.** Using of *Agrobacterium*-mediated transformation for the biotechnological improvement of Compositae plants. II. Synthesis of bioactive compounds in transgenic plants and “hairy” root culture / **N. Matvieieva** // *Biotechnol. Acta.* – 2015. – Vol. 8, № 2. – P.26-35.
30. Остапчук А. Вивчення «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb / А. Остапчук, Н. Матвєєва // *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality: Наукові публікації Міжнародної організації АгроБіоНет.* – Нітра, 2015. – С. 518-520 (Здобувачем визначено напрямок досліджень, проведено мікроклональне розмноження отриманого раніше рослинного матеріалу, підготовлено екстракти, узято участь у написанні статті).
31. Антимикробная активность экстрактов из трансгенных корней *Ruta graveolens* L./ **Н. Матвеева**, Г. Гладка, В. Говоруха, Е. Прекрасная, О. Сулова, А. Таширев // *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality: Наукові публікації Міжнародної організації АгроБіоНет.* – Нітра, 2015. – С. 468-470 (Здобувачем визначено напрямок досліджень, отримано екстракти, проведено тестування, написано статтю).
32. **Матвеева Н.А.** Изучение культивируемых *in vitro* лекарственных растений *Bidens pilosa* L./ **Н.А. Матвеева** // *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality: Наукові публікації Міжнародної організації АгроБіоНет.* – Нітра, 2015. – С. 470-473.

Статті у монографіях:

33. *Agrobacterium*-mediated transformation of Chicory using vector constructions with various selective and target genes and peculiarities of transgenic plants / **N. Matvieieva**, О. Kvasko, А. Shachovsky, К. Afanasieva, М. Zazhytska, N. Kuchuk / *Biotechnology and plant breeding perspectives* Ed R.K.Bell, Edward Arseniuk. – Jondhpur: Agrobios (Intern.), 2014. – P. 269-274. (Здобувачем розроблено схему та проведено експерименти з трансформації, створено

трансгенні зразки, зі співавторами обговорено результати, написано статтю)

34. **Matvieieva N.A.** Fructan accumulation in plant *in vitro* culture / **N. Matvieieva** / Production and processing of food crops for value addition: technology and genetic options Ed. R. K. Behl, A. P. Singh, A. B. Lal, Geert Haesaert. – Jondhpur: Agrobios (Intern.), 2015. – P.95-108.

Патент на корисну модель:

35. Патент на корисну модель №69446 «Спосіб отримання трансформованих рослин ряски методом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації / **Н.А.Матвєєва**, А.М.Шаховський, 25.04.2012. (Особистий внесок: висунуто ідею та розроблено спосіб отримання трансформованих рослин ряски шляхом генетичної трансформації)

Матеріали конференцій:

36. *Cichorium intybus* L. як перспективний об'єкт генетичної інженерії / **Н.А.Матвєєва**, А.М.Шаховський, О.Ю.Кваско, М.Ю.Василенко, І.М.Герасименко, М.В.Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць: Київ, Логос. – 2009. – С. 236-241.
37. **Матвєєва Н.А.** Культура бородатих корей цикорія с геном інтерферона человека / **Н.А.Матвєєва**, Е.Ю.Кваско, А.М.Шаховський, И.М. Герасименко // Укр. біохім. журнал. – 2010. – Т.82, №4, додаток 2. – С.278.
38. **Матвєєва Н.А.** Полифруктаны в растениях цикорія *Cichorium intybus* L. в культуре *in vitro* и их биологическая активность / **Н.А.Матвєєва**, Е.Ю. Кваско, О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко // Тезисы докладов Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». – Новый Свет, 2011. – С.285-286.
39. Кваско О.Ю. Вплив умов культивування на накопичення поліфруктанів рослинами цикорію *Cichorium intybus* L. з геном інтерферону альфа 2b людини / О.Ю.Кваско, **Н.А. Матвєєва** // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць: Київ, Логос. – 2011. – С. 278-281.

40. Дуплій В.П. Використання ряски для відновлення шестивалентного хрому / В.П.Дуплій, **Н.А.Матвєєва**, В.Панов // Тези доповідей 6 Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія 21 ст.». – Київ, 2012. – С.169.
41. **Матвєєва Н.А.** Уф-протекторное действие экстрактов растений / **Н.А.Матвєєва**, К.С.Афанасьєва, М.О.Зажицкая, Е.Ю.Кваско // Матеріали міжнародної наукової конференції «Дендрологія, квітникарство та садово-паркове будівництво». – Ялта, 2012. – Т.2. –С.131.
42. **Matvieieva N.** Using of *Agrobacterium* sp. for genetic transformation of chicory / **N.Matvieieva**, O.Kvasko, A.Shachovsky, N.Kuchuk // Abstr. of International conference «Biotechnology and plant breeding. Perspectives towards food security and sustainability» Radzicow, 2012 – P. 147-148.
43. Дробот К.О. Відмінності у вмісті цукрів у трансгенних коренях алтея (*Althaea officinalis* L), отриманих з використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації / К.О.Дробот, **Н.А. Матвєєва** // Тези міжнародної науково-практичної конференції «Селекція, генетика та насінництво сільськогосподарських культур», присвяченої 50-річчю селекції рослин в Полтавській державній аграрній академії, Полтава, 2013. – С.79-81.
44. Порівняння противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин цикорію, салату та алтея / **Н.А.Матвєєва**, Ю.Й. Кудрявець, О.О. Ліхова, О.Ю.Кваско, А.М.Шаховський // Фактори експеримент. евол. організмів. Збірник наукових праць: Київ, Логос. – 2013. – Т.12. – С. 285-289.
45. Єлісеєва Ю.В. Використання *Agrobacterium-rhizogenes*–опосередкованої трансформації для підвищення вмісту поліфруктанів у коренях салату *Lactuca sativa* L. / Ю.В.Єлісеєва, **Н.А. Матвєєва** // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць: Київ, Логос. – 2013. – Т.12 – С. 216-219.
46. **Матвєєва Н.А.** Генетическая инженерия как инструмент для создания растений цикория с новыми свойствами / **Н.А.Матвєєва**, А.М.Шаховський, Е.Ю.Кваско, Н.В.Кучук // Геноміка рослин та біотехнологія. Міжнар. конф.: Київ, 2013. – С.20.

47. **Матвеева Н.А.** Растения экваториального высокогорья: перспективы использования в биотехнологических исследованиях/ **Н.А.Матвеева**, Л. Стародуб // «Плодові, лікарські, технічні, декоративні рослини: актуальні питання інтродукції, біології, селекції, технології культивування Матеріали Міжнародної науково-практичної заочної конференції: Київ, 2014. – С. 146-149.
48. Drobot K.O. Peculiarities of transgenic *Althaea officinalis* L. hairy root culture growth / K.O. Drobot, **N.A. Matvieieva** // Abstr. of International conference «Plant physiol. and genet. – Achievements and challenges»:Sofia, 2014. – P. 31-32.
49. **Матвеева Н.А.** Растения Эквадора как новые объекты биотехнологии и для получения биологически активных соединений/ **Н.А.Матвеева**, Rabón Garcés Galo Jacinto, Ludmila Starodub Sauliak // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира. Материалы VI международной научно-практической конференции. – Симферополь: ИТ Ариал, 2014. – С. 204-205.
50. **Матвеева Н.А.** Определение антиоксидантной активности экстрактов из трансгенных корней *Althaea officinalis* L. / **Н.А.Матвеева**, К.А.Дробот, А.С.Потрохов, А.А.Потрохов // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира. Материалы VI международной научно-практической конференции. – Симферополь: ИТ Ариал, 2014. – С.202-203.
51. Дробот К.О. Створення культури бородатих коренів рослин алтеї лікарської *Althaea officinalis* L. з використанням різних векторних конструкції з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини / Дробот К.О., **Матвєєва Н.А.**, Шаховський А.М. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – Київ, 2014. – С. 59-63.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Генетична інженерія рослин

Генетична інженерія рослин є методологічним підходом, метою якого є створення рослин зі зміненим геномом та який включає методи і технології щодо виділення генів з організмів, маніпуляцій з цими генами та способів уведення генів у клітини рослин. Основою для розвитку генетичної інженерії рослин стали досягнення другої половини 20 ст. з визначення структури та функцій нуклеїнових кислот, подальший прогрес у розробленні технологій отримання генів, їх уведення у вектори для перенесення до інших організмів, розроблення способів такого перенесення та методики селекційного відбору організмів з трансформованим геномом.

Генетична інженерія рослин є галуззю біотехнологічних досліджень, що динамічно розвивається. Поставлені завдання є різноплановими та охоплюють дослідження, метою яких є суто фундаментальні роботи стосовно, наприклад, функціонування перенесених генів, а також прикладні дослідження, спрямовані на розроблення біотехнологій, результати яких можуть становити практичний та комерційний інтерес. До останніх слід віднести розроблення стратегій одержання біологічно активних сполук (БАС) із рослинної сировини з використанням біотехнологічних підходів. До цільових сполук належать як такі, що природно синтезуються в рослинах *in vivo*, так і невластиві для рослин (наприклад, тваринного або мікробного походження). Використання сучасних методів, зокрема генетичної інженерії, дає змогу значно підвищити рівень накопичення природних рослинних БАС (вторинних метаболітів, запасних цукрів тощо) шляхом трансформації, а також створити рослини, які синтезують сполуки, характерні для рослин інших видів. Інший підхід – синтез зовсім невластивих для рослин сполук, рекомбінантних протеїнів – дозволяє отримати або так звані «істівні» вакцини (використовувані в їжу рослини, що синтезують антигени), або

рослини як джерело для екстрагування цільових рекомбінантних сполук медичного призначення.

Кінцевою метою будь-яких експериментів щодо створення трансгенних рослин/коренів є передусім одержання культур, які можуть мати практичне застосування, зокрема як системи синтезу БАС. Нині проводять дослідження, метою яких є отримання біотехнологічних рослин, які продукують ці сполуки у підвищеній кількості порівняно з вихідними. Рівень накопичення сполук у рослинах після трансформації *Agrobacterium tumefaciens* може значно перевищувати такий рівень у контрольних нетрансформованих рослинах. Трансформація з використанням *A. rhizogenes* є шляхом одержання культури «бородатих» коренів, у яких також відбувається накопичення БАС, причому досить часто (так само як і в трансгенних рослинах) у більшій кількості, ніж у вихідних рослин, що є наслідком перенесення до геному специфічних генів рослин або агробактерій, неспецифічного впливу перенесених цільових генів тощо. Відбір найбільш продуктивних ліній «бородатих» коренів, які характеризуються швидким ростом та підвищеним рівнем накопичення БАС, культивування їх у біореакторах є шляхом до створення біотехнологій виділення сполук з лікувальними властивостями.

1.1.1. Способи перенесення чужорідних генів. Відповідно до способів, які використовують для перенесення чужорідних генів у клітини, виокремлюють методи соматичної гібридизації та генетичної трансформації. Метод генетичної трансформації включає трансформацію, опосередковану бактеріями роду *Agrobacterium*, та пряму трансформацію, при якій перенесення генів здійснюється напряму, без бактерій-посередників.

Метод соматичної гібридизації, який базується на технології використання ізольованих протопластів [37, 38], дозволяє створювати гібридні рослини шляхом злиття соматичних клітин [2, 39, 40]. За визначення оптимальних умов та наявності для рослин певних видів методик культивування протопластів та регенерації пагонів після отримання

гібридних клітин [41-43] можна створити рослини з геномом, у якому є гени від двох або декількох партнерів, схрещувати філогенетично віддалені види, гібриди яких неможливо отримати методом традиційної селекції [44]. Метод використовують для перенесення генів в рослини різних видів та родин, наприклад, пасльонових [45], хрестоцвітих [46], складноцвітих [47], злакових [48].

Хоча бум кінця минулого століття щодо застосування методу соматичної гібридизації нині пройшов, цей метод, незважаючи на його трудомісткість, використовують для створення організмів із зміненим геномом. У якості об'єктів використовують як мікроорганізми [49-52], так і рослини [53]. Наприклад, злиття протопластів було використано для отримання соматичних гібридів диких видів *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum*, *S. chacoense* та *S. tuberosum*, які не схрещуються у природі. Метою експериментів було отримання форм рослин, які є стійкими до хвороб та шкідників [54].

Серед методів прямої трансформації можна виокремити такі як біолістична трансформація, ПЕГ-індукована трансформація, мікроін'єкція ДНК, електропорація. Останні два методи є досить рідко використовуваними, оскільки вимагають наявності спеціального обладнання, а ефективність їх невисока. ПЕГ уперше було використано для трансформації протопластів тютюну [55]. Хоча цей метод не є дуже популярним нині, останнім часом з його використанням проведено ряд цікавих досліджень. Наприклад, трансформовано протопласти з протонемі моху *Physcomitrella patens*, який все частіше є модельним об'єктом біотехнологій [23]. Лі зі співавторами [56] трансформували протопласти грибів *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* та *Pleurotus ostreatus*, використовуючи вектор з селективним геном гігроміцинВ-фосфотрансферази, та отримали від 85 до 150 трансформантів з  $10^7$  життєздатних протопластів. Gietz зі співавторами [57] у якості об'єктів трансформації використовували клітини дріжджів. Застосовуючи протопласти пальми *Elaeis guineensis*, розробили протокол ПЕГ-індукованої

трансформації, оптимізувавши ряд параметрів (концентрація ДНК, ПЕГ, хлориду магнію, час обробки тощо) [58]. У цьому дослідженні також було використано і інший метод – мікроін'єкції ДНК для отримання стабільно трансформованих протопластів, досягнувши таким чином більшого відсотку трансформантів (14%), ніж при використанні попереднього методу (4.76%). Однак, робота з трансформації шляхом мікроін'єкцій є копіткою та трудоємкою, через що метод не знайшов широкого розповсюдження.

Метод електропорації може бути застосований для трансформації як ядерної, так і хлоропластної ДНК. При електропорації клітини рослин або протопласти піддають короткотривалим імпульсам електричного струму високої напруги. При цьому спостерігається ефект пробою клітинної мембрани та утворення в ній пор, через які ДНК може потрапити в середину клітини [59, 60]. Метод часто обирають для трансформування бактеріальних клітин, грибів та водоростей [61, 62].

З кінця 20 ст. застосування набув відносно новий метод генетичної трансформації з використанням «біогармати» – метод біолістичної трансформації. Суть його полягає у безпосередньому перенесенні генів до клітин досліджуваних рослин з використанням спеціального пристрою [24, 63-65]. Метод може бути використаний для трансформування ізольованих протопластів та різних частин рослини (листки, стебла, сім'ядолі, калусна тканина та інші) [66-70]. Особливістю застосування методу є те, що за його використання можна трансформувати як ядерний, так і хлоропластний геном [71]; він не має специфічності щодо тих чи інших видів рослин [72], причому з однаковою ефективністю можна трансформувати як рослини класу Дводольних, так і Однодольні [73], а також використовувати декілька векторів одночасно [74]. Метод може бути використаний і для перенесення чужорідних генів до мікроорганізмів, водоростей та клітин рослин і тварин [75]. Відносним недоліком методу можна вважати необхідність застосування спеціального пристрою, визначення ряду технічних параметрів методики перенесення гена (розмір та кількість часток, матеріал, з якого вони зроблені,



ступінь розрідження повітря в камері, тиск гелію, відстань між соплом та об'єктом, що обстрілюється) та невисоку частоту перенесення генів порівняно з частотою трансформації при використанні методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [76-78]. Однак, можливість трансформації геному хлоропластів і, таким чином, значного підвищення рівня синтезу цільових білків, робить використання біолістичного методу важливим інструментом генетичної інженерії рослин. Наприклад, останнім часом було здійснено трансформацію хлоропластної ДНК *Marchantia polymorpha* з високою ефективністю, оскільки було отримано близько 60 трансформованих рослин з одного пострілу [79]. Транспластомні рослини *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) з геном *cryIAb* також було створено методом біолістичної трансформації [80]. Автори оптимізували протокол трансформування для отримання трансгенних рослин з високою ефективністю.

При використанні «біогармати» трансформовано такі цінні сільськогосподарські культури як кукурудза [81-83], бавовник [84, 85], пшениця [73, 86-88], сорго [89-92], рис [93-95], тютюн [96-97], соя [98-100], ріпак [101-102], картопля [103-106], види *Brassica* [107], цукрова тростина [108], цибуля [109], баклажан [110]. Також трансформовано їстівні гриби [111], арахіс [112], різні види пальм [113, 114], орхідею [115]. При біолістичній трансформації можуть бути застосовані одночасно дві або більше плазмід з ефективністю до 85%, що було визначено ще на початку розроблення цього методу [116]. Останнім часом проводяться експерименти з генетичної трансформації з використанням біолістичного методу [117, 118], особливо для отримання трансгенних рослин класу однодольних.

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

класу однодольних, неможливе використання агробактеріальної трансформації. Однак, нині найбільш використовуваним все ж таки є опосередкований метод перенесення генів з використанням бактерій роду *Agrobacterium* через його доступність та простоту застосуванні.

1.1.2. Генетична трансформація за допомогою ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium*. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин використовується дуже давно і є першим розробленим методом перенесення чужорідних генів. Вона базується на природній здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes* родини Rhizobiaceae переносити частину свого геному до клітин рослин. При наявності такого процесу інфікування у природних умовах відбувається ріст пухлиноподібних утворень – корончастих галів (за інфікування *A. tumefaciens*) або бородатих коренів (за інфікування *A. rhizogenes*). Було виявлено, що в клітинах цих бактерій міститься Ті-плазміда, частина якої (Т-ДНК), що обмежена повторами з 25 пар нуклеотидів, переноситься до рослинних клітин при їх інфікуванні [21]. Докладні дослідження дозволили визначити локалізацію Ті-плазмиди в клітинах рослин і встановити місце інтеграції перенесеної після інфікування ДНК Ті-плазмиди [119]. Оскільки виявлене явище щодо вірогідного перенесення генів агробактеріями виявилось перспективним для використання у біотехнологіях, було докладно досліджено особливості будови та функціонування Ті-плазмиди [120], місця вбудовування Т-ДНК [121], можливості трансформування рослинних клітин [21, 122]. Агробактеріальна трансформація зараз розглядається як один з найбільш використовуваних способів для отримання трансгенних рослин з новими ознаками [22, 123].

Дослідження процесу перенесення генів агробактерій з метою його використання у генетичній інженерії визначили, що інфікування рослин можливе і за відсутності генів, що провокують утворення галів. Таке відкриття дало поштовх для конструювання знезброєних векторів та таких,

що несуть гени інтересу. При конструюванні векторів крім цільових генів використовують також селективні гени, за наявності яких проводиться селекційний відбір трансформованих рослин, зокрема, гени стійкості до антибіотиків [124-126], гербіцидів [127-130] та репортерні гени, наявність яких дає можливість визначати трансформовані клітини за специфічним забарвленням (наприклад, ген *gus*) [131-133] або світінням в ультрафіолетових променях (*gfp* ген) [134-136]. Гени стійкості використовують не тільки як селективні для відбору трансгенних ліній, але і як цільові гени для створення сільськогосподарських рослин, стійких до цих сполук [137-139].

Селективні та репортерні гени при генетичній трансформації є допоміжними, оскільки дозволяють здійснювати селективний відбір або візуальне детектування трансформованих рослин [140]. Разом з тим, практичний інтерес становить перенесення до геному рослин інших генів. До них можна віднести гени стійкості до гербіцидів, до хвороб рослин, ті, що надають рослинам стійкості до ураження шкідниками (комахами, червами та ін), гени, що кодують синтез бактеріальних, вірусних антигенів, вторинних метаболітів тощо. Перенесення у процесі трансформації таких генів дає змогу створити нові форми рослин, що відрізняються корисними ознаками.

Вихідним матеріалом для трансформації можуть бути різні тканини рослин, зокрема, частини стебла [141, 142], котиледони [143-146], листові експланти [145, 147-149], бульби [150], зародки [151], калусна тканина [93].

Ефективність трансформації при використанні *A. tumefaciens* може значно варіювати. Факторів, що впливають на цей показник, багато. Ефективність трансформації залежить від виду рослини, що трансформується, від генотипу (сорту), використаної векторної конструкції, типу експланту, складу середовища, умов трансформування [142, 152-154] тощо. Оскільки кінцевою метою трансформації з використанням *A. tumefaciens* є отримання трансгенних рослин, важливим етапом є попереднє розроблення методики регенерації пагонів, що іноді досить утруднене.

З використанням *A. tumefaciens* отримано трансформовані рослини багатьох видів. Зазвичай традиційно трансформують рослини класу Дводольних, які у природних умовах уражаються агробактеріями. Наприклад, отримано трансгенні цінні сільськогосподарські культури: салат [155-156], капуста [157], томат [158], люцерна [159], соя [160], кукурудза [153], цикорій [161-163], соняшник [164-166], а також трансгенні лікарські рослини вітанія снодійна [167], японський перець [168], сальвія [169], рута духмяна [170], полин [171, 172] та інші види рослин.

Разом з тим, знайдено можливість трансформувати і рослини класу Однодольних завдяки оптимізації протоколів трансформації, використанні більш вірулентних штамів або з використанням спеціальних сигнальних сполук [173]. Так, при використанні незрілих зародків та селективного гена стійкості до гербіциду отримано трансгенні рослини пшениці [174], причому іноді автори навіть надають переваги саме такому способу трансформування перед біолістичною трансформацією [175]. Для підвищення ефективності використання агробактерій для трансформації однодольних використовують більш вірулентні штами. Наприклад, з частотою 0.6-9.7% отримано трансгенні рослини *Triticum turgidum* після трансформування штамом AGL1 *A. tumefaciens* з додатковими *vir* генами [176].

Перенесення до геному рослин цільових генів дозволяє створювати рослини, стійкі до біотичних [177, 178] та абіотичних стресових факторів [179, 180], зі зміненим фенотипом [181-183], продуцентів біологічно активних сполук (вторинних метаболітів тощо) [184, 185], рослин, які здатні синтезувати рекомбінантні білки медичного призначення [186, 187], у тому числі такі, що можуть бути використані для імунізації людей та тварин [188, 189].

*A. rhizogenes* – ґрунтова бактерія, що викликає захворювання широкого кола дводольних рослин. Причиною виникнення хвороби є перенесення, стабільна інтеграція в геном рослини-господаря і експресія частини ДНК (Т-ДНК) онкоплазміди pRi бактерії *A. rhizogenes*. *In vitro* «бородаті корені»

мають ряд специфічних рис: інтенсивний гормонезалежний ріст, відсутність позитивного геотропізму, високий ступінь галузнення [190-192]. Найчастіше *A. rhizogenes* використовують для отримання трансгенних коренів та рослин класу дводольних, хоча нині визначено умови, за яких є можливість використання цього виду бактерій для трансформування геному однодольних рослин.

Трансформація за допомогою *A. rhizogenes* є досить зручним способом зміни рослинного геному, адже бактерія може переносити не тільки власну Т-ДНК онкоплазмиди pRi, але і Т-ДНК бінарних векторів з селективними та цільовими генами, що було визначено досить давно [193, 194]. Корені, отримані після трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes*, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, які властиві для тої чи іншої рослини [195-198], причому у трансформованих коренях вміст таких сполук може бути вищий за вміст в коренях нетрансформованих рослин. Так, концентрація полісахаридів в трансгенних коренях *Echinacea purpurea* була вищою, ніж у вихідних рослин [199]. Концентрація вітаноліда (седативної, снодійної та антисептичної речовини) в трансгенних коренях *Withania somnifera* була у 2 рази вищою, ніж у нетрансформованих [200]. Шляхом *A. rhizogenes*–опосередкованої трансформації отримано корені *Glycyrrhiza uralensis* з підвищеним синтезом флавоноїдів [201]. Отже, трансформовані корені є потенційними продуцентами різних сполук, включаючи антиоксиданти [202], алкалоїди [203] та інші вторинні метаболіти [201, 204, 205], фармацевтичні сполуки [206], а також можуть використовуватися для фітореMediaції [207].

Лише протягом останніх трьох років опубліковано результати численних експериментів щодо генетичної трансформації рослин із застосуванням *A. rhizogenes*. Ці бактерії використовували для отримання «бородатих» коренів таких видів рослин як *Isatis tinctoria* [208] з метою отримання біологічно активних сполук (флавоноїдів та антиоксидантів), *Plumbago zeylanica* [209] для синтезу плюмбагіну, *Coffea arabica* з метою

розроблення стратегії захисту рослин від нематоди [210], *Cucumis melo* [2111], *Gentiana macrophylla* [212] та *Saussurea medusa* [213] для синтезу вторинних метаболітів, а також *Nepeta pogonosperma* [214], *Panax ginseng* [215], *Artemisia annua* [216], *Dracocephalum kotschyi* [217], *Beta vulgaris* [218], *Tribulus terrestris* [219], *Calendula officinalis* [220], *Papaver bracteatum* [221], *Linum narbonense* [222], *Clitoria ternatea* [223], *Alpinia galanga* [224], *Siegesbeckea orientalis* [225], *Catharanthus roseus* [226], *Salvia austriaca* [227] тощо.

Отримані після трансформації *A. rhizogenes* «бородаті» корені використовують для дослідження функціонування генів [99, 228, 229], для визначення особливостей взаємодії рослин та мікроорганізмів [179, 230, 231], у фізіологічних дослідженнях [232].

Впливати на процес трансформування та синтезу сполук, які становлять інтерес, можна, використовуючи різні штами агробактерій [233] та застосовуючи еліситори [234]. Перевагою використання культури «бородатих коренів є можливість їх культивування у біореакторах з контрольованими умовами (температура, склад середовища, аерація тощо) [235, 236], що може значно збільшити рівень синтезу цільових сполук та робить технологію їх отримання економічно вигідною.

Більшість з наведених видів рослин, які використовували для трансформування та отримання культури «бородатих» коренів, є лікарськими та у природних умовах синтезують біологічно активні сполуки. Такий вибір об'єктів трансформації не випадковий і пов'язаний саме з тим, що трансгенні корені здатні до накопичення природних біологічно активних сполук. Разом з тим, перенесення до рослин генів, що кодують синтез невластивих сполук, також дозволяє отримувати БАС, що накопичуються у «бородатих» коренях або регенерованих з них рослинах. Наприклад, рослини полуниці різних сортів було трансформовано векторами з геном проінсуліну та визначено біологічну активність рекомбінантної сполуки [188]. Рослини алтеї було використано для трансформування *A. rhizogenes* та отримання трансгенних

коренів, що продукують ціановірин-N, сполуку з активністю проти вірусу імунодефіциту людини [237]. У трансгенних коренях моркви синтезувався інтерферон, який виявляв протівірусну активність [238].

Отже, як показують наведені численні дослідження, використання *A. rhizogenes* та створення «бородатих коренів» дає можливість отримувати сполуки, що синтезуються рослинами у природних умовах, а також рекомбінантні сполуки медичного призначення. Для таких трансформованих коренів властивий швидкий ріст і, таким чином, накопичення біомаси [42]. Крім того, технологія їх культивування *in vitro* є маловитратною, адже трансформовані корені ростуть на «мінімальному» середовищі (без регуляторів росту, зі зменшеним вмістом макро- та мікроелементів), не вимагають освітлення та вирощуються у біореакторах [239-242]. Такі особливості привертають увагу до культури «бородатих коренів» як продуцентів ряду сполук, у тому числі тих, що мають лікувальні властивості.

1.2. Використання генноінженерних підходів для створення трансгенних рослин з корисними ознаками

1.2.1. Стратегії застосування генетичної інженерії для покращення якостей сільськогосподарських культур.

1.2.1.1. Створення рослин, стійких до абіотичних та біотичних стресових факторів. Використання біотехнологічних методів дозволило розробити стратегії створення рослин, які є стійкі до хвороб. Використання таких рослин дає змогу збільшити урожайність сільськогосподарських культур та зменшити витрати при зберіганні продукції. Було розроблено нові підходи до отримання рослин, які не ушкоджуються шкідниками, бактеріальними та вірусними хворобами, визначено гени, які можуть бути використані для створення стійких рослин [243-247].

Нестача вологи, екстремальні температури та засолення ґрунтів є природними стресовими факторами, які найбільше уражують рослини та наносять найбільшої шкоди врожаю сільськогосподарських культур. Тому значна кількість досліджень була спрямована на створення таких рослин, які є стійкими до дії абіотичних стресів. Використання саме стійких рослин дозволяє значно зменшити ушкодження рослин і, таким чином, збільшити врожайність та економічну вигоду від врожаю. Для отримання стійких рослин використовували гени, які регулюють синтез осмолітів, специфічних білків, антиоксидантів, беруть участь у регуляції іонного гомеостазу та ін. [10, 11].

Оскільки різні види абіотичних стресів можуть призводити до накопичення активних форм кисню і далі до оксидативного стресу, є можливим підвищити стійкість рослин шляхом перенесення до їх геному генів, які кодують ферменти з антиоксидантними властивостями, таких як аскорбат, пероксидаза, супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза. Зокрема, отримані ще у 90-х роках минулого сторіччя рослини люцерни, у яких експресувався ген супероксиддисмутази, виявляли підвищену стійкість до дефіциту вологи та заморожування [248]. Було з'ясовано, що LEA білки беруть участь у стійкості рослин до дегідратації, засолення та холодового стресу [229]. Рослини рису, трансформовані геном HVA1, які кодує один з білків цієї групи, набули стійкості до дефіциту вологи та засолення [250]. І нині продовжуються дослідження щодо визначення генів, які відповідають за стійкість рослин до дії абіотичних стресів, та проводяться експерименти з генетичної трансформації для створення рослин, які стійкі до цих негативних впливів. Такі дослідження мають не тільки теоретичний інтерес, але й є підґрунтям до створення нових високопродуктивних та стійких форм сільськогосподарських культур [9, 251, 252].

Аналогічні біотехнологічні дослідження проводяться і у напрямку вивчення стійкості рослин до фітопатогенів, бактеріальних та вірусних інфекцій. Визначено, що суперекспресія гена 3-деокси-7-фосфопептулат



синтази збільшувала стійкість рослин арабідопсису до патогенного гриба роду *Verticillium* [8], а рослини сої, до геному яких було перенесено ген *GmCnx1*, який підвищує активність ферментів нітратредуктази та альдегідоксидази, були стійкіші до фітовірусної інфекції [161]. Стійкими до фітовірусів виявилися також рослини, трансформовані геном *BjCHII* хітінази *Brassica juncea* [253]. Трансформовані рослини томату з геном *Bs2* набули стійкості до ураження фітопатогенними бактеріями *Xanthomonas* [254]. Після перенесення до рослин *Camellia sinensis* гена хітінази I вони набули стійкості до фітопатогенного гриба *Exobasidium vexans* [255], а перенесення до рослин банану іншого гена хітінази призвело до підвищення резистентності, ступінь ураження листків патогеном зменшився до 73-94 % [256].

Отже, результати досліджень, спрямованих на підвищення стійкості рослин до дії біотичних та абіотичних стресових факторів, свідчать про високу ефективність застосування біотехнологічних підходів, а визначення можливих механізмів захисту рослин та генів, які підвищують опір рослин до хвороб та витривалість при дії негативних природних факторів [257-259], дає можливість застосовувати методи генетичної інженерії для створення нових форм рослин та їх впровадження у сільськогосподарське виробництво [260-267].

1.2.1.2. Створення рослин, стійких до гербіцидів. Одним з напрямків практичного застосування генетичної інженерії рослин є створення рослин, стійких до гербіцидів. Потреба в таких рослинах диктується збільшенням використання гербіцидів для боротьби з бур'янами. При створенні гербіцидстійких рослин можуть бути застосовані різні біотехнологічні методи, наприклад, ПЕГ-індукована, агробактеріальна, біолістична трансформація. Цільовий ген може бути вбудований як в ядерну, так і в хлоропластну ДНК. Трансформація хлоропластної ДНК дає можливість запобігти утворенню бур'янів, стійких до гербіцидів. Зокрема, шляхом агробактеріальної трансформації протопластів конструкцією з

модифікованим *bar* геном було отримано рослини томату, тютюну та картоплі. Трансгенні рослини виявилися стійкими до високих доз комерційних гербіцидів фосфінотрицину та біалафосу [268]. Fillatti et al. створено трансформовані рослини томату, стійкі до гліфосату [269]. Mohapatra et al. було створено рослини салату, стійкі до гербіциду біалафосу [270]. Трансформацію здійснювали за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* конструкцією з генами *bar* та *nptII* при селекції на середовищі з канаміцином. Отримано трансгенні рослини, що виявилися стійкими до гербіциду в концентрації 5 мг/л. Ця ознака успадковувалася в наступних поколіннях. Mukhopadhyay et al. [271] застосовували метод методом ПЕГ-індукованої трансформації протопластів. З гіпокотилів рослин капусти при використанні конструкції з *bar* геном завдяки ефективній регенерації (80%) з високою частотою (до 33%) було отримано трансформовані рослини, стійкі до фосфінотрицину. Ці рослини мали нормальну морфологію та були фертильними.

Досить великою є кількість видів рослин, що були об'єктами генетичної трансформації з метою створення стійких до гербіцидів рослин, зокрема, рослини салату [272, 273], цукрової тростини [274], сої [275], томату [276]. Стійкий до фосфінотрицину трансгенний ріпак було отримано в експериментах Nerve et al. [277]. Трансгенні рослини тютюну, томату та картоплі, стійкі до фосфінотрицину, отримано Block [278].

Таким чином, активно розробляється напрямок зі створення трансгенних рослин, стійких до гербіцидів. Нині вирощуються комерційні сорти генетично модифікованих гербіцидстійких рослин сої, кукурудзи, ріпаку, бавовнику, люцерни [17]. Отримання стійких до гербіцидів рослин з трансформованим хлоропластним геномом має переваги, адже таким чином знижуються ризики розповсюдження трансгенів у довкіллі.

1.2.2. Продукування у трансгенних рослинах рекомбінантних сполук з фармацевтичними властивостями та метаболічна інженерія. Одним з важливих напрямків біотехнологічних досліджень є створення трансгенних рослин-продуцентів рекомбінантних сполук медичного призначення, так зване «молекулярне виробництво» (molecular farming) [13]. Першою рекомбінантною фармацевтичною сполукою, синтезованою у рослинах соняшника, був гормон росту [279]. Першими комерціалізованими продуктами, синтезованими у трансгенних рослинах, стали авідин та бета-глюкуронідаза, які накопичувалися у насінні рису [280, 281]. Спрямованість досліджень пов'язана з визначеною можливістю синтезування цих сполук рослинними клітинами, а також тим, що у деяких випадках такі сполуки, синтезовані, зокрема, у клітинах ссавців, потребують додаткового перетворення. Наприклад, ізраїльська компанія Protalix Inc. виробляє фермент глюкоцереброзидазу з трансгенних клітин моркви [14].

Серед напрямків досліджень, спрямованих на «молекулярне виробництво», можна виділити такий, метою якого є продукування у трансгенних рослинах рекомбінантних сполук для їх подальшого виділення та використання у медичних цілях. При цьому створюються трансгенні рослини, що синтезують рекомбінантні білки, наприклад, антигени, цитокіни тощо, а також шляхом перенесення відповідних генів змінюється метаболізм рослин таким чином, що або підвищується рівень накопичення властивих для даного виду рослин сполук, або рослини синтезують невластиві сполуки (метаболічна інженерія). Інший напрямок пов'язаний з використанням для трансформування та перенесення цільових генів таких рослин, які вживаються у їжу без термообробки та можуть стати «їстівними» вакцинами [16, 282-287]. У клітинах рослин з трансформованим геномом можуть синтезуватися білки, які використовуються у харчовій промисловості, наприклад, казеїн та лактальбумін [286], полімери, використовувані у хірургічній практиці [288, 289], гормони, зокрема, соматотропін та ін. [15, 279], фактори росту [290], ферменти (глюкоцереброзидаза, трипсин) [291,

292], цитокіни, у тому числі інтерлейкіни [293-297] та інтерферони [298-304], імуноглобуліни [305], глікопротеїни [306] тощо. У трансгенних рослинах синтезувалися антитіла, зокрема, до вірусу сказу [307], герпесу [308], вірусу Ебола [309], вірусу грипу H5N1 [310], вірусу лихоманки Західного Нілу [311], гепатиту В та С [312-316] та інші [317, 318].

Доведено біологічну активність синтезованих у трансгенних рослинах сполук, наприклад, антигенів [319, 320], потенційну можливість використання для імунізації та лікування, зокрема, грипу [321], туберкульозу [30, 320], вірусу імунодефіциту людини [322], гепатиту В [323], СНІДу [324, 325], вірусів, які уражають тварин [326], сибірки [285].

До геному рослин банану, картоплі, фізалісу, тютюну, томату, арахісу перенесено ген поверхневого антигена вірусу гепатиту В [327-332]. Отримано рослини, які мають гени термолабільної субодиниці В *Escherichia coli* [333], субодиниці В холерного токсину [334, 335], капсидного білка вірусу Норвалк [336-337], онкопротеїна 16E7 папіломавірусу [338]. Клінічними випробуваннями вакцин рослинного походження було визначено безпечність їх застосування та високий рівень імунної відповіді [339, 340]. Об'єктами досліджень являлися рослини тютюну, класичного модельного об'єкту багатьох біотехнологічних робіт [32, 285, 309], а також крім зазначених вище також важливі сільськогосподарські та їстівні культури, наприклад, рослини сої [341], люцерни [342, 343], кукурудзи [344-346], картоплі [347, 348], салату [349, 350], моркви [351-353]. Ряд дослідників використовували таку важливу культуру як рис. Американська біотехнологічна компанія Ventria Bioscience використовували рис для продукування антибактеріальних, противірусних та протигрибкових сполук, зокрема, лактоферин, лізозим, а також сиворотковий альбумін людини [354]. Запропоновано використовувати трансгенний рис як вакцину (MusoRice-СТВ) проти холери [355, 356]. Takagi et al. створили рослини рису з антиалергійними властивостями [357].

1.2.2.1. Антигени *Mycobacterium tuberculosis* та їх накопичення у трансгенних рослинах. Туберкульоз є хворобою, яка займає одне з перших місць за показниками захворюваності та смертності. Одним із засобів боротьби з хворобою є вакцинація, зокрема, вакциною, розробленою ще у 1919 р. Альбертом Кальметт та Камілем Герен (*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG). Разом з тим, визначено, що використання цієї вакцини не завжди є ефективним. Нині розробляються новітні підходи до створення ефективних вакцин проти туберкульозу [358-360, 28]. Серед таких є використання білків *Mycobacterium tuberculosis* - ESAT6, Ag85A, Ag85B, CFP10, 30-kD-секреторного білка, які відсутні у вакцині БЦЖ [361-363]. Визначено, що ці білки є імуногенними та спричинюють появу імунітету проти хвороби. Наприклад, використання антигенів Ag85A та Ag85B *M. tuberculosis* призводило до збільшення концентрації інтерлейкіну ІЛ-2 та  $\gamma$ -інтерферону у імунізованих мишей [364]. Злиті білки Ag85B та ESAT-6 виявляли імуногенність та захисну властивість при інфікуванні мікобактеріями [365, 366]. Застосування білків Ag85B та МРТ64 також було ефективним і призводило до зменшення ураження тканин легенів при мікобактеріальній інфекції [367]. Препарат на основі *Mycobacterium smegmatis*, у яких синтезувався злитий білок ESAT6-CFP10 викликав більшу імунну відповідь у мишей у порівнянні з БЦЖ вакциною [368].

Визначено, що рослини здатні синтезувати рекомбінантні білки мікобактерій, а білки-антигени з *M. tuberculosis* рослинного походження були біологічно активними та індукували антиген-специфічну відповідь [369]. Наприклад, злитий білок CFP10-ESAT6-dIFN експресувався у коренях трансгенних рослин *Daucus carota* та викликав імунну відповідь при тестуванні на мишах як при пероральному застосуванні, так і після ін'єкцій [30]. Для трансформації рослин *Nicotiana tabacum* використовували вектор на основі вірусу Х картоплі. Білок ESAT-6 трансз'являвся у рослинах тютюну у кількості 0.5% - 1% загального розчинного білка [370]. Dorokhov зі співавторами отримали трансгенні рослини *N. benthamiana*, у яких білок Ag85B накопичувався

у кількості 800 мг/кг свіжих листків [29]. У дослідженні [30] показано можливість синтезу у трансгенних рослинах моркви білків ESAT-6 та CFP10 у кількості відповідно 0.056% та 0.002% загального білка. Dedieu та ін. [371] створили рослини трансгенні тютюну що також синтезували антиген Ag85B/ESAT-6.

1.2.2.2. Синтезування інтерферонів у клітинах трансгенних рослин. Інтерферони (ІФН) - білки, що мають неспецифічну протівірусну активність. Їх біологічна активність обумовлена природним призначенням захищати організм від різних патогенів: вірусів, бактерій, найпростіших, чужорідних клітин та ін. Всі клітини організму (крім тромбоцитів і еритроцитів) несуть рецептори до ІФН і можуть виробляти ці білки у відповідь на відповідні індуктори. Поряд з надзвичайно високою питомою антивірусною активністю, в організмі людини ІФН активно залучені в контроль імунної системи і клітинного гомеостазу: вони активують всі ланки специфічного і неспецифічного імунітету: активують природні кілери і макрофаги, стимулюють експресію антигенів гістосумісності і активують дендритні клітини, стимулюють проліферацію Т-клітин пам'яті і активність Т-клітинних ефektorів; ІФН посилюють експресію рецепторів гормонів, регулюють продукцію ряду цитокінів та експресію їх рецепторів, стимулюють диференціювання і контролюють проліферативний потенціал клітин, обмежують вогнища запалення і пригнічують пухлинний ангіогенез.

Інтерферони мають виражену протипухлинну активність, обумовлену їх поліпотентною дією як на організм, так і на пухлинні клітини. Вони пригнічують канцерогенез, індукований різними агентами, інгібують проліферацію і метастазування пухлинних клітин, пригнічують в них експресію онкогенів і підсилюють апоптоз, пригнічують ангіогенез у пухлинній тканині і підвищують її чутливість до терапевтичних впливів. Тому інтерферонотерапія не випадково все частіше застосовується в лікуванні хворих на злоякісні новоутворення в різних режимах - як в режимі

монотерапії, так і при комбінованому лікуванні [35, 36, 372, 373]. Родина інтерферонів представлена трьома типами - ІФН I, II і III типу. Інтерферон I типу людини включає серію білків-субтипів ІФН, основними з яких є ІФН-альфа та -бета. У більшості випадків ІФН мають видову специфічність, тобто проявляють антивірусну активність лише в гомологічних клітинах, однак деякі субтипи ІФН виявляють і міжвидову активність [374].

У 80-роках минулого століття рослини з геном інтреферонів створювалися з метою захисту рослин від фітовірусів [375-377]. Пізніше були зроблені спроби перенесення генів ІФН людини в клітини рослин не тільки як факторів противірусного захисту рослин, але і як альтернативу синтезу цього білка в бактеріальних системах. Так, для цієї мети використовували рослини тютюну [378], картоплі [379], рису [32], моркви [33], ряски [34], алое [304], гарбуза [380], причому рекомбінантний ІФН, синтезований у рослинах, виявляв біологічну активність [381]. Вивчення біотехнологічних аспектів продукції повноцінного біологічно активного ІФН продемонструвало переваги напрацювання цього цитокіну в рослинах, які виражаються не тільки в якості білка, але в економічності його виробництва. Разом з тим, триває пошук рослин, в клітинах яких можна отримати найбільш високий рівень синтезу біоактивного ІФН, а також способів трансгенезу – введення генів ІФН до складу ядерної або хлоропластної ДНК за допомогою різних методів і векторів. Залишається також недостатньо вивченою біологічна активність ІФН, синтезованого у клітинах рослин різних видів та по відношенню до різних типів клітин, а також її збереження при проходженні шлунково-кишкового тракту та багато інших аспектів.

Отже, доведено, що гени, які кодують синтез біологічно активних сполук, зокрема, антигенів бактеріальних чи вірусних патогенів, цитокінів та ін., можуть експресуватися в клітинах рослин. При цьому синтезовані антигени зберігають свої імуномодулюючі властивості, а трансгенні рослини можуть слугувати лікувальними і профілактичними засобами або як джерело цільових рекомбінантних сполук. Такі рослини можуть бути використані для

продукування фармакологічно активних білків, включаючи антитіла, гормони та ін. Разом з тим, постає і питання щодо можливих ризиків при синтезуванні у рослинах таких рекомбінантних сполук, зокрема, щодо необхідності додаткових клінічних випробувань, а також стосовно включення трансгенних рослин - продуцентів фармацевтичних білків у природні харчові ланцюги, розповсюдження трансгенів, у тому числі генів стійкості до гербіцидів, при запиленні дикоростучих рослин, а також перенесення генів стійкості до антибіотиків до природної мікрофлори [382].

Дослідження показали, що у експериментах з генетичної трансформації для отримання рослин, які синтезують рекомбінантні білки, важливим етапом є вибір об'єкту, оскільки ефективність трансформації та рівень накопичення цільового продукту часто є видоспецифічними. Для підвищення ефективності трансформування та синтезу рекомбінантних білків, зниження собівартості кінцевого продукту рослини мають відповідати ряду умов. Мають бути розроблені ефективні методики мікроклонального розмноження та генетичної трансформації. Рослини повинні відрізнятися достатньо швидким приростом біомаси та високим рівнем накопичення загального білка, оскільки зазвичай при перенесенні цільових генів до ядерної ДНК рівень синтезу рекомбінантних білків досить малий. Так, білок СТВ субодиниці В *V. cholerae* накопичувався у кількості 0,58-0,91% від загального розчинного білка [383], білок ТСПА-СТВ холерного вібріону становив 0,11% [384].

1.2.3. Вміст природних біологічно активних сполук у клітинах рослин після трансформації.

1.2.3.1. Фруктани, їх біологічні функції та накопичення у трансгенних рослинах і коренях. Загальна характеристика фруктанів. Фруктани – полісахариди, молекула яких побудована із залишків D-фруктози. Ці запасні сполуки синтезуються численними рослинами, зеленими водоростями, бактеріями. Фруктани розрізняються за молекулярною будовою у відповідності до ступеню полімеризації,



розгалуженості та типу зв'язків між залишками фруктози та діляться на три головні типи – сполуки типу інуліну, типу левану та розгалужені сполуки, основою яких є відповідно трисахариди ізокестози, 6-кестози та неокестози (рис.1.1). У фруктанів типу інуліну залишки фруктози з'єднуються  $\beta$ -(2-1) зв'язками [385], а у леванів –  $\beta$ -(2-6) [386] зв'язками. У розгалужених фруктанів є обидва типи зв'язків [387]. Інулін – (від лат. *inula* — оман),  $(C_6H_{10}O_5)_n$  — високомолекулярний фруктан, що є полімером D-фруктози, молекули якої з'єднані між собою 1,2-глюкозидними зв'язками та мають термінальну молекулу глюкози [388]. Інулін солодкий на смак, добре розчиняється в гарячій воді.

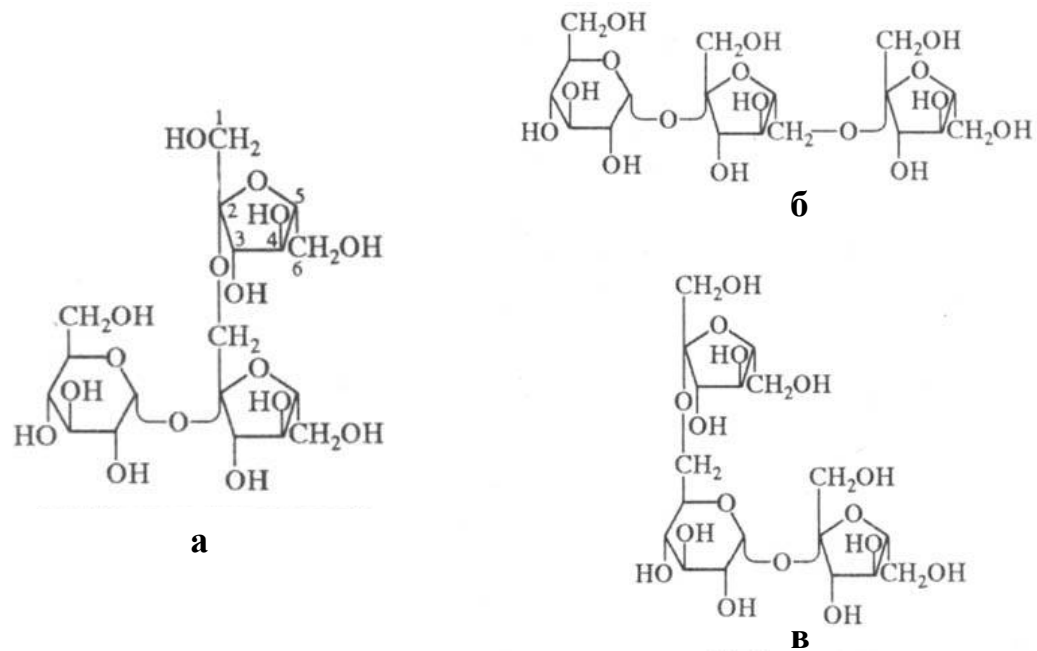


Рис. 1.1 – Будова молекул трисахаридів ізокестози (а), 6-кестози (б) та неокестози (в)

Як правило, фруктани типу інуліну зустрічаються у рослин класу дводольних (наприклад, *Cichorium intybus*, *Inula helenium*, *Taraxacum officinalis*, *Helianthus tuberosus*) та у деяких однодольних, а у більшості холодостійких трав синтезуються фруктани всіх трьох типів, хоча вміст та структура цих сполук, суттєво різняться [389-391]. В основному інулін отримують з цикорію [392], який культивують в Бельгії та Голландії. На

світовому ринку промисловими виробниками є бельгійські компанії Veneo-Orafti та Cosucra і голандська компанія Sensus. Останнім часом зростає виробництво інуліну, особливо з топінамбуру, в Китаї (компанії Shandong Baolingbao Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou Zeyu Biotechnology Co. Ltd , Shanghai Winway Biotech Co. Ltd.

*In vivo* біосинтез фруктанів відбувається у вакуолях клітин [393]. Рослини класу дводольних родини Asteraceae *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus* синтезують фруктани з  $\beta$ -(2-1) зв'язками типу інуліну з різною кількістю фруктозних залишків (в основному 10-60). У рослини *Cynara scolymus* молекула значно довша - до 200 залишків фруктози [394]. Фруктани рослин класу однодольних відрізняються за молекулярною будовою. Наприклад, у рослин родини Poaceae синтезується лінійний леван [395], в той час як у *Triticum aestivum* та *Hordeum vulgare* знайдено розгалужені молекули фруктанів з  $\beta$ -(2-6) та  $\beta$ -(2-1) зв'язками [396]. Рослини *Allium cepa* та *Asparagus officinalis* синтезують неоінулін [397]. У рослин роду *Agave* синтезуються фруктоолігосахариди, інулін, неоінулін, розгалужені фруктани [398].

Біологічна роль фруктанів. Фруктани є запасним полісахаридом у рослинних та бактеріальних клітинах. Разом з тим, вони відіграють роль осморегуляторів та антифризів. Завдяки наявності механізмів синтезу, зміни ступеню полімеризації та гідролізу фруктани беруть участь у пристосуванні (стійкості) рослин до стресових факторів, зокрема, низьких температур, нестачі вологи [399-401]. Участь фруктанів у холодостійкості рослин було підтверджено, зокрема, при вивченні стійкості трансгенних рослин, здатних синтезувати фруктани, до абіотичних стресів [402-406].

Концентрація інуліну в рослинах варіює. Так, у різних сортів *Allium cepa* кількість інуліну становить 0,8 – 31, *Helianthus tuberosum* – 16-20, *Asparagus officinalis* 1,4-3, *Cynara scolymus* 2,8-6,8, *Triticum sp.* – 0,2 – 4, *Hordeum vulgare* – 0,1 – 1, *Taraxacum officinale* – 8 -15, *Cichorium intybus* -35-

47 г на 100 г маси [407]. Вміст фруктанів та ступінь полімеризації залежить від наявності азоту, умов вирощування та зберігання [408].

Синтез фруктанів відбувається також при культивуванні рослин в умовах *in vitro*. Так, концентрація інуліну в коренях цикорію в культурі *in vitro* була вищою, ніж вміст інуліну в коренях рослин, що вирощувалися *in vivo* [409].

1.2.3.2. Використання фруктанів. Хімічні, біохімічні властивості фруктанів відкривають численні напрямки для використання цих сполук. Вони знаходять застосування у харчовій промисловості та у медицині, але фактично тільки інулін виробляється у великих об'ємах. Інулін є технологічним інгредієнтом у виробництві морозива, молочних продуктів, кондитерських виробів. Інулін має низьку калорійність (1,5 ккал/г) та використовується у виробництві спеціальних продуктів харчування. Фруктани використовують як дієтичну добавку при порушеннях вуглеводного обміну, а також як лікувальний засіб при дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях та ін. [410, 411]. Інулін є повноцінним замінником глюкози, позитивно впливаючи на обмін речовин. Він має гіпоглікемізуючий ефект, знижуючи рівень цукру, суттєво знижує вміст холестерину та тригліцеридів у крові хворих на діабет [412-415].

Оскільки фруктани не перетравлюються у шлунку, їх називають харчовими волокнами. Інулін виступає в якості сорбента, що сприяє виведенню токсичних речовин зі шлунково-кишкового тракту [416]. В медичній практиці препарати інуліну використовують також як пребіотик, оскільки інулін сприяє росту корисної мікрофлори кишечника – лакто- та біфідобактерій [416, 417]. Таким позитивним ефектом особливо відрізняються коротколанцюгові фруктани [418]. Встановлено, що фруктани можуть застосовуватися як допоміжний засіб при лікуванні деяких форм онкологічних захворювань [419-423]. Застосування інуліну сприяє нормалізації обміну кальцію та магнію [424], а також ліпідів [425]. Завдяки

останній властивості інулін використовують як дієтичну харчову добавку у раціоні хворих зі збільшеною вагою.

1.2.3.3. Трансгенні рослини, що синтезують фруктани. Дослідження синтезу фруктанів на молекулярному рівні становлять як теоретичний, так і практичний інтерес [426]. Вивчено поліморфізм 6-SFT генів у 21 виду рослин [427]. Показано, що експресія генів 6-SFT залежить від сахарози [428]. Клонування генів, що кодують фруктозилтрансферази та екзогідролази, дає можливість не тільки вивчати механізмів біосинтезу фруктанів, але і методами генетичної інженерії створювати модифіковані рослини, що продукують ці сполуки.

Шляхом генетичної трансформації можна цілеспрямовано змінити метаболізм тих рослин, яким не властивий синтез фруктанів, та створити рослини – продуценти цих сполук. Такі експерименти базуються на попередньому вивченні молекулярних основ біосинтезу фруктанів та клонуванні генів, які відповідають за синтез. Отримання модифікованих рослин, що синтезують фруктан, дає можливість не тільки розширити перелік видів рослин – біосинтетиків фруктанів, але й підтвердити раніше висловлені припущення щодо ролі та біологічних функцій фруктанів у рослинах. Так, встановлено, що трансгенні фруктансинтезуючі рослини тютюну набули стійкості до посухи [429], а трансформовані рослини райграсу стали більш стійкими до замерзання, ніж вихідні [430].

Модифіковані рослини, що синтезують фруктани, отримують шляхом вбудовування бактеріальних або рослинних генів, які кодують біосинтез цих сполук. При створенні конструкції для трансформації використовують конститутивні або органоспецифічні промотори. Місцем локалізації цільового продукту можуть бути вакуолі, апопласт, пластиди. Так, за використання бактеріальних генів (з *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Erwinia amylovora*) створено трансгенні рослини тютюну [431], картоплі [432], кукурудзи [433], цукрового буряку [434]. Вміст фруктанів в цих рослинах

коливався у досить широких межах та становив від 1 мг/г у буряка до 160 мг/г в рослинах картоплі [435]. З використанням генів 1-SFT, 1-FFT рослинного походження створено трансформовані рослини тютюну [436], картоплі [437], цикорію [438], петунії [439], цукрового буряка [440], тритікале [441]. Отже, шляхом введення в рослинний геном генів, що відповідають за синтез фруктанів, можна отримати рослини з поліпшеними властивостями (стійкі до абіотичних стресових факторів), які також є новим продуцентом комерційного продукту.

Вивчення особливостей метаболізму фруктанів проводилось ще у 70-90 роках минулого століття. Разом з тим, цей напрямок досліджень і досі є актуальним, зважаючи, зокрема, на роль фруктанів у реакціях пристосування рослин до факторів оточуючого середовища. Фруктани використовуються у промисловості як сировина для отримання фруктози та полімерних матеріалів, що піддаються біодеструкції. Ці сполуки знаходять застосування у харчовій та медичній промисловості. Останнім часом увага дослідників спрямована на вивчення лікувальних властивостей цих сполук, адже лікарські засоби та біологічно активні добавки на основі фруктанів (інуліну) є комерційними продуктами. Крім того, виходячи зі світової тенденції до здорового харчування, використання фруктанів у дієтичних продуктах є актуальним для людей зі збільшеною масою тіла. Новий поштовх дослідження фруктанів отримали після розроблення та впровадження методів створення модифікованих рослин. На основі вивчення механізмів регуляції біосинтезу фруктанів з використанням методів генетичної інженерії створюються рослини, що продукують фруктани та є стійкими до абіотичних стресових факторів. Світовий ринок фруктанів досі ненасичений та може бути поповнений завдяки впровадженню новітніх біотехнологій.

Таким чином, результати описаних вище досліджень показують, що застосування біотехнологічних підходів для створення рослин з новими властивостями має великі перспективи. Визначено можливість шляхом генетичної трансформації з використанням бактерій *A. tumefaciens* та

*A. rhizogenes* підвищити рівень накопичення сполук, які синтезуються у рослинах за природних умов, а також можливість синтезу в культурі коренів та в трансгенних рослинах рекомбінантних протеїнів. Вирощування біотехнологічних рослин-суперпродуцентів БАС дає змогу одержувати гарантовано чисту сировину, що є важливим, зважаючи на дедалі більше забруднення довкілля. Зберігаються також природні популяції рослин, що є вкрай актуальним стосовно рідкісних та зникаючих видів. Трансгенні рослини, включаючи їстівні та лікарські, вважають гідною альтернативою для синтезу БАС та створення вакцин. Прогрес у розумінні молекулярної біології рослин, розширення можливостей генної інженерії сприяли розробленню підходів для високоефективної експресії вакцинних антигенів у рослинах. Упродовж останніх 10–15 років у клітинах рослин синтезовано понад 100 рекомбінантних протеїнів [442-447]. Нині вважають, що білки, синтезовані у рослинах, можуть мати вихід на ринок лікарських засобів. Одним з прикладів впровадження досягнень біотехнологій є розроблення фірмою Bioplex системи синтезу інтерферону в промислових масштабах у трансгенних рослинах ряски [34, 448]. Серед рослин родини складноцвітих увагу привертають їстівні рослини *Lactuca sativa* та *Cichorium intybus*, для яких показано можливість ефективного синтезу рекомбінантних протеїнів, наприклад із використанням рослин салату для одержання рослинної сировини для вакцини проти чуми [449]. Розроблення технологій одержання рекомбінантних протеїнів, що продукуються у рослинах, може набути застосування у медицині та ветеринарії для створення «рослинних» ліків для профілактики і лікування низки захворювань. Разом з тим, досі практично не досліджено можливість одночасного накопичення у трансформованих рослинах природних для даного виду сполук з біологічною активністю та рекомбінантних БАС сполук, які синтезуються відповідно до перенесених генів. Визначення такої можливості дає змогу отримувати одночасно з трансгенних рослин не одні, а декілька сполук з біологічною активністю, що може здешевити виробництво цільових БАС.

1.2.3.4. Використання генетичної трансформації для підвищення рівня акумулювання артемізиніну у рослинах. Артемізинін, відомий у Китаї дуже давно під назвою *qinghaosu*, – вторинний метаболіт, сесквітерпеновий лактон, що екстрагується у рослин роду *Artemisia*. Підвищений інтерес до артемізиніну пов'язаний із високою ефективністю цієї сполуки у лікуванні малярії [450] на противагу раніше та й нині застосовуваним лікам на основі хініну, хоча монотерапія препаратом може призводити до виникнення стійких форм плазмодія [451-452]. Хініни мають низку протипоказань, побічних ефектів і є неефективними проти деяких видів малярійних плазмодіїв (наприклад, *Plasmodium falciparum* є резистентним до препаратів групи 4-амінохінолонів). Механізм протималярійного ефекту артемізиніну та його похідних досі точно не встановлено. Вірогідно, це відбувається шляхом активації процесів перекисного окислення та пошкодження вільними радикалами клітинних мембран та білків, або існують і інші механізми [453, 454].

Останнім часом з'явилися дослідження щодо можливості застосування артемізиніну для лікування онкозахворювань [455-458].

Артемізинін накопичується у природних умовах у трихомах рослин [459]. Вміст у рослин різних видів варіює, зокрема, у *A. annua* становить від 0.01% до 1.4% [460, 461]. Сполуку отримують з рослин *A. annua*, вирощених у польових умовах. Продуктивність становить 5 кг сполуки з 1000 кг сухих листків з 1 га площі [462], однак такий спосіб отримання сполуки не є оптимальним, оскільки вимагає значних земельних ділянок, «урожайність» залежить від численних природних факторів. Тому увагу привертає застосування біотехнологічних методів для вирішення проблеми синтезу сполуки. Нині розроблено систему синтезу артемізиніну у трансгенних мікроорганізмах. Так, можливий синтез у *Escherichia coli* [463] або у дріжджах [464], оскільки визначено гени, які беруть участь у біохімічному ланцюгу синтезу. Так, ген цитохром P450 монооксидази *CYP71AV1* каталізує всі три кроки окислення, необхідні для перетворення аморфадієна у

артемізинову кислоту. Таким чином, можуть бути створені трансгенні штами *Saccharomyces cerevisiae* з генами аморфадієнсинази *A. annua* або *CYP71AV1*, які синтезують артемізинову кислоту у кількості до 100 мг/л [465].

Методи генетичної інженерії дозволяють підвищити рівень синтезу артемізиніну у рослинах. В одному з перших експериментів з одержання культури трансгенних коренів Chen та ін. [466] перенесли до рослин *Artemisia annua* химерний ген фарнезил дифосфатсинтази (*FDS*) і виявили відмінності у швидкості росту ліній трансгенних коренів, а також накопичення артемізиніну— 2–3 мг/г сухої маси коренів. З використанням *A. tumefaciens* отримано трансгенні рослини, які синтезували та накопичували артемізинін у кількості 10 мг/г маси, що у 2–3 рази перевищувало вміст сполуки в контрольних рослинах [467]. У трансгенних рослинах, одержаних Nan та ін. [468], артемізинін накопичувався в кількості до 0,9% сухої маси, що, за даними авторів, на 34,4% більше, ніж у контролі. Vanuai та ін. [469] також отримали трансгенні рослини, у яких синтез артемізиніну підвищився у 2,5–3,6 рази порівняно з контролем залежно від застосовуваного для трансформації вектора. У трансгенних рослинах *A. annua* перенесення гена *ipt* ізопентилтрансферази призводило до збільшення вмісту цитокінінів і, відповідно, хлорофілів, що опосередковано спричинювало зростання вмісту артемізиніну у трансгенних рослинах до 70% [470]. Підвищення синтезу артемізиніну також спостерігали після трансформації рослин полину генами *HMG-CoA* [471], бета-каріофілленсинтази [472], *ADS*, *CYP71AV1* і *CPR* [172], *HMGR* та *FPS* [473].

Отже, артемізинін є біологічно активною сполукою, використання якої є важливим при лікуванні тяжких захворювань. Синтез сполуки можливий у природно вирощуваних рослинах полину, а також у генно-інженерних мікроорганізмах та рослинах. Використання культури трансгенних коренів для отримання сполуки може мати перспективи, оскільки у рослинах та їх коренях синтезується саме артемізинін, а не його попередник, як у



мікроорганізмах Тому отримання високопродуктивних ліній дозволить при їх вирощуванні у біореакторах отримувати цінну сполуку для її застосування у медицині.

### 1.3. Їстівні рослини та їх використання у генетичній інженерії

1.3.1. Рослини *Cichorium intybus*. Цикорій *Cichorium intybus* L. – дворічна рослина родини Asteraceae. Цикорій культивується у країнах Європи (Бельгія, Німеччина, Франція), у США, Південній Америці, Індії. Значний інтерес до цієї культури пов'язаний з тим, що цикорій є не тільки харчовою культурою, але є сировиною для харчової промисловості. Рослина має лікувальні властивості. Це зумовлено наявністю таких речовин як інулін, кумарини, флавоноїди, вітаміни та ін. [474]. Цикорій є противиразковим, протизапальним, кардіотонічним, діуретичним засобом та застосовується при лікуванні діабету, СНІДу, пухлин, тахікардії та інших хвороб [475-477]. Екстракти з цикорію виявляли антигепатотоксичний ефект, попереджуючи пошкодження печінки  $CCl_4$  [478, 479], розглядаються як можливий протималарійний засіб проти *Plasmodium falciparum* [480]. Виявлено також протимікробну активність екстрактів з цикорію [481, 482]. Важливою властивістю цикорію є синтез фруктозовмісних сполук, зокрема, інуліну, та використання рослини у комплексному лікуванні діабету [483]. Відповідно до останніх досліджень, рослини мають також імуномодельюючі властивості [484], можуть використовуватися для лікування атеросклерозу [485]. Продемонстровано УФ-протекторну активність екстрактів [486]. На основі цикорію створено ряд лікарських препаратів, зокрема, ЛІВ 52. Виходячи з таких властивостей рослин цього виду, зрозумілим є інтерес до використання цикорію в якості об'єкту генетичної інженерії.

Для рослин цикорію розроблено методики регенерації, що дають можливість отримувати максимальну кількість пагонів з рослинних експлантів, причому ними можуть слугувати корені, листки, стеблові

бруньки, корені тощо [487-490]. Незважаючи на перспективність використання рослин цикорію у біотехнологія, досі коло досліджень з генетичної трансформації є обмеженим. Було визначено, трансформування цикорію може бути здійснено як за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* [491-493], так і *Agrobacterium tumefaciens* [438, 494-497]. Разом з тим, оскільки цикорій вживається в їжу без термообробки у вигляді салатів, ця рослина може бути об'єктом генетичної трансформації з метою створення на її основі так званих «їстівних» вакцин. Генетично модифіковані рослини цикорію, так само як і салату-латуку, можуть бути використані для продукування фармакологічно активних білків.

1.3.2. Рослини *Lactuca sativa*. Салат-латук (*Lactuca sativa* L., родина Compositae) вважається найдавнішим з видів салату, що культивується. Його батьківщиною є Середземномор'я, в Україні вирощується з XVII ст. Розрізняють різновидності салату – листовий *L. sativa* L. var. *crispa* L., головчастий *L. sativa* L. var. *capitata* L. та салат-ромен *L. sativa* L. var. *longifolia* Lam. Листя салату містить вітаміни групи В, РР, К, Е, каротин, фолієву кислоту. Ця культура багата на солі кальцію, калію, заліза, органічні кислоти, цукри, клітковину, мікроелементи мідь, бор, йод, отже, салат є цінною харчовою культурою [498].

Численні експерименти з культивування салату *in vitro* було спрямовано на розробку методик мікророзмноження, що включали вивчення процесу калусоутворення та регенерації, оптимізації умов виділення та культивування ізольованих протопластів, соматичної гібридизації, генетичної трансформації. Перші роботи, які були розпочаті у 70-х роках минулого століття, стосувалися визначення складу живильних середовищ, впливу регуляторів росту на утворення калунової тканини та регенерації рослин з різних експлантів. Так, було досліджено вплив етилену на формування калусної тканини та трахеїд [499]; вивчено вплив різних регуляторів росту (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота,

феноксібутанолова та феноксіпропанолова кислоти) на соматичний ембріогенез [500], вплив кокосового молока на органогенез з калусу [501].

Оптимізація умов регенерації рослин завжди становить інтерес, адже наявність ефективних методів отримання рослин з калусної та суспензійної культури або з різних типів рослинних експлантів (листоків, стебел, коренів) дає можливість протягом короткого терміну отримувати велику кількість рослин, мультиплікувати рослини з цінним генотипом. Досліджено процеси утворення соматичних ембріодів [502], регенерації рослин з суспензійної культури [503]. Ефективну методику прямої регенерації рослин з суспензійної культури запропонували Teng et al. [504]. На середовищі, що містило макроелементи середовища SH (Schenk and Hilderbrandt), 0.44  $\mu\text{M}$  бензиладеніну та 0.54  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти, автори отримали регенеровані рослини салату вже за 2 тижні.

Показано, що генотип має суттєвий вплив на утворення калусної тканини та регенерації. Зокрема, Zhang et al. вивчали регенерацію рослин різних сортів салату (Greenfields, Summer Gem, Bronze Mignonette, Green Mignonette, Salad Bowl, Cos, Green) на середовищі SH з 0.1 мг/л індолілоцтової кислоти, 0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л зеатину та виявили сортозалежність частоти регенерації [505]. 22 сорти салату були перевірені на можливість регенерації рослин при використанні фітогормонів зеатину, кінетину та індолілоцтової кислоти, виявлено високу регенераційну здатність сортів Bambino, Iceberg, Cobham Green, Sweet Butter, Simpson Elite, Rosalita, Paris White [506]. Нами досліджено здатність до регенерації рослин салату 8 сортів та показано суттєві відмінності частоти регенерації (від 98% для сорту Гренада до 5% для сорту Майская королева) за однакових умов культивування [507].

Розроблення методів культивування тканин та регенерації рослин *in vitro*, які базуються на феномені тотипотентності рослинних клітин, відкрило широкі перспективи для розвитку нового напрямку біотехнології – генетичної трансформації. Якщо 40 років тому єдиним шляхом створення

нових сортів салату з поліпшеними властивостями були методи традиційної селекції, то завдяки значним успіхам генетичної інженерії нині стало можливим спрямоване конструювання в культурі *in vitro* рослин з потрібними ознаками. Ще 1987 року було здійснено експерименти з трансформації салату-латуку за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* Ti-плазмідом з геном стійкості до канаміцину [508].

Частота трансформації залежить від ряду факторів: генотипу рослин, які трансформують; типу експланту; використовуваної конструкції; методики трансформації. Залежність частоти трансформації від генотипу пов'язана з різною здатністю сортів салату до регенерації: чим більша здатність до регенерації, тим більша вірогідність отримання трансформованих рослин. Експериментально доведено, що вибір об'єкту (сортів) суттєво впливає на результат – отримання трансформованих рослин. Разом з тим, незважаючи на виявлену сортозалежність, показано, що за певної оптимізації методики є можливим отримання трансгенних рослин різних сортів салату [509]. Оскільки різні експланти (листки, стебла, сім'ядолі, калус та ін.) відрізняються за здатністю до регенерації рослин, при трансформації важливим є також вибір типу експланту. Застосування методу прямої регенерації пагонів з сім'ядольних листків салату дозволяє підвищити ефективність трансформації та значно скоротити час, що необхідний для отримання трансформованих рослин. Такий підхід було застосовано, зокрема, Enomoto et al. [510], причому ефективність трансформації при застосуванні прямої регенерації пагонів з котиледонів виявилася вищою у порівнянні з регенерацією з калусної тканини.

Спостерігаються відмінності частоти регенерації трансформованих рослин при введенні до клітин різних генів. Наприклад, методом агробактеріальної трансформації векторами з генами *gus* та *etr1* отримано рослини салату двох сортів [511]. При трансформації конструкцією з *gus*-геном ефективність становила 85 %, в той час як при використанні гену

*etr1* відсоток калусних клонів з регенерованими пагонами дорівнював лише 2,86, оскільки ген *etr1* інгібував процес формування пагонів та стимулював ріст коренів.

З'ясовано, що трансгени в рослинах салату успадковуються як доміантна ознака. В поколінні  $T_1$  відбувається розщеплення за ознакою, що кодується внесеним геном, у співвідношенні 3:1, що свідчить про те, що трансген знаходиться в одній хромосомі [512]. Разом з тим, при вбудовуванні гена у декілька хромосом розщеплення може бути іншим. Можливим також є успадкування трансгена усіма рослинами поколінь  $T_1$  та  $T_2$  (відсутність розщеплення), що може відбуватися внаслідок отримання гомозиготних трансформованих ліній або внаслідок явища апоміксису, характерного для салату

Трансгенні рослини можуть не відрізнятися за зовнішнім виглядом, швидкістю росту, утворенням насіння від вихідних рослин. Наприклад, детальне вивчення таких ознак як фертильність та розмір пилку, зав'язування насіння, дозрівання, ріст проростків при різній температурі, склад екстрактів з листків не виявило суттєвих відмінностей у трансгенних та нетрансформованих рослин [513]. Разом з тим, трансформування може також впливати на ріст рослин та фенотип рослин [514, 515].

Використання методів генетичної інженерії відкриває перспективи цілеспрямованого перенесення генів, що дає можливість поліпшення сільськогосподарських рослин. Головною метою експериментів з трансформування геному будь-яких рослин є створення таких, які мають певні корисні ознаки. Такими є, зокрема, стійкість до абіотичних факторів (температура, сольовий стрес), гербіцидів, бактеріальних і вірусних хвороб, синтезування білків медичного призначення тощо. Методом агробактеріальної трансформації отримані трансгенні рослини салату, стійкі до гербіцидів [516, 517]. Трансформацію здійснювали за допомогою *A. tumefaciens* конструкцією з генами *bar* та *nptII*; ознака гербіцидрезистентності успадковувалася в наступних поколіннях.

Ряд досліджень стосувався створення рослин салату, що є стійкими до таких абіотичних факторів, як водний дефіцит, знижені температури. Методом агробактеріальної трансформації отримано рослини салату сорту Chongchima, стійкі до холодowego стресу [512], ефективність трансформації виявилася не дуже високою і становила 10.8%. Після агробактеріальної трансформації отримано рослини салату, що мали підвищену стійкість до сольового стресу та дефіциту вологи [514]. Трансгенні рослини при культивуванні в гідропонній культурі з 100 мМ NaCl у десять разів перевищували контрольні рослини за висотою та масою.

Створення рослин з підвищеною загальною продуктивністю досягається, зокрема, вбудовуванням в рослинний геном генів фітохромів, генів, які контролюють синтез фітогормонів та ін. Для отримання рослин, що відрізняються кращим ростом, було трансформовано салат сорту Cortina геном *asnA*, що кодує синтез аспарагінсинтетази А з *E. coli*. Трансформовані рослини відрізнялися більшою кількістю листків, які мали також збільшену площу і вагу, причому ці ознаки зберігалися в наступних поколіннях [515]. Агробактеріальна трансформація була використана для одержання рослин салату, що синтезують білок феритин [518]. Трансформовані рослини вже на ранній стадії розвитку швидше росли, їх вага перевищувала вагу контрольних на 27–42%. Інтродукція в геном салату гена *ipt* значно затримувала старіння листків, причому трансгенні рослини мали нормальну морфологію та не відрізнялися від контрольних за розміром і вагою голівок [519].

Уведення чужорідних генів до геному рослин салату може збільшувати синтез природних вторинних метаболітів або призводити до утворення таких метаболітів, що не властиві для рослин цього виду (наприклад, для поліпшення смакових якостей). Зокрема, виявилось, що в листках трансгенного салату з геном аспарагінсинтетази А концентрація інуліну була збільшена у 30 разів [520]. Такі рослини становлять інтерес як

продуценти коротколанцюгового інуліну та як селекційний матеріал. Створено трансгенний салат, який продукує глікопротеїд міракулін (модифікатор смаку) [521] та білок монеллін (замінник цукру) [522].

Методи генетичної інженерії можуть бути використані для створення рослин салату, які не вражаються вірусними хворобами та шкідниками. За допомогою кокультивування листових експлантів з *A. tumefaciens* в рослини салату було інтродуковано ген стікості до вірусу мозаїки салату (LMV) [523]. Ahmed et al. [156] шляхом агробактеріальної трансформації отримали рослини з геном *pta*, що надає рослинам стійкості до ушкодження попелицями.

Створено трансгенні рослини салату, що можуть бути використані як їстівні вакцини проти вірусу гепатиту В [524], для лікування ентеритів [525, 526], як протихолерні вакцини [527]. Продемонстровано можливість транз'єнтної експресії гена інтерферону в рослинах салату [528, 529]. Нами шляхом трансформування за допомогою *A. tumefaciens* отримано салат з генами *esxA* та *esxA - fbpBΔTMD* туберкульозних антигенів ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD) [530]. Частота трансформації сім'ядольних експлантів з рослин сорту Єралаш становила 62% при трансформації агробактерією з генетичною конструкцією pCB063 (ген *esxA*) і 44% при трансформації конструкцією pCB064 (ген *esxA - fbpBΔTMD*). Для сортів Рубінове мереживо та Сніжинка, що трансформували конструкцією pCB064, ці показники склали відповідно 32 % і 18 %. Отримані рослини не відрізнялися від контрольних, регенерували та укорінювалися на середовищі з канаміцином.

Рослини салату – це один із потенційних об'єктів для створення «їстівних» вакцин, оскільки їх використовують без термообробки. Останнім часом опубліковано результати низки досліджень із застосуванням цих рослин для експресії перенесених генів мікробного, вірусного і тваринного походження. Так, Liu та ін. [531] повідомили про одержання з використанням гена, який кодує H1N1 поверхневий протеїн, генно-інженерних рослин, що синтезували білок нейрамідідазу штаму H1N1 вірусу грипу в концентрації

0.018–0.045% від загального протеїну. Імунізовані екстрактами із трансгенних рослин салату тварини виявили імунну відповідь проти НА-антигену. Автори визначили трансгенні рослини як безпечну та економічну систему з метою експресування рекомбінантного протеїна для використання як «їстівних» вакцин.

*A. tumefaciens*-опосередковану трансформацію було здійснено для одержання трансгенних рослин салату з геном *gap-gp120* вірусу імунодефіциту людини [532]. Лі зі співавт. [533], спираючись на власні результати з трансформації, вважають рослини салату перспективним об'єктом для створення пероральної вакцини проти гострого респіраторного синдрому коронавірусу. Рослини салату використали для перенесення гена поверхневого антигена HBsAg вірусу гепатиту В [524]. Після кокультивування з бактеріями *A. tumefaciens*, що несли гени *HBsAg* та *nptII*, було виділено канаміцинстійкі рослини салату і методом ПЛР підтверджено наявність обох перенесених генів. У роботі Deng зі співавт. [534] злиті гени  $O_{21}-O_{14}-A_{21}$  епітопів О та А вірусу ящуру було перенесено до рослин салату. ПЛР- та саузернблот-аналізами підтверджено інтегрування перенесених генів до рослинного геному. Синтетичний ген В-субодиниці холерного токсину, злитий із геном вірусу епідемічної діареї свиней *sCTB-sCOE*, методом агробактеріальної трансформації було перенесено до геному рослин *L. sativa*. СТВ-СОЕ-злитий протеїн синтезувався в кількості 0,0065% від загального протеїну. [157]. До рослин *L. sativa* Kim та ін. [525] перенесено ген *sLTB Escherichia coli*, при цьому рекомбінантний протеїн sLTB накопичувався у кількості 1,0–2,0% від загального розчинного білка.

Транспластомні рослини салату створено при застосуванні двох методів – ПЕГ-індукованої трансформації та шляхом бомбардування. Так, Lelivelt et al. [535], які використали метод ПЕГ-індукованої трансформації пластидної ДНК, отримали фертильні гомопластомні лінії салату-латуку сорту Flora. Трансформуючий вектор здійснював вбудовування генів в регіон *trnA-trnL* хлоропластного геному салату та мав селективний ген *aadA*. Транспластомні



рослини салату-латуку також було отримано методом бомбардування [536]. Трансформуюча ДНК містила ген стійкості до спектиноміцину та стрептоміцину *aadA* під контролем хлоропластного промотора салату, фланкованого двома прилеглими послідовностями пластидного геному салату. Це забезпечувало вбудовування гена *aadA* в ділянку хлоропластної ДНК між *rbcL* та *accD* генами. В середньому було отримано одну трансформовану рослину на один постріл. Всі транспластомні рослини T<sub>0</sub> були фертильними, а рослини покоління T<sub>1</sub> стабільно мали трансген в хлоропластному геномі.

Отже, основними напрямками досліджень є розробка методів культивування салату-латуку *in vitro*, соматичної гібридизації, оптимізація методів генетичної трансформації. Генетично модифіковані рослини салату можуть бути створені як методом агробактеріальної трансформації, так і з використанням ПЕГ-індукованого або біолістичного методу. Розроблено методики трансформування ядерної і хлоропластної ДНК. Створено генетично модифіковані рослини салату з властивостями, що становлять практичний інтерес, зокрема, з генами стійкості до гербіцидів, такі, що не хворіють на вірусні хвороби, не уражаються комахами. Отримано рослини салату, стійкі до негативного впливу абіотичних факторів, наприклад, такі, що мають підвищену стійкість до сольового стресу та дефіциту вологи. Продемонстровано можливість створення генетично модифікованих рослин салату, що можуть бути біовакцинами проти холери, гепатиту В, туберкульозу, продуцентами інтерферону. *L. sativa* є перспективним об'єктом для біотехнологічних досліджень, зокрема, для використання як продуцент рекомбінантних білків, оскільки цей вид характеризується швидким приростом біомаси, для цього виду оптимізовано умови культивування *in vitro*, а за регенераційною здатністю ряд сортів салату не поступається модельному об'єкту біотехнологій – тютюну.

#### 1.4. Лікарські рослини як об'єкти біотехнологічних досліджень

Генетична трансформація лікарських рослин може стати шляхом для створення нових форм рослин, які здатні синтезувати цінні сполуки медичного призначення, причому у ряді випадків навіть у кількості, що перевищує таку у вихідних рослинах. Такий спосіб отримання біологічно активних сполук є особливо актуальним при необхідності отримання БАС, які синтезуються у рідкісних та зникаючих видах. Можливість створення культури трансгенних коренів дозволяє уникати вирощування цінних лікарських культур у польових умовах, що дозволяє уникати негативного впливу факторів природного середовища на рівень накопичення БАС у рослинах.

1.4.1. Лікувальні властивості рослин родини складноцвітих та можливі напрямки їх біотехнологічного використання

1.4.1.1. Особливості рослин роду *Artemisia*. До рослин родини складноцвітих, які становлять інтерес як джерело БАС, належать трав'янисті рослини роду *Artemisia*, поширені у Європі, Америці, Центральній Азії, на півночі Африки та є досить відомими у народній медицині. Ці рослини, у тому числі *A. absinthium*, *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. vestita*, *A. dubia* та ін. відомі як джерело вторинних метаболітів та ефірних олій [537-540]. Рослини використовують для лікування малярії [541-543], вони мають протидіабетичні [544, 545], антипротозойні [541], протизапальні [546], антикоагулянтні [547], протипухлинні [548, 549] антиоксидантні [550] властивості.

Трансформацію рослин полину здійснювали з використанням *A. rhizogenes* та *A. tumefaciens*. Метою більшості досліджень було розроблення протоколу трансформації та створення рослин чи культури коренів з підвищеним вмістом артемізиніну [551]. Рослини *Artemisia annua* було трансформовано з використанням *A. rhizogenes* та отримано культуру коренів з рекомбінантним геном фарнезил дифосфатсинтази [466]. Цей ген

було перенесено до рослин і з використанням *A. tumefaciens* [552, 468]. Vanuаі та ін. трансформували рослини *A. annua* геном фарнезил пірофосфатсинтази [469]. До рослин цього виду також було перенесено ген *ipt* ізопентилтрансферази, що призводило до збільшення вмісту цитокінінів і, відповідно, хлорофілів, що опосередковано спричинювало зростання вмісту артемізиніну [470]. З метою підвищення рівня накопичення артемізиніну рослини полину трансформували генами *HMG-CoA* [471], бета-каріофілленсинтази, *ADS*, *CYP71AV1* і *CPR* [172], *AaWRYK1* [553], *HMGR* та *FPS* [473]. Giri та ін. виділили культуру трансгенних коренів з використанням різних штамів агробактерій і визначили відмінності в накопиченні артемізиніну [554].

Для трансгенних коренів і рослин *A. annua* проведено хроматографічний та мас-спектрометричний аналіз ефірних олій, визначено вміст артемізиніну, умови вирощування у біореакторах та можливі шляхи підвищення його синтезу. Такими шляхами є оптимізування складу живильного середовища, добір ліній трансгенних коренів, у яких накопичується більше артемізиніну, а також використання для генетичної трансформації генів, що опосередковано підвищують синтез сполуки. Зміни умов культивування також можуть зумовлювати зміни в накопиченні артемізиніну. Так, Weathers та ін. [555] досліджували вплив таких чинників, як концентрація ауксинів, цитокінінів, гібберелової, абсцизової кислоти та етилену на вміст артемізиніну в коренях *A. annua*, і визначили, що додавання до живильного середовища 2-ізопентиладеніну стимулювало продукування артемізиніну. Розроблено систему вирощування трансгенних коренів *A. annua* у біореакторах різних типів, з'ясовано технологічні параметри культивування [556-560].

Одержано не тільки трансгенні корені *A. annua*, але й трансформовано рослини інших видів роду *Artemisia*: *A. dubia*, *A. annua*, *A. absinthium*, *A. aucheri*, *A. indica*, *A. vulgaris*, визначено вплив складу живильного середовища

(макро- та мікросолі, концентрація сахарози) на швидкість росту коренів [538, 561-564].

Однак, існує цікавий вид, *A. tilesii* Ledeb (алеутський полин), ареалом якого є Сибір, Далекий Схід, Арктична Європа та Америка. Хоча ще у 1961 р. було виявлено наявність у рослинах алеутського полину сесквітерпенових лактонів з антималярійними властивостями, ці рослини практично не вивчені. Разом з тим, вони використовуються у нетрадиційній медицині та мають протиревматичну, дезинфікуючу, дезодоруючу, протипухлинну дію [565, 566].

1.4.1.2. *Tragopogon porrifolius* L. Рослини *Tragopogon porrifolius* L. практично не досліджено, хоча є ряд публікацій щодо цілющих якостей рослин, що належить до роду *Tragopogon* - *T. latifolius*, *T. graminifolius*, *T. pratensis* [567-570]. Однак, відомо, що рослини *T. porrifolius* синтезують біологічно активні речовини. Так, екстракти з вівсяного кореню мали антиоксидантну, антипроліферативну, гепатопротекторну активність, позитивно впливали на ліпідний обмін [571-575]. Незважаючи на цінні характеристики цієї рослини, досі відсутні публікації щодо культивування *in vitro* та генетичної трансформації рослин козельців.

1.4.1.3. *Bidens pilosa* L. У традиційній і народній медицині відома однорічна трав'яниста рослина *Bidens tripartita* L., череда трироздільна. Разом з тим, у нас практично невідомо рослина *Bidens pilosa* L. Череда волосиста розповсюджена у тропічному та субтропічному регіонах. У ряді країн, особливо в Африці та Азії, ці рослини використовуються у народній медицині для лікування низки захворювань. Виявлено, що в цих рослинах синтезується ряд біологічно активних сполук [576-579]. Рослини проявляють протизапальну, протівірусну, протипухлинну, протидіабетичну, протимікробну активність [580-583]. Досліджено протівірусну активність проти вірусу герпесу [584]. Важливою особливістю рослин причепи волосистої є наявність

протипухлинної активності [585]. Такі властивості, зумовлені накопичення природних біологічно активних сполук дозволяють вважати рослини цього виду кандидатами для розроблення лікарських препаратів для лікування ряду захворювань.

Разом з тим, є лише єдина публікація з інформацією щодо трансформування *B. pilosa* з використанням *A. tumefaciens* [586]. Автори використовували вектор pCHS, який мав ген халконсинтази (*chs*) з рослин петунії та селективний ген неоміцинфосфотрансферази II. Частота трансформування виявилася невисокою, оскільки автори з 1373 експлантів отримали лише 21 рослини, з яких лише 15 мали обидва перенесені гени.

Слід відмітити, що дотепер не було отримано культуру трансгенних коренів рослин цього виду та не визначено особливості трансформованих рослин, їх можливість синтезувати БАС.

1.4.2. Лікарські рослини родин Lemnaceae, Malvaceae, Rutaceae та їх використання у генно-інженерних дослідженнях

1.4.2.1. *Althaea officinalis* L. Алтея лікарська *Althaea officinalis* L. – багаторічна трав'яниста рослина родини мальвових (Malvaceae). Рослини входять до кола фармакопейних, мають ряд лікувальних властивостей. Корені алтеї містять слиз (до 36 %), основними компонентами якого є полісахариди пентозани і гексозани, що при гідролізі утворюють галактозу і декстрозу. Крім того, в коренях знайдено крохмаль (близько 37%), цукор (9%), аспарагін (2%), бетаїн (4%), олії (1,7%), пектинові речовини (до 16 %). Листки і квітки містять слиз та ефірну олію з валеріановим запахом (близько 0,02 %) [587, 588]. У рослинах синтезуються флавоноїди, кумарини, глікозиди тощо [589, 590]. Рослини мають лікувальні властивості завдяки наявності такого комплексу сполук. Зокрема, визначено протимікробну активність екстрактів з алтеї [591], позитивний вплив на бронхолегеневу систему [592, 593], рослини виявляють гіпоглікемічний ефект [594],

накопичують сполуки з антиоксидантними властивостями (флавоноїди та полісахариди) [595, 596].

Незважаючи на те, що у рослинах алтеї синтезуються численні біологічно активні сполуки та перспективність використання рослин у медицині, досі вони мало використовувалися у біотехнологічних дослідженнях. Є лише окремі публікації стосовно оптимізації умов вирощування в культурі [597] та лише одна публікація щодо генетичної трансформації. *Agrobacterium rhizogenes* було використано для отримання культури трансгенних коренів, що синтезували ціановірин-N, що пригнічує вірус імунодефіциту людини, у кількості до 2.4 мкг/г маси та у середовищі до 0,02 мкг/мл/24 години. На основі отриманих результатів автори зробили висновок, що трансгенні корені алтеї можуть бути використані не тільки для отримання терапевтичних вторинних метаболітів, але й як експресійна система для синтезу рекомбінантних сполук з лікувальними властивостями [598]. Такі дають можливість передбачати можливість синтезу у трансгенних коренях алтеї і інших біологічно активних сполук, а культивовані у біореакторах трансгенні корені є потенційним джерелом як властивих для рослин сполук (флавоноїдів, полісахаридів тощо), так і рекомбінантних біологічно активних сполук.

1.4.2.2. *Lemna minor* L. Ряска *Lemna minor* L. – водна рослина, що належить до родини Lemnaceae (*Araceae*) класу однодольних. Рослини ряски, так як і рослини інших видів цієї родини (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza*, *Wolffia borealis*, *Wolffia arryza* та ін.) флотують на поверхні водойм. У рослин відсутні стебло та листки, організм являє собою фотосинтезуючу пластинку – листець з боковими листецями та корінець (корінці). Ряска швидко розмножується вегетативним шляхом [599], при якому з пазух листеців (кармашків) утворюються нові пагони, які потім відділяються від материнської рослини. Рослини є стійкими до токсичних сполук. Вони здатні очищувати воду від гербіцидів [600], сполук важких

металів [601], органічних сполук [602]. Рослини ряски вилучали до 98% сполук хрому; свинцю, кадмію та міді – близько 30% [603]. Отже, ряска може використовуватися для біомоніторингу [604] та фітореMediaції забруднених водойм [605].

У народній медицині ряска використовується як спазмолітичний жарознижувальний, сечогінний, антимікробний засіб завдяки наявності флавоноїдів, каротиноїдів, полісахаридів та інших сполук [606]. З рослин виділено полісахарид лемнан, який має імуномодельючі властивості [607] та є кріопротектором [608]. Ряска містить до 35% білка (для порівняння - сухе насіння сої містить 38-42%) [609], тому її використовують як кормову добавку у тваринництві та птахівництві.

Крім того, оскільки рослина містить багато білка, швидко розмножується, а отримання біомаси не вимагає значних фінансових витрат, вона є чи не ідеальним об'єктом для генно-інженерних досліджень з метою створення трансгенних рослин – продуцентів рекомбінантних білків, зокрема цінних фармацевтичних сполук [610, 611]. Використання трансгенних ряскових в якості біофабрик дозволяє синтезувати рекомбінантні сполуки з досить низькою собівартістю, а отримані білки є більш безпечними, ніж рекомбінантні білки бактеріального чи тваринного походження.

Для різних видів родини розроблено методи культивування у стерильній культурі, калусоутворення та регенерації рослин [612]. Для дедиференціювання, утворення калусу та регенерації використовують регулятори росту рослин: 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту, тидіазурон, бензиламінопурин, кінетин. Крім того, показано, що на процес калусоутворення впливають цукри, які містяться у живильному середовищі (галактоза, сахароза, сорбітол) [613].

Для трансформації рослин родини ряскових використовують методи бомбардування [614] та трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [615]. Ряд досліджень було спрямовано лише на розроблення методик трансформації, для чого використовували селективні *nptII* та *bar*

[616]. Зазвичай при трансформації ряски використовують ацетосерингон, однак і у цьому випадку частота трансформування є невисокою [617].

Отримано рослини *L. minor*, що накопичували фермент ендоглюканазу E1 [618], інтерферон [20], моноклональні антитіла [619] та ін. Зареєстровано патенти на розроблення методики трансформації ряски [620-622]. Одне з останніх досліджень було присвячено створенню трансгенних рослин ряски, що синтезували антигени вірусу грипу А [623], причому автори передбачають можливість акумулювання у трансгенних рослинах білка M2e до 40 мкг /г маси та вважають ці рослини перспективними для використання у якості «їстівної» вакцини проти грипу.

Отже, рослини ряски завдяки швидкому росту та накопиченню білка у великій кількості, можливості культивування у контрольованих умовах у ферментерах вважаються доречним об'єктом для синтезу рекомбінантних сполук відповідають таким умовам та можуть бути використані для трансформування і синтезу рекомбінантних білків. Висушений рослинний матеріал є джерелом білка та використовується для підгодівлі свійських тварин та птахів. За умови зберігання у висушених рослинах рекомбінантних білків, у тому числі антигенів, рослини ряски можуть бути використані для імунізації свійських тварин. Однак, досі не досліджено можливість тривалого зберігання рекомбінантних білків у висушених рослинах. Наведені дослідження з генетичної трансформації рослин ряски було здійснено з використанням *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації, отримання трансгенного калусу та подальшої регенерації трансгенних рослин. Разом з тим, досі не досліджено можливість використання бактерій *A. rhizogenes* для генетичної трансформації рослин *L. minor*.

1.4.2.3. *Ruta graveolens* L. Рута запашна (*Ruta graveolens* L.), багаторічна трав'яниста рослина, належить до родини рутових (Rutaceae). Вона поширена у південно-західній частині України, а також у Середземномор'ї, Китаї, Японії. Особливістю її хімічного складу є одночасна



наявність алкалоїдів (0.2–1.4%) і ефірної олії (у сушеній траві — до 0.7%), флавоноїдний глікозид рутин, фурукумарин бергаптен, алкалоїд рутакридон, органічні кислоти, вітаміни [624-626]. Таке поєднання хімічних речовин рідко зустрічається серед рослин. Рута є лікарською рослиною, оскільки її хімічний склад обумовлює широкий спектр лікувальних властивостей. Екстракт з рути може бути використано як антисептичний, інсектицидний засіб [627, 628]. Активні інгредієнти з рути зумовлюють протигрибкові властивості, які можуть бути корисними для сільського господарства (як альтернативний природній фунгіцид) і медицини (для лікування мікозів) [629-631]. Антимікробна активність [632, 633] екстрактів рути обумовлена наявністю флавоноїдів у її хімічному складі [634]. Рутин, що синтезується у рослинах рути, являє собою сполуку флавоноїдної природи, має високу антиоксидантну активність, знижує рівень триацилгліцеридів у крові людини [635, 636]. Відмічено протизапальну, протисудомну, слабку седативну дію рути [637], протипухлинну активність [638-640].

Не дивлячись на широке використання рослин рути у традиційній та народній медицині, рута досі залишається недостатньо вивченою у культурі *in vitro*. Розроблено методики регенерації нових пагонів рути при використанні в якості вихідних експлантів листя та пазушних бруньок. Досліджено вплив різних регуляторів росту рослин (нафтилоцтова кислота, індолоцтова кислота, 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота, бензиламінопурин, кінетин) на калусогенез та регенерацію рослин рути. Найефективніше регенерацію пагонів отримували при використанні бруньок у якості вихідних експлантів [641-643]. На даному типі експлантів регенерація нових пагонів відбувалась з частотою від 22% (при використанні середовища з додаванням 0,5 мМ кінетину) до 98% (при використанні середовища з додаванням 10мМ ВАР та 2,5мМ NAA або IAA). При використанні листя регенерація відбувається з нижчою частотою - 45% [644]. Методику ініціювання калусоутворення запропонували Shabana [645], при використанні листя, пагонів та коренів у якості експлантів. Встановлено, що оптимальним

поєднанням експлант-середовище для ініціювання калусогенезу являються пагони на середовищі 1 мг/л 2.4-D та 1 мг/л кінетину.

Для трансформування рослин рути використовували бактерії *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Після *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації було отримано пряму регенерацію трансгенних пагонів на селективному середовищі з канаміцином з частотою трансформації до 11 % та підтверджено наявність перенесених *nptII* та *gus* генів [646].

Отримано також трансгенні корені рути. Так, трансформовано руту з використанням двох диких штамів агробактерій та досліджено вміст кумаринів та алкалоїдів у отриманих трансгенних коренях [647].

### 1.5. Узагальнення огляду літератури

Таким чином, з кінця минулого століття досягнуто великого прогресу у розробленні методів перенесення чужорідних генів до геному рослин. Метою таких робіт було як отримання рослин з новими господарськими якостями, наприклад, стійких до шкідників, хвороб, абіотичних стресових факторів [8, 161, 250-253], так і рослин, що синтезують рекомбінантні сполуки відповідно до перенесених генів [187, 237-240]. Розроблено ряд методів, які дозволяють отримувати трансгенні рослини. До методів генетичної трансформації відносять трансформацію, опосередковану бактеріями роду *Agrobacterium*, та пряму трансформацію. Серед методів прямої трансформації вирізняють біолістичну трансформацію, ПЕГ-індуковану трансформацію, мікроін'єкції ДНК, електропорацію. Найбільш застосовуваним прямим методом, вірогідно, є біолістична трансформація, суть якої полягає в безпосередньому перенесенні генів до клітин досліджуваних рослин з використанням спеціального пристрою - «біогармати». Разом з тим, часто використовуваним, простим та доступним методом перенесення генів до геному рослин залишається історично перший метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, який здійснюється завдяки природній здатності

грунтових мікроорганізмів *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes* родини Rhizobiaceae вводити свій генетичний матеріал до рослинних клітин.

Однак, незважаючи на розробленість технологій генетичної трансформації, зокрема, при використанні агробактерій, у кожному окремому випадку для рослин різних видів є необхідним оптимізація безпосередньої процедури, оскільки рослини різних видів відрізняються, у тому числі за чутливістю до бактерій, швидкістю росту, особливостями регенерації тощо. Разом з тим, визначення ключових параметрів, які у першу чергу впливають на ефективність отримання трансгенних рослин або «бородатих» коренів, може дозволити розробити більш універсальну методику, застосовувану для широкого кола видів рослин. Наявність такої методики дасть можливість скоротити час підготовчого етапу та підвищити ефективність отримання рослин із новими властивостями.

Визначено, що у клітинах рослин з трансформованим геномом можуть синтезуватися білки, які використовуються у харчовій промисловості, наприклад, казеїн та лактальбумін, полімери, використовувані у хірургічній практиці, гормони, фактори росту, ферменти, цитокіни, бактеріальні та вірусні антигени тощо. Наприклад, у трансгенних рослинах синтезувалися антитіла, зокрема, до вірусу сказу [307], герпесу [308], вірусу Ебола [309], вірусу грипу H5N1 [310], вірусу лихоманки Західного Нілу [311], гепатиту В та С [312-316] та інші [317, 318]. Визначено, що синтезовані у трансгенних рослинах сполуки є біологічно активними та можуть бути використані для імунізації та лікування грипу [321], туберкульозу [30, 320], СНІДу [322, 323, 324], гепатиту В [325], вірусних хвороб, які уражають тварин [326], сибірки [285] тощо.

Ряд досліджень було спрямовано на отримання трансгенних рослин, що синтезують інтерферони та бактеріальні антигени. Отримано рекомбінантні білки-антигени *M. tuberculosis* з трансформованих рослин *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana* [29, 30, 370, 371]. Разом з тим, коло цих досліджень поки що залишається обмеженим. На нашу думку, є доцільним

використання також інших видів рослин у якості об'єктів генетичної трансформації для можливого підвищення економічності синтезу цільової сполуки, а також для можливого застосування біотехнологічних рослин у якості «їстівних» вакцин проти туберкульозу, у тому числі у ветеринарії. Гени інтерферону людини перенесено до рослин тютюну, картоплі, рису, моркви, ряски, алое, гарбуза, причому рекомбінантний ІФН, синтезований у цих рослинах, виявляв біологічну активність [381]. Разом з тим, триває пошук рослин, в клітинах яких можна отримати найбільш високий рівень синтезу біоактивного ІФН, а також способів трансгенезу - введення генів ІФН до ядерної або хлоропластної ДНК за допомогою різних методів і векторів.

Відомо, що генетична трансформація рослин призводить до метаболічних змін, результатом яких є змінення рівня накопичення біологічно активних сполук, синтезованих у біотехнологічних рослинах. Такий ефект трансформації може бути використано для отримання ліній, що відрізняються не тільки накопиченням рекомбінантних білків медичного призначення, але й підвищеним рівнем продукування біологічно активних сполук, властивих для того чи іншого виду рослин. Застосування з метою трансформації рослин, які мають відомі лікувальні властивості (іноді це широко відомі їстівні рослини, наприклад, салат та цикорій), дозволяє, таким чином, отримувати не тільки рекомбінантні сполуки, але й БАС, властиві для певного виду. Однак, лікарські рослини досі не є фаворитами у біотехнологіях з генетичної інженерії, коло використовуваних видів обмежено. Так, досі були відсутні публікації щодо генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* рослин салату, ряски, причепи волосистої, які мають ряд лікувальних властивостей. Не проводилися дослідження щодо генетичної трансформації рослин алеутського полину, козельців, хоча досліджено широкий спектр біологічної активності екстрактів з цих рослин. Здійснено трансформування лише дикими штамми агробактерій (без перенесення генів, що кодують синтез білків медичного призначення) рослин

цикорію та рути. У той же час, ці рослини виявляють гепатопротекторні (цикорій, козельці), протидіабетичні (цикорій, козельці, причепа), протимікробні (рута, ряска), спазмолітині (ряска), протизапальні, антиоксидантні (алтей), протималярійні (полин), протипухлинні (полин, причепа) та інші властивості. Не проводилися експерименти щодо перенесення, зокрема, гена інтерферону до рослин названих видів і, таким чином, не досліджувалася можливість їх використання як джерела відповідного рекомбінантного білка. Використання таких рослин як цикорій, козельці, рута, алтей та ін. у якості об'єктів біотехнологічних досліджень може стати кроком для збереження їх природних популяцій, здешевлення БАС рослинного походження, отримання нових біологічно активних сполук, наприклад, з антимікробними, антиоксидантними, УФ-протекторними властивостями. Розроблення методики генетичної трансформації рослин названих видів, створення біотехнологічних рослин або «бородатих» коренів є шляхом отримання комплексу сполук, синтезованих у рослинних клітинах (як природних для видів, так і рекомбінантних), які можуть бути використані у медицині, косметології та ветеринарії.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Вихідний матеріал

Для дослідження використовували рослини (рис. 2.1):

а. Цикорій *Cichorium intybus* L. салатного сорту Пала росса (“Гавриш”)

б. Салат-латук *Lactuca sativa* L. листовий Рубінове мереживо (насіння придбане у фірмі “Гавриш”).

в. Алтея лікарська *Althaea officinalis* L. (“Насіння України”)

г. Вівсяний корінь *Tragopogon porrifolius* L. (“Насіння України”)

д. Ряска мала *Lemna minor* L. (з озера Опечень, Київ)

е. Алеутський полин *Artemisia tilesii* Ledeb (з колекції ІКБГІ НАН України)

ж. Причепа волосиста *Bidens pilosa* L. (Ла Фаворита, Еквадор)

з. Рута духмяна *Ruta graveolens* L. (Ла Фаворита, Еквадор)

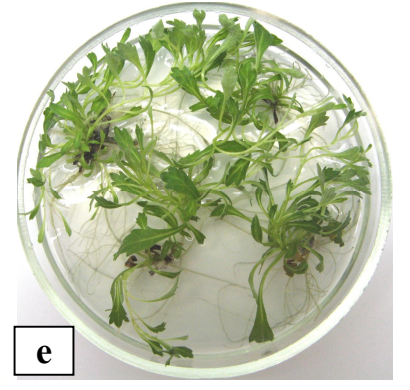




Рис.2.1 – Рослини, які використовували у дослідженнях

## 2.2. Вирощування рослин у асептичних умовах

Асептичні рослини салату, цикорію, алтеї, вівсяного кореню, рути, причепи отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70% етанолі (30 сек.), 25% розчині комерційного препарату “Білизна” (10 хв) та промивали тричі по 10 хв. в стерильній дистильованій воді. Оброблене таким чином насіння пророщували в чашках Петрі на агаризованому безгормональному середовищі Мурасіге і Скуга (МС) [648] у темряві при 24°C.

Асептичні рослини ряски отримували шляхом поверхневої стерилізації цілих рослин, узятих з природної водойми озера Опечень (Київ). Рослини послідовно витримували в 70% етанолі (30 сек.), 20% розчині комерційного препарату “Білизна” (10 хв) та промивали тричі по 10 хв. у стерильній дистильованій воді. Після стерилізації рослини вирощували у чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2МС (середовище Мурасіге та Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом мікроелементів, табл. 2.1) при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі +24°C.

Використовували також рослини полину з колекції зародкової плазми Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Для мікророзмноження рослин використовували живильне середовище 1/2МС. Частини пагонів рослин відокремлювали і переносили

на поверхню чашки Петрі з середовищем 1/2МС. Для мікророзмноження ряски листеці відділяли від рослин та культивували на живильному середовищі 1/2МС. Усі рослини субкультивували при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24 °С.

Таблиця 2.1 –

**Склад модифікованого середовища Мурасіге та Скуга, яке було використано для *in vitro* субкультивування досліджуваних рослин**

Компоненти середовища	Концентрація компонентів у середовищі, мг/л
KNO <sub>3</sub>	1900,000
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,000
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
KI	0,830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
Mn SO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	24,100
Zn SO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	10,600
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,250
Cu SO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,025
Co SO <sub>4</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,300
Fe SO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	27,800
Мезоінозит	100,000
Тіамін	0,500
Піридоксин	0,500
Нікотинова кислота	5,000
Фолієва кислота	0,500
Гліцин	2,000
Біотин	0,050
Сахароза	20000,000
Агар	7000,000



### 2.3. Агробактерії, які використовували для трансформації

Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 з векторними конструкціями pCB158, pCB124 та pCB161, за допомогою *A. tumefaciens* штам GV3101 з векторними конструкціями pCB063 та pCB124, а також за використання дикого штаму *A. rhizogenes* A4.

### 2.4. Векторні конструкції, які використовували для трансформації

Для генетичної трансформації рослин використовували векторні конструкції pCB 063, pCB158, pCB124, pCB 161 (рис. 2.2), створені в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

При створенні конструкції pCB063 був використаний бінарний вектор, що містив селективний ген *nptII* з регуляторними послідовностями NOS промотора і термінатора. У ділянку T-ДНК під контролем 35S промотора і OCS термінатора клоновані структурні послідовності генів, що кодують синтез туберкульозних антигенів.

При конструюванні вектора pCB158 за основу було взято бінарний вектор pCB064, який містив зливу послідовність генів *esxA::fbpB<sup>ΔTMD</sup>*, що кодують антигени ESAT6 та Ag85B (без трансмембранного домену ΔTMD) з *Mycobacterium tuberculosis*, під контролем промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та селективний ген неоміцинфосфотрансферази II *nptII*. Фрагмент *EcoRI-NcoI* бінарного вектора pCB064 [507], який містив промотор 35S (1338 п.н.), було заміщено послідовністю промотора MII (*EcoRI-NcoI* розміром 1735 п.н.), клонованого раніше [649]. Всі маніпуляції із ДНК проводили відповідно методики [650] та рекомендацій виробника ендонуклеаз рестрикції, лігази та Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва). Плазмідна ДНК бінарного вектора pCB158 була

перенесена до агропінового штаму *A. rhizogenes* A4, який у подальшому використовували для генетичної трансформації рослин.

Конструкції pCB124 та pCB 161 (рис. 2.2), створені в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії, містили селективний ген *nptII* з регуляторними послідовностями NOS промотора і термінатора та цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$  під контролем 35S промотора (pCB124) або коренеспецифічного MII промотора цукрового буряку (pCB161). Присутність лідерної послідовності забезпечувала транспорт цільового білка в апопласт.

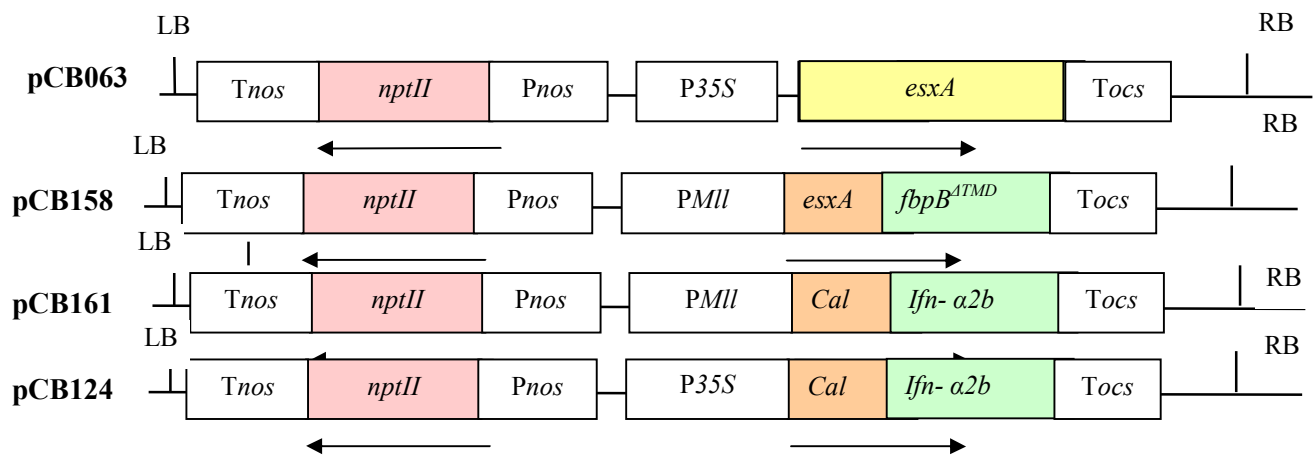


Рис. 2.2 – Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pCB063, pCB064, pCB158, pCB124, pCB161: LB, RB – ліва і права границі Т-ДНК; *nptII* – ген *nptII* (NOS промотор і термінатор); *esxA* та *esxA::fbpB<sup>ATMD</sup>* – гени, що кодують синтез антигенів ESAT6 і ESAT6:Ag85B( $\Delta$ TMD) (35S промотор і OCS термінатор), *ifn- $\alpha 2b$*  – ген інтерферону- $\alpha 2b$  (35S або MII промотори і OCS термінатор), *cal* – лідерна послідовність, що забезпечує транспорт цільового білка в апопласт.

Вектори мали такі цільові гени: зливу послідовність *esxA::fbpB<sup>ATMD</sup>* під контролем *MII* промотора цукрового буряку (pCB158) або під контролем 35S- промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (pCB064); послідовність гена *esxA* під контролем 35S- промотора (pCB063), послідовність гена *ifn- $\alpha 2b$*  під контролем коренеспецифічного промотора *MII* цукрового буряку (pCB161) або під контролем 35S- промотора вірусу мозаїки цвітної капусти

(pCB124). Усі вектори містили селективний ген неоміцинфосфотрансферази II *nptII* (під контролем промотора гена нопалінсинтетази), наявність якого давала можливість здійснювати відбір трансгенних коренів за ознакою стійкості до канаміцину. Вектори pCB161 та pCB124 містили кальретикуліновий сигнал перед кодуючою частиною гена *ifn- $\alpha$ 2b* для перенаправлення білка в апопласт.

## 2.5. Вирощування агробактерій для генетичної трансформації рослин

Бактерії вирощували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) на середовищі LB [650] з карбеніциліном (100 мг/л) та рифампіцином (50 мг/л) протягом 24-48 годин при температурі 28°C (табл.2.2). Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000g, 10хв.), осад ресуспендували в розчині 10мМ MgSO<sub>4</sub>. Суспензію бактерій використовували для генетичної трансформації досліджуваних рослин.

Таблиця 2.2-

### Склад середовища LB, яке використовували для вирощування агробактерій

Компоненти середовища	Концентрація компонентів у середовищі, г/л
Дріжджовий екстракт	5,00
Гідролізат казеїну	10,00
NaCl	10,00
pH 7,5	

## 2.6. Визначення селективної концентрації антибіотика та відбір стійких трансгенних рослин

Для визначення селективної концентрації канаміцину при культивуванні сім'ядоль та проростків використовували такі концентрації антибіотика: 10, 25, 50, 100 мг/л. Для тестування кожної концентрації антибіотика по 20 листових експлантів культивували на агаризованому середовищі (для цикорію середовище С1, табл. 2.3, для салату середовище L1, табл. 2.4) та по 50 проростків з відокремленим корінням на середовищі МС (табл. 2.1) з антибіотиком у наведених вище концентраціях. Експерименти проводили у трикратній повторності. За селективну концентрацію вважали таку, за якої зелені проростки (при використанні проростків) або пагони (при використанні листових експлантів) були відсутні.

## 2.7. Оптимізація методики генетичної трансформації рослин

Для оптимізації методики трансформації з метою можливості подальшого використання для отримання трансгенних коренів або рослин різних видів, змінювали такі параметри:

- час культивування на живильному середовищі без цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій;
- час культивування без селективного тиску (без канаміцину);
- тип експланту.

Для трансформації з використанням *A. rhizogenes* застосовували різні типи експлантів (листки, сім'ядолі, міжвузля, черешки, корені) у залежності від виду рослин. Експланти з попередньо зробленими насічками інкубували у бактеріальній суспензії протягом 30 хв., далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС (протягом 1-10 діб. Після цього експланти переносили на середовище

1/2МС, до якого додавали 600 мг/л цефотаксиму. Селективний антибіотик у концентрації 25 мг/л додавали через 1-14 діб після трансформації агробактеріями.

Для трансформації з використанням *A. tumefaciens* експланти різних типів у залежності від виду рослин з попередньо зробленими насічками також інкубували в бактеріальній суспензії протягом 30 хв. Далі їх переносили на середовище для регенерації відповідного складу для кожного виду рослин на 1- 10 діб, а потім – на те саме середовище, до якого додавали 600 мг/л цефатоксиму. Селективний антибіотик канаміцин у концентрації 25 мг/л додавали через 1-14 діб після трансформації агробактеріями. Ефективність застосованого протоколу оцінювали за частотою регенерації зелених у селективних умовах пагонів (після трансформації з використанням *A. tumefaciens*) або за частотою утворення коренів (після трансформації з використанням *A. rhizogenes*) з характерними для «бородатих» коренів ознаками (негативний геотропізм, значне галуження, ріст на середовищі без регуляторів росту). Частоту регенерації пагонів визначали як відношення кількості експлантів із зеленими у селективних умовах регенерованими пагонами до загальної кількості експлантів, виражене у відсотках. Частоту коренеутворення визначали як відношення кількості експлантів з коренями характерного фенотипу до загальної кількості використаних експлантів, виражене у відсотках. За оптимальний вважали такий протокол, за використання якого частота утворення зелених пагонів або частота утворення коренів була найвищою для даного виду рослин.

## 2.8. Генетична трансформація з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та регенерація трансгенних пагонів цикорію

Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 з векторною конструкцією pCB063 (рис. 2.2).

Трансформацію проводили шляхом інкубування сім'ядоль рослин цикорію (по 30 у кожному варіанті) в суспензії *A. tumefaciens*. Сім'ядолі інкубували у суспензії протягом 30 хв., промокали фільтрувальним папером і культивували у чашках Петрі на агаризованому середовищі для регенерації пагонів (таблиця 2.3).

Для регенерації трансгенних пагонів з експлантів використовували модифіковане живильне середовище Мурасіге та Скуга, яке містило регулятори росту рослин кінетин (DUCHEFA Biochemie BV The Netherlands) та  $\alpha$ -нафтилоцтову кислоту (НОК, DUCHEFA Biochemie BV The Netherlands) (табл. 2.3).

Таблиця 2.3-

**Склад живильних середовищ для регенерації рослин цикорію**

Компоненти середовища	Концентрація компонентів у середовищі, мг/л	
	C1	C 2
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	440
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
KI	0,83	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
Mn SO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	24,1	24,1
Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10,6	10,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
Cu SO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Co SO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,3	37,3
Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Мезоінозит	100	100

<i>Продовження табл.2.3</i>		
Тіамін (В <sub>1</sub> )	0,5	0,5
Піридоксин (В <sub>6</sub> )	0,5	0,5
Нікотинова кислота	5	5
Фолієва кислота	0,5	0,5
Гліцин	2	2
Біотин	0,05	0,05
Сахароза	30000	30000
Агар	7000	7000
Кінетин	2,5	0,5
НОК	0,1	0,01

Експланти культивували на агаризованому середовищі С1 з 2,5 мг/л кінетину (DUCHEFA Biochemie BV The Netherlands) та 0,5 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК, Duchefa Biochemie BV The Netherlands) до якого додавали 25 мг/л канаміцину ("Київмедпрепарат", Україна) та 600 мг/л цефотаксиму.

Після початку регенерації рослин експланти переносили на середовище С2, яке містило 0,5 мг/л кінетину, 0,05 мг/л НОК, 25 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксиму. Регенеровані пагони укорінювали на середовищі 1/2МС з антибіотиками у тих самих концентраціях.

Частоту трансформації визначали як процентне відношення кількості експлантів з регенерованими на селективному середовищі зеленими пагонами до загальної кількості експлантів.

Для регенерації пагонів цикорію з «бородатих» коренів використовували живильне середовище 1/2МС. Корені культивували при температурі +24° С та 16-годинному освітленні до формування пагонів (2-3 тижні у залежності від лінії). Регенеровані пагони відділяли від вихідних коренів та укорінювали на середовищі 1/2МС за таких самих умов вирощування.

## 2.9. Генетична трансформація рослин салату з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та регенерація трансгенних пагонів

Для отримання трансгенних рослин салату використовували оптимізовану методику кокультивування з агробактеріями та наступного селекційного відбору трансгенних ліній рослин. Бактерії вирощували на середовищі LB [650] за описаною у попередньому розділі методикою. Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 з векторною конструкцією pCB124 (рис. 2.2), яка мала селективний ген *nptII* та цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини *ifn- $\alpha 2b$* . Сім'ядолі (по 30 у кожному варіанті) інкубували у суспензії *A. tumefaciens* протягом 30 хв., промокали фільтрувальним папером і культивували у чашках Петрі на відповідних агаризованих середовищах для регенерації пагонів (таблиця 2.4). Використовували модифіковане живильне середовище МС, до якого додавали морфоліноетансульфонову кислоту (MES) та регулятори росту рослин (табл. 2.4). Для отримання регенованих пагонів експланти вирощували на живильному середовищі L-1 протягом 1-1,5 місяців, далі переносили на середовище, у якому була зменшена концентрація регуляторів росту (L-2). Укорінення отриманих пагонів проводили, культивуючи їх на середовищі без регуляторів росту (L-3).

Таблиця 2.4-

### Середовища, які використовували для регенерації рослин

#### *Lactuca sativa*

Компоненти середовища	Концентрація компонентів у середовищах, мг/л		
	L-1	L-2	L-3
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	440	440
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170



*Продовження таблиці 2.4*

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650	1650
KI	0,83	0,83	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2
Mn SO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	24,1	24,1	24,1
Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10,6	10,6	10,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
Cu SO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Co SO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,3	37,3	37,3
Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Мезоінозит	100	100	100
Тіамін (В <sub>1</sub> )	0,5	0,5	0,5
Піридоксин (В <sub>6</sub> )	0,5	0,5	0,5
Нікотинова кислота	5	5	5
Фолієва кислота	0,5	0,5	0,5
Гліцин	2	2	2
Біотин	0,05	0,05	0,05
НОК	0,5	0,05	0
Кінетин	3	0,5	0
Сахароза	30000	30000	20000
MES	1000	1000	1000
Агар	6000	6000	6000

## 2.10. Оптимізація умов регенерації рослин рути

Для регенерації рагонів рути у якості експлантів використовували корені, міжвузля, листки та черешки. Експланти вирощували на живильних середовищах, основу яких становило середовище МС та які відрізнялися за наявністю і концентрацією регуляторів росту: кінетину,  $\alpha$ -

нафтилоцтової кислоти та 6-бензиламінопурину – загалом 18 варіантів середовищ (табл. 2.5). Використовували середовища, які містили лише цитокініни, а також середовища, до складу яких входили як цитокініни (концентрація від 0,5 до 2,5 мг/л), так і ауксин  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота (концентрація від 0,05 до 0,5 мг/л).

Експланти вирощували при температурі +24°C та 16-годинному освітленні до формування пагонів. За найбільш ефективно вважали таке живильне середовище, при культивуванні на якому спостерігали формування найбільшої кількості пагонів. Експеримент проводили у трикратній повторності, використовуючи у кожному по 50 експлантів. Частоту регенерації визначали як відношення кількості експлантів з регенерованими пагонами до загальної кількості експлантів.

Таблиця 2.5-

**Вміст регуляторів росту у живильних середовищах, які використовували для оптимізації умов регенерації рослин рути духмяної**

Варіанти середовища, №	Концентрація регуляторів росту у середовищі МС*, мг/л		
	БАП	НОК	Кін
1	0,50	0	0
2	1,00	0	0
3	2,50	0	0
4	0,50	0,05	0
5	0,50	0,10	0
6	0,50	0,50	0
7	1,00	0,05	0
8	1,00	0,10	0
9	1,00	0,50	0
10	2,50	0,05	0

<i>Продовження таблиці 2.5</i>			
11	2,50	0,10	0
12	2,50	0,50	0
13	0	0	0,50
14	0	0	1,00
15	0	0	2,50
16	0	0,05	0
17	0	0,10	0
18	0	0,50	0
* - середовище Мурасіге та Скуга			

2.11. Генетична трансформація рослин салату, цикорію, алтеї, козельців, причепи, рути та полину з використанням *A. rhizogenes*

Для отримання культур «бородатих» коренів рослин різних видів використовували суспензію бактерій *A. rhizogenes*. Для трансформації рослин цикорію брали бактерії, які мали вектор pCB161 з цільовим геном інтерферону людини (рис. 2.2), вектор pCB158 з цільовими генами *esxA* та *fbpB* антигенів ESAT6 і Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* та дикий штам *A. rhizogenes* A4. Трансгенні корені рослин салату, козельців, алтеї, причепи та полину отримували шляхом трансформації диким штамом *A. rhizogenes* A4 та бактерії з векторами pCB161 і pCB124.

Бактерії вирощували на середовищі LB з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину) на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі +28°C протягом 24 годин. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (300 g, 10 хв.), осад ресуспендували у розчині 10мМ MgSO<sub>4</sub>. Експланти з попередньо зробленими насічками інкубували у бактеріальній суспензії 30 хв., далі культивували у чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2МС протягом трьох діб. Після

цього експланти переносили на середовище 1/2МС, до якого додавали 600 мг/л цефатоксиму. Селективний антибіотик у концентрації 25 мг/л додавали через одну добу після трансформації агробактеріями з векторами рСВ161, рСВ124 та рСВ158. Контролем слугували експланти, які не піддавали трансформації (без кокультивування з бактеріями), та вирощували за таких самих умов.

#### 2.12. Субкультивування трансгенних коренів цикорію, салату, алтеї, козельців, рути, полину, причепи

Після формування коренів на експлантах, які попередньо кокультивували з *A. rhizogenes*, їх відділяли та вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2МС. Для субкультивування отримані культури трансгенні корені цикорію, салату, алтеї, козельців також вирощували на живильному середовищі 1/2МС. Термінальні частини коренів довжиною 20-30 мм відділяли та переносили на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Корені вирощували при температурі +24°C. На перших етапах культивування протягом 6 місяців після трансформації використовували середовище, яке містило антибіотик цефотаксим у концентрації 600 мг/л для повної елімінації агробактерій та канаміцин у концентрації 25 мг/л. Після проведення ПЛР аналізу на відсутність *vir* генів агробактерій корені культивували на середовищі без антибіотиків. Час між субкультивуванням трансгенних коренів варіював від 10 до 30 діб у залежності від виду рослин та швидкості росту коренів.

#### 2.13 Трансформація рослин ряски з використанням *A. rhizogenes*

У дослідженнях використовували культивовані у стерильних умовах рослини *Lemna minor*. Для трансформації застосовували *A. rhizogenes* А4 з векторною конструкцією рСВ158 (рис. 2.2) з цільовими генами *esxA* та

*fbpB* антигенів ESAT6 і Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*, з вектором pCB124 з геном інтерферону людини та дикий штам *A. rhizogenes* A4. Рослини розділяли на окремі листеці, які інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв., промокали фільтровальним папером та культивували на середовище 1/2МС, потім експланти переносили на середовище 1/2МС, до якого було додано 25 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксиму для відбору зелених трансформованих рослин.

#### 2.14 Виділення загальної ДНК рослин

Загальну рослинну ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виділяли відповідно до протоколу [650]. ДНК екстрагували із зелених листків асептичних або тепличних рослин. Для виділення ДНК застосовували ЦТАБ метод. До 20-100 мг листків у пробірки додавали екстрагуючий буфер (1:2 вага/об'єм), гомогенізували та інкубували 20-30 хв. при 56°C. До гомогенату додавали рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1), перемішували до утворення однорідної емульсії. Центрифугували 5 хв. при 2500 g, відбирали водну фазу і повторювали обробку сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт. До водної фази додавали два об'єми буферу для осадження та залишали при кімнатній температурі до утворення преципітату (на 1-3 год.). Преципітат осаджували при 1500-2500 g протягом 7 хв., при цьому супутні забруднюючі домішки залишалися в супернатанті. Видаляли супернатант, осад розчиняли у 100мкл 1М NaCl. Додавали 2 об'єми етанолу і залишали на 1год. при -20°C для формування осаду ДНК, після чого центрифугували 15 хв на мікроцентрифузі Eppendorf 5415C при 14 тис. обертів/ хв. Осад ДНК двічі промивали 70% етанолом і один раз 85% етанолом для видалення залишків солей і ЦТАБ. Після промивання осад підсушували і розчиняли в 50-100 мкл води або TE-буферу.

## 2.15 Аналіз трансформованих рослин та «бородатих» коренів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Відомості щодо праймерів та умов проведення полімеразної ланцюгової реакції (розмір ампліфікованого фрагменту, температура реасоціації, час синтезу, кількість циклів) наведено у табл. 2.6 та 2.7.

Таблиця 2.6 -

### Праймери, які були використані для аналізу трансгенних рослин або «бородатих» коренів

№	Ген	Праймери	Аналізована рослина
1-2	<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'-gctctagatccagagtcccgcgcagaag-3'	<i>C. intybus</i> , <i>L. sativa</i> , <i>L. minor</i> , <i>T. porrifolius</i> , <i>A. officinalis</i> , <i>A. tilesii</i> , <i>B. pilosa</i> , <i>R. graveolens</i>
3-4	<i>esxA</i>	5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3' 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'	<i>C. intybus</i> , <i>L. minor</i> , <i>R. graveolens</i>
5-6	<i>fbpB<sup>ATMD</sup></i>	5'-tctacagcgactggtagc-3' 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'	<i>L. minor</i> , <i>R. graveolens</i>
7-8	<i>ifn-a2b</i>	5'-ttgatgctcctggcacag- 3' 5'-ttctgctctgacaacctc-3'	<i>C. intybus</i> , <i>L. sativa</i> , <i>T. porrifolius</i> , <i>A. officinalis</i> , <i>A. tilesii</i> , <i>B. pilosa</i> , <i>R. graveolens</i>
9-10	<i>rolB</i>	5'-atggatcccaaattgctattcctccacga-3' 5'-ttaggcttcttctcaggttactgcagc-3'	<i>C. intybus</i> , <i>L. sativa</i> , <i>T. porrifolius</i> , <i>Althaea officinalis</i> , <i>A. tilesii</i> , <i>B. pilosa</i> , <i>R. graveolens</i>
11-12	<i>virD</i>	5'-atgtcgcaaggcagtaagccca -3' 5'-ggagtcttcagcatggagcaa-3'	<i>C. intybus</i> , <i>L. sativa</i> , <i>L. minor</i> , <i>T. porrifolius</i> , <i>A. officinalis</i> , <i>A. tilesii</i> , <i>B. pilosa</i> , <i>R. graveolens</i>

Наявність перенесених генів у трансформованих рослинах та коренях визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Сумарну ДНК екстрагували зі свіжих листків ЦТАБ-методом. Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками.

Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буферу з сульфатом амонію (Fermentas), 0.2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0.5 од. Таq-полімерази (Fermentas), 2.0 мМ хлориду магнію, 10-50 нг ДНК-проби.

Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 20 мкл. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1.5 % агарозному гелі у Tris–боратній буферній системі. Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем – ДНК відповідного плазмідного вектору.

Таблиця 2.7-

### Умови та розміри продуктів реакції ампліфікації

№ праймера	Умови ампліфікації			Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н.
	Температура реасоціації, град С	Час синтезу, сек	Кількість циклів	
<b>1-2</b>	65	30	33	622
<b>3-4</b>	62	30	33	299
<b>5-6</b>	62	30	33	484
<b>7-8</b>	60	30	33	396
<b>9-10</b>	56	30	33	780
<b>11-12</b>	60	30	33	432

#### 2.16. Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга к-ДНК

Сумарну РНК виділяли за методикою [651]. Матеріалом були листки або корені асептичних рослин. Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі. Чистоту препаратів РНК також контролювали спектрофотометрично за співвідношенням  $A_{260}:A_{280}$  і  $A_{260}:A_{230}$ , де  $A_{230}$ ,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  – оптична густина при довжині хвилі 230, 260, 280 нм відповідно. Отримані препарати РНК мали задовільні спектрофотометричні

характеристики ( $A_{260}:A_{280}$  1,9-2,0 і  $A_{260}:A_{230}$  2,3-2,5), що вказувало на відсутність домішок поліфенолів, полісахаридів і ДНК. Сумарна РНК використовувалася як матриця для синтезу першого ланцюга кДНК (зворотних транскриптів). Синтез проводили за допомогою набору реактивів «Fermentas» за інструкцією фірми-виробника. При цьому для кожної проби РНК проводили дві паралельні реакції – у присутності і у відсутності (негативний контроль) зворотної транскриптази. ПЛР-ампліфікацію геномної ДНК і синтезованих зворотних транскриптів проводили на ампліфікаторі *Mastercycler personal 5332* (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл. Використовували праймери, специфічні до кодуєчої частини генів *nptII*, *ifn- $\alpha$ 2b*, генів білків-антигенів ESAT6, Ag85B (табл. 2.6).

#### 2.17. Визначення наявності білка Ag85B

Аналіз наявності білків-антигенів Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* в рослинному матеріалі проводили методом Western blotting. Для визначення наявності цільового білка з трансгенних рослин ряски готували білкові екстракти. Для екстракції рослинний матеріал подрібнювали та використовували буфер №1, склад якого наведено у табл. 2.8. Екстракт у буфері для екстракції центрифугували при 10000 g протягом 10 хв. при температурі +4°C. Відібрали супернатант і додавали до нього 1/3 об'єму 4-х кратного буферу для нанесення (буфер №2). Отриману суміш прогрівали протягом 5 хв. при температурі +95°C.

Для отримання зразків позитивного контролю використовували екстракти рослинного матеріалу, для якого раніше була продемонстрована



наявність білка ESAT6-Ag85(B)dTMD-6His методом Western blotting, або до екстракту білків з рослинного матеріалу дикого типу додавали препарат очищеного рекомбінантного білка ESAT6-Ag85(B)dTMD-6His до досягнення кінцевого навантаження на трек у 0,5 – 1,0 нг по цьому білку.

Таблиця 2.8 –

**Склад буферів для екстракції з рослин ряски та детекції білка**

Компоненти буфера	Вміст складових на 1000 мл деіонізованої води	
	Буфер 1	Буфер 2
Сечовина	480,00	0
натрію додецилсульфат	0	40,00 г
Tris	6,06	6,06 г
гліцерин	0	0,50 л
меркаптоетанол	0	0,028 л
бромфеноловий блакитний	0	0,10 г
pH	8,0	6,8

Готували суміш для заливки розділяючого та концентруючого поліакриламідного гелів (табл.2.9). Час полімеризації розділяючого гелю становив 1 год., концентруючого 20 хв. Робочий буферний розчин (трис-основа – 3,02 г; гліцин – 18,8 г; натрію додецилсульфат – 1г; вода деіонізована – до 1000 мл) заливали у верхній та нижній резервуар камери для електрофорезу. Зразки екстрактів та суміш маркерних білків вносили у кишені гелю і проводили електрофорез згідно з рекомендаціями виробника пристрою для електрофорезу.

Гель після закінчення електрофорезу переносили у розчин для трансферу білків (трис-основа – 5,8 г; гліцин – 2,9 г; спирт метиловий – 100 мл; вода деіонізована – до 1000 мл) та інкубували протягом 15 хв. Паралельно у розчині для трансферу білків витримували вирізану відповідно до розміру гелю і попередньо змочену у метиловому спирті

мембрану для блотінгу та листки фільтрувального паперу відповідного розміру.

Таблиця 2.9 -

**Суміш для заливки розділяючого та концентруючого  
поліакриламідного гелів**

Компоненти	Вміст складових гелів на 1000 мл деіонізованої води	
	розділяючого	концентруючого
Tris	46,00 г	15,73 г
Акриламід	120,00 г	51,00 г
Амонію персульфат	1,00 г	1,00 г
ТЕМЕД	0,86 мл	1,00 мл
Натрію додецилсульфат	1,00 г	1,00 г
pH	8,8	6,8

Проводили перенесення білків з гелю на мембрану згідно з рекомендаціями виробника пристрою для напівсухого трансферу білків до повного переходу пофарбованих смуг маркерних білків з гелю на мембрану. Мембрану поміщали у розчин для блокування вільних сайтів зв'язування (табл. 2.10) та інкубували при +2-8°C протягом ночі. Далі її поміщали у розчин із специфічними до рекомбінантного білка ESAT6-Ag85(B)dTMD-6His антитілами ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 2,3 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2 г;  $\text{NaCl}$  – 8 г;  $\text{KCl}$  – 0,2 г; Твін-20 – 1 мл; специфічні антитіла – у рекомендованому виробником розведенні; вода деіонізована – до 1 л) та інкубували при повільному перемішуванні при +42°C протягом 2 годин, триразово відмивали від специфічних до рекомбінантного білка антитіл, що не зв'язалися (табл. 2.10).

**Склад розчинів для обробки мембрани закінчення переносу білків**

Компоненти	Склад розчинів (на 1 л)	
	для блокування вільних сайтів зв'язування	для відмивання від специфічних антитіл, що не зв'язалися
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,3 г	2,3 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 г	0,2 г
NaCl	8,0 г	8,0 г
KCl	0,2 г	0,2 г
молоко сухе знежирене	50,0 г	0,0 г
Твін-20	1,0 мл	1,0 мл

Відмиту мембрану поміщали у розчин із антитілами, кон'югованими із пероксидазою хрому (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O– 2,3 г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2г; NaCl – 8 г; KCl – 0,2 г; Твін-20 – 1 мл; конюгат антитіл із пероксидазою – у рекомендованому виробником розведенні; вода деіонізована – до 1 л) та інкубували при +37°C протягом 1 години при повільному перемішуванні, потім триразово відмивали від незв'язавшихся антивидових антитіл у розчині (табл 2.10). Відмиту мембрану інкубували у розчині для хемілюмінесцентного виявлення пероксидази. Результати аналізу документували за допомогою фотоплівки, чутливої до рентгенівського випромінювання, шляхом експозиції цієї плівки у темряві на щойно змоченій у хемілюмінесцентному розчині та загорнутої у поліетиленову плівку мембрані. Проявлення фотоплівки здійснювали у розчинах проявника та фіксажу для проявлення рентгенівських знімків.

2.18. Визначення особливостей росту трансгенних рослин ряски у присутності сполуки шестивалентного хрому

Об'єктом досліджень були трансгенні та контрольні рослини ряски *L. minor*, які культивували у стерильних умовах на середовищі 1/2МС з

розчином  $K_2CrO_4$  у концентраціях за  $Cr(VI)$  1, 2, 4 та 8 мМ. У чашки Петрі діаметром 60 мм додавали по 10 мл рідкого середовища з відповідною концентрацією  $Cr(VI)$  та переносили до чашок рослини ряски (по 100 листеців). Через 3, 6, 12 та 21 добу підраховували кількість та визначали приріст кількості листеців ( $\Delta N$ ), концентрацію  $Cr(VI)$  у живильному середовищі, а по завершенні експерименту – вміст  $Cr(VI)$  у рослинах. Концентрацію хрому(VI) визначали за допомогою дифенілкарбазиду (ДФК) фотоколориметричним методом [652] на спектрофотометрі Eppendorf bioPhotometer plus (довжина хвилі  $\lambda = 550$  нм). З чашок Петрі відбирали до мікропробірок Eppendorf по 500 мкл середовища, додавали 0,125 мкл  $H_2SO_4$  (1:3) та 0,125 мл 0,5% спиртового розчину дифенілкарбазиду. Калібрування проводили за розчином  $K_2CrO_4$ . Для визначення вмісту  $Cr(VI)$  у рослинах листеці зважували, розтирали в 1 мл дистильованої води та центрифугували. Супернатант використовували для визначення вмісту  $Cr(VI)$  за вищевказаною методикою.

Ріст рослин характеризували за такими показниками:

- приріст кількості листеців  $\Delta N$

$$\Delta N = N_i - N_0, \quad (2.1)$$

де  $N_i$  – кількість листеців через визначений проміжок часу ( $i=3, 6, 14$  та  $21$ );  $N_0$  – початкова кількість листеців;

- Коефіцієнт росту рослин

$$K_p = n_i / n_0, \quad (2.2)$$

де  $n_i$  - кількість листеців через певний проміжок часу ( $i = 3, 6, 10, 17$  діб);  $n_0$  – початкова кількість листеців ( $n_0 = 100$ )

- Відносна швидкість приросту кількості листеців  $V$ . Цей показник дає можливість оцінити динаміку зміни швидкості росту рослин

$$V = (N_i - N_{i-1}) / (t_i - t_{i-1}) / N_{i-1}, \quad (2.3)$$

де  $N_i$  – кількість листеців у точці виміру ( $i = 3, 6, 12$  та  $21$  доба),  $N_{i-1}$  - кількість листеців у попередній точці виміру,  $t_i - t_{i-1}$  - проміжок часу між двома точками виміру (3, 3, 6 та 9 діб);

- Середній коефіцієнт стійкості рослин до хрому (VI) за період культивування рослин

$$R_{\text{сер}} = \Delta N_c / \Delta N_0, \quad (2.4)$$

де  $\Delta N_c$  – приріст кількості листеців при культивуванні у присутності хрому у певній концентрації,  $\Delta N_0$  приріст кількості листеців при культивуванні на середовищі без хрому;

Експерименти проводили у трьох повторностях, статистичну обробку результатів здійснювали за стандартними методиками,  $P < 0,05$ .

## 2.19. Культивування трансгенних та контрольних рослин ряски за різних температурних умов

Для порівняльного визначення впливу температурних умов культивування трансгенні та контрольні рослини ряски вирощували на рідкому живильному середовищі 1/2МС при таких температурних умовах: загальний час культивування 30 діб, з них у варіантах №1 +24° С протягом 30 діб; №2 – 2 доби при зниженій температурі +3° С; №3 – 15 діб при +3° С; №4 - 20 діб +3° С; №5 – 25 діб +3° С; №6 - 2 доби +36° С; №7 – 4 доби +36° С.

Через 30 діб визначали приріст маси рослин, вміст білка (див. розділ 2.24) та фруктозовмісних цукрів (див. розділ 2.20). Для визначення приросту маси рослини зважували до ( $m_0$ ) та після закінчення терміну культивування ( $m_1$ ). Приріст маси визначали за формулою:

$$\Delta m = m_1 - m_0, \quad (2.5)$$

де  $m_1$  – маса через один місяць,  $m_0$  – вихідна маса листеців.

## 2.20 Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів

Пігменти визначали у 30-денних рослин на спектрофлюориметрі після екстрагуванні етанолом [653]. Подрібнений матеріал розтирали у ступці,

переносили на фільтр (загальний об'єм розчинника 4 мл) та фільтрували. Сумарну концентрацію зелених пігментів ( $C_{a+b}$ ) у екстрактах визначали при довжині хвилі 652 нм та обчислювали за формулою:

$$C_{a+b} = 29 D_{652} \text{ (мг/л)}, \quad (2.6)$$

де  $D_{652}$  – оптична густина розчину при довжині хвилі 652 нм.

Концентрацію хлорофілів  $a$  ( $C_a$ ) і  $b$  ( $C_b$ ) визначали при довжині хвиль 665 і 649 нм і розраховували за формулами:

$$C_a = 11,63 D_{665} - 2,39 D_{649} \text{ (мг/л)}; \quad (2.7)$$

$$C_b = 20,11 D_{649} - 5,18 D_{665} \text{ (мг/л)}, \quad (2.8)$$

де  $D_{665}$ ,  $D_{649}$  – оптична густина розчину при довжині хвилі 665 та 649 нм.

Концентрацію каротиноїдів ( $C_{к+кс}$ ) визначали при довжині хвилі 440 нм за формулою:

$$C_{к+кс} = 4,695 D_{440} - 0,268 C_{a+b} \text{ (мг/л)}, \quad (2.9)$$

де  $D_{440}$  – оптична густина розчину при довжині хвилі 440 нм,  $C_{a+b}$  – визначена раніше сумарна концентрація зелених пігментів.

Вміст пігментів розраховували відповідно їх концентрації у розчині та масі вихідного матеріалу у мг/г маси листків. Контролем слугували нетрансформовані рослини того ж сорту, що вирощувалися *in vitro* в аналогічних умовах (склад живильного середовища, освітлення, температура).

## 2.21. Визначення швидкості росту трансгенних коренів

Швидкість росту трансгенних коренів визначали за приростом маси за фіксований період часу. Термінальні ділянки коренів довжиною 20 мм відокремлювали, зважували у асептичних умовах та культивували на поверхні агаризованого живильного середовищі 1/2МС у чашках Петрі при температурі +24°C. Через один місяць корені вилучали з чашок, промокали

фільтрувальним папером, зважували. Приріст маси  $\Delta m$  визначали за формулою:

$$\Delta m = m_1 - m_0, \quad (2.10)$$

де  $m_1$  – маса коренів через один місяць,  $m_0$  – вихідна маса коренів.

У кожному експерименті використовували по 20 ділянок коренів. Експерименти проводили у трьох повторностях.

## 2.22. Дослідження впливу регуляторів росту на ріст «бородатих» коренів

В експериментах як модель використовували трансгенні корені цикорію *C. intybus* L., отримані шляхом трансформації *A. rhizogenes* з вектором pCB161 [654]. Термінальні ділянки коренів завдовжки 10 мм культивували на агаризованому середовищі 1/2МС протягом 30 діб при  $t^{\circ} +24^{\circ}\text{C}$ . До живильних середовищ додавали індолілмасляну кислоту (ІМК),  $\alpha$ -нафтилоцтову кислоту (НОК) та регулятори природного походження Біолан і Чаркор (МНТЦ «Агробіотех», полікомпонентні регулятори, отримані з культури гриба, ізольованого з коренів жень-шеню – суміш амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, полісахаридів, фітогормонів, мікроелементів) у концентраціях 0.1; 0.5 мг/л та 0; 2,5; 5 та 10 мкл/л середовища. Визначали: початкову масу коренів ( $m_0$ ), масу коренів через 30 діб культивування ( $m_i$ ); приріст маси коренів ( $\Delta m$ ), суху масу ( $m_{i\text{-сух}}$ ), питомий вміст поліфруктанів (в мг/г сухої маси коренів), загальний вміст поліфруктанів (в мг/загальну суху масу коренів, що виростили за 30 діб).

## 2.23. Визначення вмісту поліфруктанів

Вміст поліфруктанів визначали за методикою, яка базується на здатності кетоцукрів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі

[655]. Для цього корені або пагони гомогенізували з дистильованою водою, залишали на 30 хвилин для екстрагування. Для аналізу використовували 0.1% спиртовий розчин резорцину. Зразки нагрівали на водяній бані при температурі +80-90°C протягом 10 хв., охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Паралельно проводили реакцію з резорцином розчинів фруктози концентрацією 0,62, 1, 25, 2,5 та 5 мг/мл. Концентрацію фруктанів визначали за калібрувальною прямою (калібрування проводили за розчинами фруктози). Виміри здійснювали у трьох повторностях.

2.24. Визначення особливостей накопичення поліфруктанів у трансгенних рослинах та коренях різних ліній

Для визначення особливостей накопичення поліфруктанів у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях рослин різних видів відповідні рослини або корені вирощували протягом одного місяця на агаризованому живильному середовищі 1/2МС при температурі +24°C та 16-годинному освітленні. Рослинні зразки зважували, гомогенізували, додавали визначений об'єм дистильованої води. Вміст фруктанів визначали у отриманих екстрактах відповідно до методики, описаної у розділі 2.20. У кожному експерименті використовували по 10 зразків.

2.25. Визначення оптимальних умов екстрагування поліфруктанів

У експериментах використовували «бородаті» корені цикорію *C.intybus*. Корені вирощували на агаризованому безгормональному середовищі Мурасиге і Скуга із вдвічі зменшеною концентрацією макроелементів (1/2МС) при температурі +24°C протягом шести тижнів. Для екстрагування фруктанів отримані корені промивали, висушували до постійної маси, перетирали у ступці (діаметр часток менше 1мм) і



використовували для подальших досліджень. Для екстрагування фруктанів по 50 мг висушених та розтертих коренів вміщували в епендорфи, додавали по 1 мл дистильованої води і витримували при кімнатній температурі (+22°C) протягом 0,5, 1 та 24 години. Після цього проводили теплову екстракцію фруктанів на водяній бані при температурі 70, 80 і 90°C протягом 10, 20 і 30 хв. Екстракт відділяли центрифугуванням протягом 5 хвилин, 15000 об./хв (мікроцентрифуга Eppendorf 5415C). Для визначення концентрації фруктанів у екстрактах користувалися методом, описаним у розділі 2.20.

#### 2.26. Визначення вмісту інтерферону у трансгенних коренях

Для визначення вмісту інтерферону рослинний матеріал зважували, розтирали з фосфатним буфером рН 7,4, центрифугували про 15000 g протягом 15 хвилин при +4°C, супернатант переносили у чисті пробірки. До осаду додавали модифікований фосфатний буфер з додаванням 1мМ інгібітора протеаз PMSF та 1% ДСН, ресуспендували, залишали на льоду на 30 хв., центрифугували при 3000 g протягом 15 хвилин при +4°C, супернатант и поєднували. Отриманий екстракт використовували для визначення вмісту інтерферону з набором реагентів «ProCon IF2 plus» (ТОВ «Протеїновий контур», Росія) відповідно до інструкції виробника.

#### 2.27. Визначення вмісту загального білка

Для приготування екстрактів листки рослин (100 мг) поміщали в охолоджену фарфорову ступку, додавали 300 мкл фосфатного буферу рН 7,4 та розтирали на льодяній бані. Отриманий гомогенат кількісно переносили в пробірку Eppendorf (1,5 мл) та центрифугували протягом 5 хв при 10000g (+4°C). Надосад відбирали, переносили в чистку пробірку та центрифугували протягом 25 хв при 16000g (+4°C). Аліквоту супернатанту

використовували для визначення концентрації білка за методом Бредфорда (мікроваріант методу) [656]. Для цього 100 мкл розбавленого в 50 разів супернатанту переносили в пробірку Eppendorf (1,5 мл), додавали 1 мл розчину кумасі бриліантового блакитного, перемішували та витримували протягом 3 хв при кімнатній температурі. Вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі Eppendorf при довжині хвилі 595 нм. Концентрацію вираховували, використовуючи калібрувальний графік за бичим сировотковим альбуміном у концентраціях 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 та 100 мкг/мл.

## 2.28. Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин та коренів

Для визначення противірусної активності використовували екстракти з трансгенних рослин та коренів. Для приготування екстрактів рослинний матеріал (корені або листки) зважували, поміщали у порцелянову ступку, додавали буфер та гомогенізували на льоду. Використовували буфер на основі Трис HCl або фосфатний буфер (табл. 2.11); також використовували модифікації буферів – додавали до них 1мМ інгібітора протеаз PMSF та 1% ДСН. Матеріал переносили до центрифужної пробірки і центрифугували 5 хв при 10000g (+ 4°C). Надосадову рідину відбирали, переносили в пробірку і центрифугували 25 хв при 16000g (+ 4°C). Аліквоту отриманого супернатанту використовували для визначення концентрації білка за методом Бредфорда (розділ 2.27). Отриманий екстракт зберігали у морозильнику при температурі -18°C та використовували для визначення противірусної активності. Таку активність екстрактів визначали за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту. Субстратзалежні клітини MDBK культивували в живильному середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з 10% сироватки новонародженого

теляти, 40 мкг / л гентаміцину у вологій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Через 2-3 доби, після того, як клітини утворювали на субстраті суцільний моношар, здійснювали їх пересів.

Таблиця 2.11 –

**Склад основних буферів, які використовували для екстрагування білка при тестуванні протівірусної активності**

Сполуки та розчини	Вміст сполук та розчинів у буферах (на 1 л буферу)	
	Фосфатний	Трис
NaCl	8,00 г	-
KCl	0,20 г	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 г	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 г	-
0,1N HCl	-	250 мл
0,2 М трис*	-	250 мл
Na <sub>2</sub> EDTA	-	5мМ
NaCl	-	100 мМ
2-меркаптоетанол	-	10мМ
сахароза	10 г	10 г
pH	7,4	8,0
* 0,2 М трис (оксиметил)-амінометан (24,3 г солі в 1 л дистильованої води)		

У лунки 96-лункового планшету вносили по 200 мкл суспензії клітин MDBK в середовищі DMEM з 5% сироватки новонародженого теляти з розрахунку 2,5 · 10<sup>6</sup> клітин/ планшет. Через 24 години в лунки планшета вносили вихідний розчин зразків і титрували п'ятикратними розведеннями. У якості стандарту використовували міжнародний стандарт інтерферону-альфа ВООЗ (70000 МО), також титрований 5-кратними розведеннями. Через 24 години у лунки вносили 100 цитотоксичних доз вірусу у середовищі DMEM з 2% сироватки новонародженого теляти. Дослідження проводили також за використання інтерферочутливих клітинних ліній ПТП (перевивна культура клітин тестикул поросят) та L41 (культура

субстратзалежних клітин кісткового мозку людини) за аналогічною методикою. Результати реєстрували через 24 години візуально при 100% цитопатичної дії у контролі вірусу.

## 2.29. Визначення антиоксидантної активності

Антиоксидантну активність визначали, використовуючи 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил радикал (DPPH). Для приготування екстрактів рослинний матеріал зважували, гомогенізували з дистильованою водою визначеного об'єму, центрифугували при 10000 g протягом 10 хв. Отриманий супернатант використовували для дослідження. Використовували розчин DPPH у 96% етиловому спирті (концентрація радикалу –  $10^{-4}$  М); реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. В кожну лунку планшету додавали розчин радикалу та відповідні розведення досліджуваних екстрактів. Об'єм екстрактів, що додавався, становив 10, 5, 2,5 та 1,25 мкл; кінцевий об'єм реакційної сумішів лунці становив 100 мкл. Реакційна суміш витримувалась при кімнатній температурі у темноті протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину суміші при довжині хвилі 550 нм. Крім цього, вимірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації в спирті (без додавання DPPH). У якості позитивного контролю використовували водний розчин аскорбінової кислоти концентрацією 1 мг/мл. Кількісно поглинання вільного радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою:

$$A(k) - A(e) / A(k) \cdot 100, \quad (2.11)$$

де  $A(k)$  – оптична щільність контрольного розчину

$A(e)$  – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту

### 2.30. Визначення ДНК-протекторної активності екстрактів з трансгенних зразків

Визначення ДНК-протекторної активності екстрактів проводили, використовуючи метод кометного електрофорезу, який дозволяє кількісно оцінити ступінь пошкодження ДНК після дії УФ опромінення. Рослини вирощували на агаризованому середовищі МС при температурі +24°C та 16-годинному освітленні. Для приготування екстрактів рослини зважували, розтирали у фосфатному буфері (рН 7,4), стерилізували фільтруванням.

Для кометного електрофорезу використовували лімфоцити периферичної крові людини. Клітини ресуспендували в культуральному середовищі RPMI 1640, суспензію розділяли на чотири аліквоти. Першу піддавали УФ опроміненню (280 нм) дозою 40 Дж/м<sup>2</sup> для індукції тимінових димерів, витримували при 37°C для їх вирізання і появи розривів в ДНК (негативний контроль). Другу (дослід) інкубували 1 год. у термостаті при 37°C з 200 мкл екстракту, опромінювали і витримували в термостаті при 37°C. Третю аліквоту не піддавали ніякому впливу (позитивний контроль). Клітини четвертого варіанту обробляли екстрактами, але не опромінювали (контроль дії екстракту). По 50 мкл з кожної суспензії лімфоцитів змішували з 100 мкл 1% -го розчину легкоплавкої агарози, 25 мкл суміші наносили на предметне скло, заплавляли в 1% розчин тугоплавкої агарози. Отримані слайди витримували 3-5 хв при температурі +4° С, занурювали у лізуючий буфер (2,5 М NaCl, 100 м EDTA, 10 м Tris-HCl (рН 8,0), 1% Triton X-100). Лізис проводили 2 години при +4° С. Препарати витримували в ТБЕ буфері (0,089М Tris, 0,089М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,002М EDTA, рН 7,5) 10 хв і проводили нейтральний електрофорез (4° С, 1 В/см, 300 мА). Аналіз препаратів проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії, використовуючи барвник DAPI. Фотографували не менше 100 випадково вибраних клітин, аналіз зображення проводили у програмі Comet Score, визначаючи відсоток ДНК в хвостах комет.

### 2.31. Визначення протимікробної активності екстрактів з рослин та «бородатих» коренів

Для приготування екстрактів рослинний матеріал подрібнювали, до 0.2г зразків додавали етанол, ДМСО або дистильовану воду, перемішували і залишали при кімнатній температурі на 3 години для екстракції. Отриманий супернатант тестували на предмет наявності антимікробної активності проти *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B918, а також використовували бактерії *Micrococcus luteus* 3201, *Sporosarcina aquimarina* 188n2, *Microbacterium trichothecenolyticum* 3208 (о. Галіндез, Антарктика, ґрунт), *Bacillus simplex* 3s2 та *Bacillus mojavenis* 2s1 (Крим, Україна, гіперсолале озеро), *Kocuria carniphila* H7, *Micrococcus luteus* H8 (пустеля Негев, Ізраїль), *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* 1т3, *Bacillus licheniformis* 7т1 (Мертве море, Ізраїль), *Chryseobacterium shigense* 15A1, *Kocuria* sp. 3A (літоральна зона оз. Байкал, Росія), *Citrobacter freundii* (Сумська обл., Україна), *Arthrobacter oryzae*, *Rhodococcus erythropolis* (Карстова порожнина Мушкарова яма, Україна) з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. з колекції відділу екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Інгібуючий ефект визначали диск-дифузним методом (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993). 0.02 мл рослинних екстрактів наносили на стерильні диски (6 мм) з фільтрувального паперу і залишали для випаровування екстрагентів. Диски з нанесеними на них розчинниками використовували у якості негативного контролю. Диски з антибіотиками тетрацикліном, оксациліном, гентаміцином, ципрфлораксацином були використані у якості позитивного контролю. Бактерії культивували у чашках Петрі протягом 24 год при температурі 28°C (ґрунтові мікроорганізми) або 37°C (*E. coli* та *S. aureus*). Антимікробну активність визначали за діаметром зони інгібування росту, яку вимірювали через 24-48 годин.

### 2.32. Статистична обробка результатів

Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу [657]. Риски на діаграмах відповідають довірчим інтервалам (рівень вірогідності 0,95). При середньому значенні відсотків менше 25% та більше 85% довірчі інтервали визначали за скоригованою формулою 
$$\pm z \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$
 для  $n$  відсотків.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### РОЗДІЛ 3

#### ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЇСТІВНИХ РОСЛИН - ПРОДУЦЕНТІВ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ ТА ІНШИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

Напрямок генетичної інженерії, пов'язаний з перенесенням до їстівних рослин генів, які кодують синтез фармакологічних білків, досить активно розробляється протягом останніх років. Генетична трансформація рослин, які використовуються у їжу, є способом отримання так званих “їстівних вакцин”. Харчові культури, які не потребують перед уживанням термообробки, можуть стати природним, готовим до споживання продуктом для профілактики та лікування низки захворювань [16]. Фармацевтичні препарати рослинного походження мають ряд переваг. Їх виробництво та зберігання має відносно невелику вартість, вони придатні для масового виробництва [658]. Механізм імунізації такими “їстівними вакцинами” базується на розпізнаванні М-клітинами епітелію тонкого кишечника чужорідного білка, що має антигенні властивості. Нехарчові культури є потенційними виробниками – біофабриками цільових білків, які можуть бути виділені та очищені [659].

Нами було визначено можливість оптимізації методики генетичної трансформації стосовно їстівних рослин *Lactuca sativa* L. та *Cichorium intybus* L., виявлено параметри процесу, які впливають на частоту формування трансгенних рослин. З використанням оптимізованої методики було отримано трансгенні рослини та «бородаті» корені рослин цих видів з генами, що кодують синтез рекомбінантних білків медичного призначення – інтерферону- $\alpha 2b$  людини або антигенів мікобактерій.



### 3.1. Трансформація рослин цикорію

Одним з об'єктів генетичної інженерії є цикорій, який має ряд лікувальних властивостей і легко культивується *in vitro*. Ця рослина проявляє протизапальну, імуностимулюючу, антиоксидантну, противиразкову, протипухлинну, кардіотонічну активність і використовується для лікування діабету та інших захворювань [660- 662]. На основі трансгенних рослин, у тому числі листового цикорію, можуть бути створені «їстівні» вакцини – рослини, що мають гени бактеріальних антигенів і продукують імуногенні білки.

3.1.1. Використання *Agrobacterium tumefaciens* для отримання трансгенних рослин цикорію з геном *esxA* антигена ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.1.1. Визначення оптимальних умов генетичної трансформації та отримання трансгенних рослин. Для трансформації, яку здійснювали шляхом кокультивування експлантів з *A. tumefaciens*, використовували сім'ядолі 10 - 12 - денних проростків, на яких попередньо робили поперечні надрізи. Векторна конструкція pCB063 мала селективний ген неоміцинфосфотрансферази II *nptII*, що визначає стійкість до канаміцину (nos промотор), а також цільовий ген *esxA* антигена ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis* під контролем промотора гена 35S-білка з геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Селекцію трансгенних рослин проводили на середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину, оскільки було показано, що така концентрація антибіотика є селективною (рис. 3.1).

Відомо, що чим більше частота регенерації, тим більше ймовірність отримання рослин з трансформованої ДНК. Зокрема, раніше нами було показано, що частота трансформації салату конструкціями pCB063 і pCB064 залежить від регенераційної здатності рослин [507]. Саме тому у



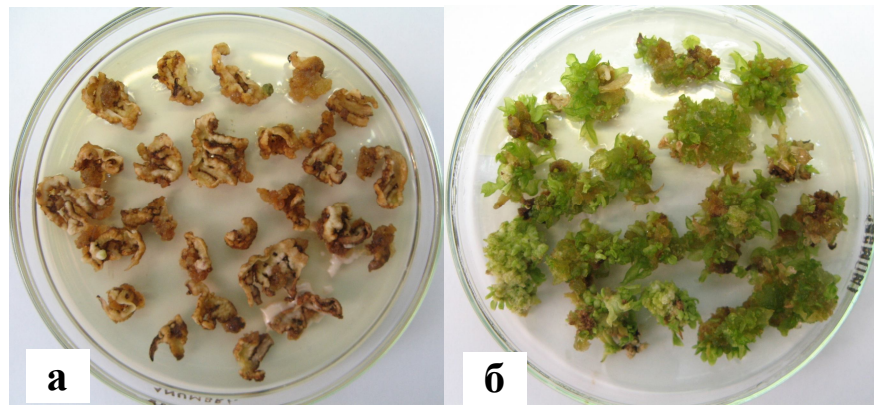


Рис. 3.1 – Регенерація пагонів цикорію на живильному середовищі з канаміцином у концентрації 25 мг/л (а) та без канаміцину (б)

Показано, що найменша частота регенерації зелених рослин спостерігалася у варіантах № 1 та № 4 за умов вирощування: одна або дві доби без цефотаксиму, потім одна доба без канаміцину (рис. 3.2, стовпчики 1 та 4). При збільшенні часу вирощування без канаміцину з 1 до 7 або 14 діб кількість експлантів із зеленими рослинами, що регенерували, збільшувалася, причому ця величина практично не залежала від того, 1 або 2 доби культивували на середовищі без цефотаксиму (рис. 3.2, стовп. 2, 3, 5, 6).

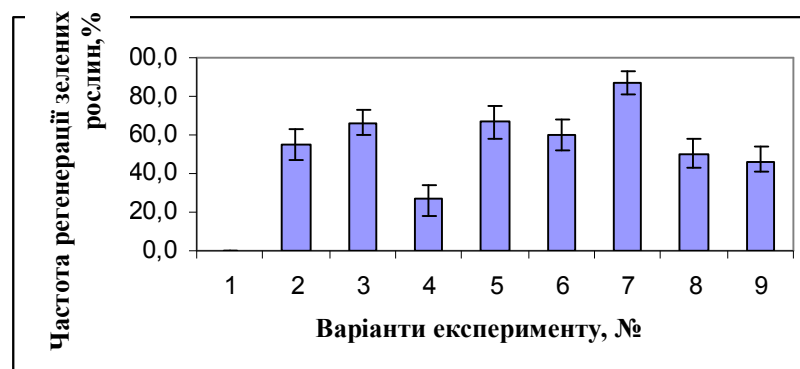


Рис. 3.2 – Залежність частоти регенерації зелених рослин від умов проведення експерименту (варіанти №№ 1-9 див у табл. 3.1)

У наших експериментах збільшення часу вирощування у відсутності цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій, з 1 до 3 діб (варіант № 7) приводило до значного підвищення частоти регенерації зелених рослин (з

0 до 86 %). Очевидно, причиною є істотне збільшення ймовірності проникнення агробактерій в клітину, подальшого перенесення трансформуючої ДНК і вбудовування генів агробактерій у рослинний геном. У той же час, при збільшенні тривалості періоду, при якому відсутній селективний тиск, частота регенерації зелених рослин зменшувалася, спостерігалася збільшення білих (чутливих до канаміцину) рослин.

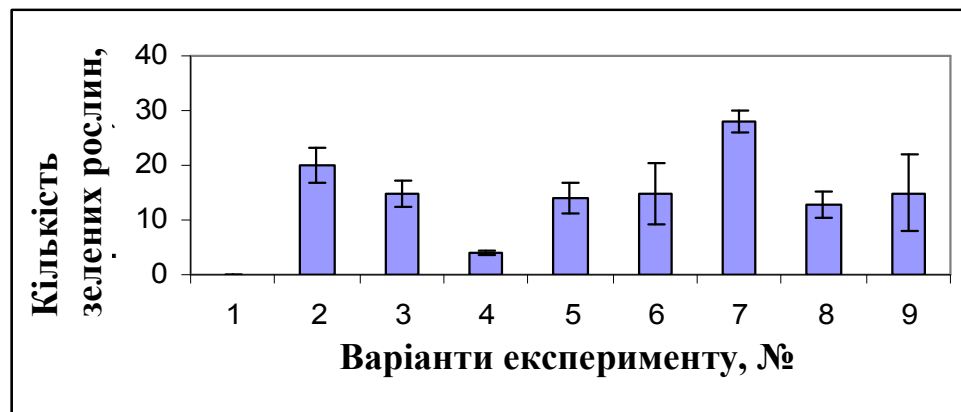


Рис. 3.3 – Залежність кількості зелених рослин, які регенерували після трансформації, від умов проведення експерименту (варіанти експерименту №№ 1-9)

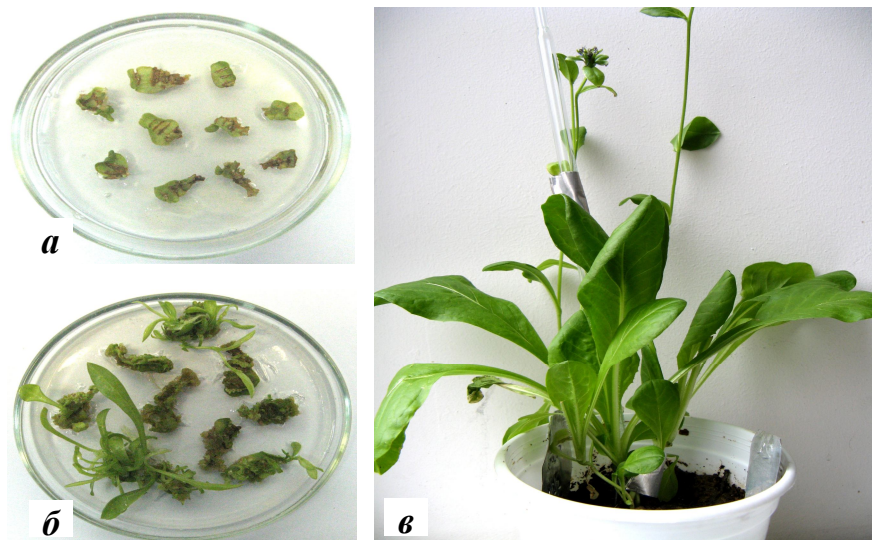


Рис. 3.4 – Регенерація та ріст трансгенних рослин, стійких до канаміцину, отриманих у варіантах експерименту № 1 (а) та № 7 (б, в)

Відомо, що процес трансформації за допомогою *A. tumefaciens* складається з декількох етапів: прикріплення бактерії до стінки рослинної

клітини, проникнення T-ДНК усередину клітини рослини, інтеграції T-ДНК в геном і експресії генів T-ДНК. Факторами, що визначають частоту і ефективність трансформації, є час культивування з агробактеріями у відсутності антибіотика, який пригнічує ріст бактерій (у даному випадку, цефотаксиму), час, протягом якого відсутній селективний тиск (культивування без канаміцину), а також регенераційна здатність рослин, які трансформують. Досліджувані рослини характеризувалися високою регенераційною здатністю, отже, цей параметр у експериментах був оптимальним. Щодо безпосередніх умов трансформування, проведеними дослідженнями визначено, що збільшення часу вирощування у відсутності цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій, тобто, збільшення часу контактування рослинних експлантів з фізіологічно активними агробактеріями з 1 до 3 діб приводило до значного підвищення частоти регенерації зелених рослин. Важливим моментом, який також впливав на кількість отриманих у селективних умовах зелених (трансформованих, стійких до селективного антибіотика) рослин, виявився час додавання до живильного середовища канаміцину.

Таким чином, оптимальними умовами трансформації, що давали можливість з високою частотою отримати трансформовані рослини, виявилися такі: культивування протягом трьох діб на живильному середовищі без антибіотиків; на третю добу додавання до середовища цефотаксиму; ще через добу – додавання селективного антибіотика [665]. Використання такої оптимізованої схеми трансформації дало можливість отримати зелені у селективних умовах рослини з частотою до 86%. Визначена оптимізована методика була у подальшому використана для генетичної трансформації рослин інших видів.

3.1.1.2. Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після трансформації. Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин наявність перенесених генів (цільовий та

селективний) визначали методом ПЛР, беручи для аналізу рослини вибірково. Показано, що усі аналізовані рослини мали як цільовий, так і селективний гени (рис. 3.5, табл. 3.2).

Рослин, що мали селективний і цільовий гени, аналізували на наявність зворотних транскриптів. Ген *nptII* транскрибувався в усіх аналізованих рослинах, в той час як у 37,5% аналізованих рослин транскрипцію цільового гена не детектували (рис. 3.5).

Таблиця 3.2 –

**Результати ПЛР-аналізу рослин цикорію, отриманих після трансформування плазмідом pCB063**

Варіант експерименту	Кількість зелених рослин					
	Отримано	Аналізовано методом ПЛР				
		Усього	ПЛР +		ПЛР -	
			<i>nptII</i>	<i>esx</i>	<i>nptII</i>	<i>esx</i>
		<i>I</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	
1	0	-	-	-	-	-
2	20,0±3,3	2	2	2	0	0
3	15,0±2,4	2	2	2	0	0
4	3,6±0,5	-	-	-	-	-
5	14,0±2,8	2	2	2	0	0
6	15,0±5,6	2	2	2	0	0
7	28,3±2,1	3	3	3	0	0
8	13,0±2,4	3	3	3	0	0
9	15,3±7,7	3	3	3	0	0

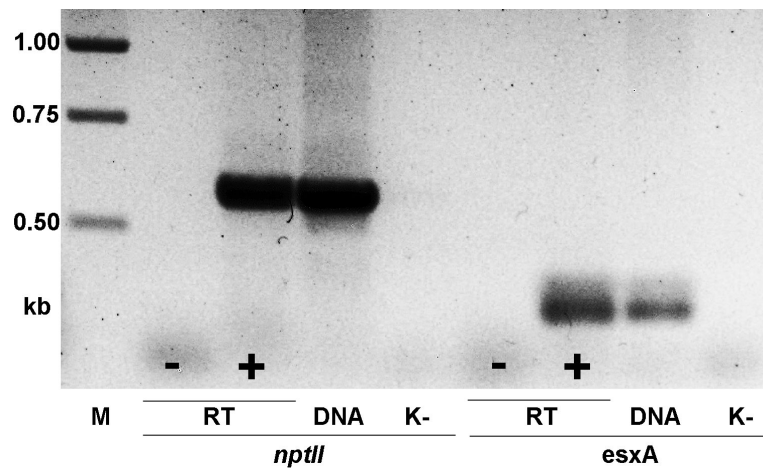


Рис. 3.5 – Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу зворотних транскриптів та геномної ДНК рослин цикорію, трансформованих вектором pCB063: М – маркер O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder SM1163, Fermentas; DNA – ДНК трансгенної рослини; К – ДНК контрольної рослини; RT- и RT+ – ЗТ-ПЛР у відсутності ревертази та з ревертазою; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II; *esxA* – ген антигена ESAT6

Так зване "мовчання генів" має місце при трансформації ядерної ДНК і може виникнути у разі присутності в рослинному геномі послідовності ДНК, гомологічної гену, що переносять, а також при вбудовуванні великого числа копій гена на геном, при метилюванні перенесеної послідовності ДНК, при утворенні ДНК- дуплексу повторюваних генів [665]. В той же час, відсутність транскрибування цільового гена не є наслідком використаних саме таких застосованих умов трансформування.

Таким чином, було визначено оптимальні умови проведення генетичної трансформації рослин цикорію, які забезпечують найбільшу частоту регенерації зелених рослин і найбільшу кількість рослин з трансформованою ДНК. Ефективна трансформація досягалася при культивуванні сім'ядольних експлантів протягом 3 діб без цефотаксиму і потім 1 добу без канаміцину. При цьому частота трансформації становила до 86%, а кількість трансгенних рослин – 4-5 на експлант. Проведений

ПЛР аналіз показав, що як селективний, так і цільові гени були детектовані у всіх аналізованих рослинах. Разом з тим, виявлено, що не у всіх трансгенних рослинах цільовий ген транскрибувався. Однак, транскрипція як цільового, так і селективного генів у більш ніж 50% аналізованих рослин дозволяє вважати можливим використання методу агробактеріальної трансформації для отримання трансформованих рослин цикорію [664].

3.1.2. Трансформація рослин цикорію з використанням агропінового штаму *Agrobacterium rhizogenes*. Використання методу «листових дисків», при якому експлантами для трансформації слугують частини листків або цілі листки зі зробленими на них надрізами, є зручним способом генетичної трансформації широкого кола рослин за допомогою бактерій роду *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*). Наявність такого методу трансформації дозволяє у досить короткий термін отримати трансформовані рослини та корені і не вимагає додаткового обладнання [666]. Нами в якості експлантів були використані сім'ядолі проростків цикорію для трансформування бактерією *A. rhizogenes*.

Вихідним матеріалом для дослідження являлися сім'ядолі 10-денних проростків цикорію *C. intybus* L. Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 з векторними конструкціями pCB158 [666] та pCB161 [667]. Вектори мали відповідно цільові гени: злилу послідовність *esxA::fbpB<sup>ΔTMD</sup>* під контролем коренеспецифічного промотора *Mll* цукрового буряка та *ifn-α2b* під контролем промотора гена 35S-білка з геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Вектор pCB161 містив кальретикуліновий сигнал перед кодуючою частиною гена *ifn-α2b* для перенаправлення білка в ендоплазматичний ретикулум і далі в апопласт. Обидва вектори містили селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) під контролем промотора гена нопалінсинтетази.



Трансформування проводили згідно з оптимізованою раніше (розділ 3.1.1.1) методикою трансформації. Після кокультивування з бактеріальною суспензією експланти переносили на 3 доби на середовище 1/2МС і далі – на селективне середовище, що містило 25 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерій. Субкультивування отриманих трансгенних ліній проводили кожні три тижні шляхом перенесення кінчиків коренів на середовище 1/2МС з канаміцином та цефотаксимом.

Через 10 - 12 діб на сім'ядольних експлантах спостерігали ріст коренів. Корені довжиною близько 10 мм відділяли від листків та переносили на селективне середовище, що не містило регуляторів росту. Отримані корені характеризувалися швидким ростом, значним галуженням та відсутністю позитивного геотропізму (рис. 3.6).



Рис. 3.6 – Ріст «бородатих коренів» цикорію на середовищі без регуляторів росту

Відомо, що частота трансформації залежить від ряду факторів, у тому числі, від конструкції, яку використовують [494-496]. В наших експериментах частота отримання «бородатих коренів» при використанні агробактерій з різними конструкціями (за однакових умов трансформації) відрізнялася. Так, частота отримання «бородатих коренів» (відносна кількість експлантів з коренями до загальної кількості експлантів у відсотках) для pCB161 становила 42,3 %, для pCB158 – лише 5,9 %, при

використанні дикого штаму агробактерій A4 – 76%. Разом з тим, хоча частота формування коренів на експлантах після трансформування агробактеріями варіювала, було отримано «бородаті» корені з достатньо високою частотою – до 76%. У раніше опублікованих дослідженнях з отримання трансгенних коренів цикорію сорту Lucknow local використовували *A. rhizogenes* LMG 150, однак автори не наводили дані щодо частоти формування коренів, повідомивши лише про отримання «декількох» ліній [491, 493]. Таким чином, оскільки частота регенерації в наших дослідженнях виявилася досить високою та усі отримані лінії продовжували гормонезалежний ріст протягом п'яти років культивування, можна стверджувати, що оптимізована нами та застосована методика виявилася ефективною для даного об'єкту.

3.1.3. Регенерація рослин з трансгенних коренів цикорію. При культивуванні трансгенних коренів на селективному середовищі за умов освітлення через 1 місяць спостерігали пряме (без утворення калусу) формування пагонів (рис. 3.7). При цьому відбувалося позеленіння і невелике потовщення коренів. Рослини формувалися на коренях всіх ліній рослин, отриманих після трансформації, крім однієї. На коренях цієї лінії пагони не формувалися навіть при тривалому культивуванні (більше трьох років).

Регенерація рослин є невід'ємним етапом отримання трансгенних рослин незалежно від того, який метод трансформації (агробактеріальна, біоліств'чна) використовується, а також які експланти (листя, корені, протопласти) піддаються трансформації. Дуже часто саме цей етап буває лімітуючою ланкою у процесі отримання рослин з трансформованим геномом, оскільки ефективність регенерації рослин видо- і сортозалежна. Цикорій має високу здатність до регенерації рослин з різних експлантів. Так, нами [663] було показано, що частота регенерації рослин сорту Пала росса з сім'ядоль становить 100%. Експлантами для отримання рослин

цикорію можуть бути листки [163, 474, 669], корені [487, 489, 670]. Можлива регенерація рослин цього виду через стадію утворення калусу [487, 670, 671], ембріодів [672-673], а також пряма регенерація [674]. Після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* трансгенні рослини ряду видів зазвичай можуть бути отримані як з утворених «бородатих коренів», так і в окремих випадках безпосередньо в результаті прямої регенерації з експлантів, які культивували з агробактеріями [675-677]. Регенерація рослин з трансгенних коренів може бути спонтанною або індукуватися регуляторами росту, причому регенерація може бути як прямою, так і через стадію формування калусу [678-682]. Формування рослин-регенерантів може бути світлозалежним [683] або не залежати від освітленості [684].

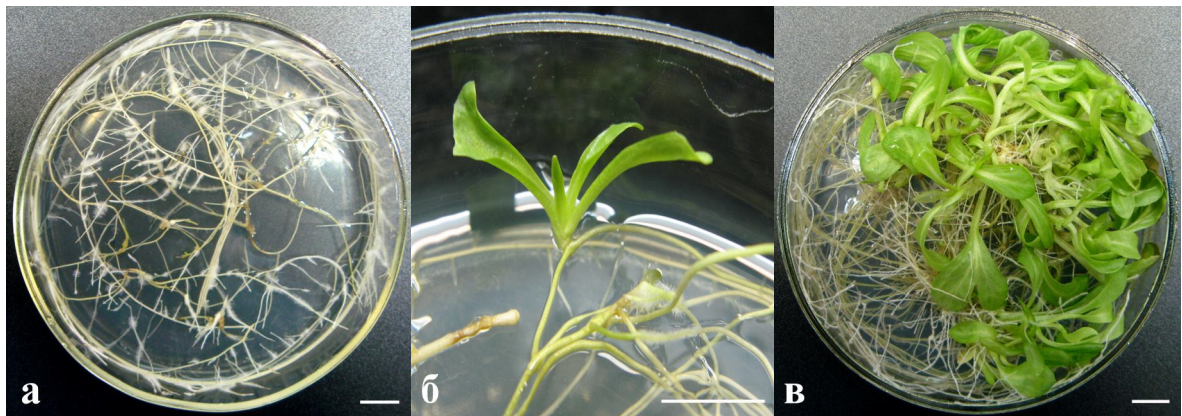


Рис. 3.7 – Регенерація рослин після трансформації *A. rhizogenes*: **а** – ріст «бородатих коренів»; **б, в** – формування пагонів на трансгенних коренях. Масштабний відрізок – 1 см

У наших експериментах регенерація пагонів після трансформації *A. rhizogenes* безпосередньо з використаних експлантів була відсутня, а процес формування пагонів відбувався саме на отриманих трансгенних коренях. (рис.3.7, б, в). Після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації цикорію для росту таких пагонів не виникала необхідність у використанні регуляторів росту, утворення пагонів відбувалося спонтанно при культивуванні на середовищі 1/2МС. При цьому калусна тканина не утворювалася. Пагони формувалися тільки при вирощуванні культури

коренів при освітленні, причому регенерація відзначена для всіх отриманих трансгенних ліній «бородатих коренів» крім одної, а час початку регенерації від моменту трансформації становив 6-8 тижнів. Регенерація рослин з ізольованих коренів дикого типу при тих же умовах була відсутня. Отже, процес регенерації пагонів після трансформування цикорію з використанням *A.rhizogenes* був гормонезалежним та світлозалежним.

Отримані лінії трансгенних коренів (як з вектором pCB158, так і з pCB161 або лише з генами агробактерій) мали високий регенераційний потенціал. Ці корені не втрачали здатності до регенерації навіть при тривалому культивуванні в оптимальних для регенерації умовах (на світлі). Укорінення відокремлених пагонів відбувалося на безгормональному живильному середовищі 1/2МС. Отримані укорінені рослини пересаджували у ґрунт.

Рослини, отримані з культури Ri-коренів, переважно мають характерний змінений фенотип: зморщені листки, укорочені міжвузля, розгалужені стебла, порушення апікального домінування, розвинену плагіотропну кореневу систему, змінену морфологію квітки, зниження фертильності. Спектр рослин, отриманих після трансформації *A. rhizogenes*, включає як рослини з яскраво вираженим Ri-фенотипом, так і рослини з мінімальними порушеннями морфології або взагалі без них [678, 685, 686]. Ступінь виявленості Ri-фенотипу трансгенних рослин залежить від експресії *rol* генів. «Мовчання» цих генів або інші особливості призводять до формування пагонів з фенотипом дикого типу. Для розеткових рослин, до яких належить і цикорій в перший рік вегетації, після трансформації *A. rhizogenes* вкорочення міжвузлів не є характерною ознакою Ri-фенотипу, в той же час може спостерігатися цвітіння без верналізації [183].

Отримані трансгенні рослини цикорію [664, 667] як в культурі *in vitro*, так і в умовах теплиці, не відрізнялися від контрольних. Разом з тим,

трансгенні рослини швидше формували корені. Для рослин, трансформованих *A. rhizogenes* з вектором, який мав ген *ifn- $\alpha$ 2b*, спостерігалось швидке (через 2-3 місяці після трансформації) *in vitro* формування квітконоса, що відрізняло їх від контрольних рослин, які мають типову для цикорію розеткову форму (рис. 3.8). Аналогічне явище нами раніше спостерігалось у рослин цикорію, трансформованих *A. tumefaciens* з вектором pCB124 з геном *ifn- $\alpha$ 2b*. У той же час, не спостерігали цвітіння у перший рік вирощування рослин цикорію, отриманих нами після трансформації векторами pCB063 і pCB158 з генами туберкульозних антигенів ESAT6 і Ag85B.

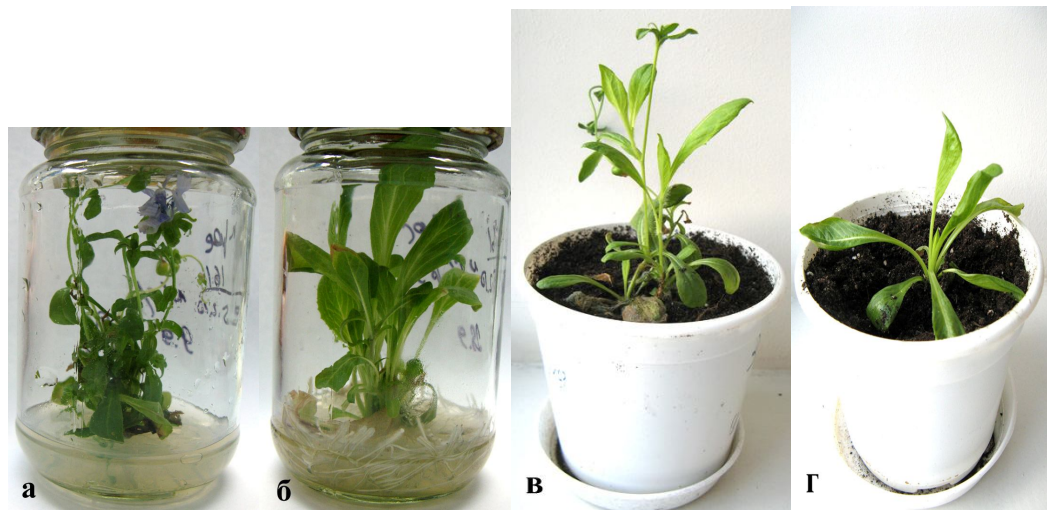


Рис. 3.8 – Формування квітконоса у трансгенних рослин з геном *ifn- $\alpha$ 2b* (а, в) та розеткова форма (б, г) контрольної рослини в культурі *in vitro* (а, б) та у ґрунті (в, г)

Раніше було показано можливість регенерації пагонів з «бородатих» коренів цикорію, причому, у цих дослідженнях, так само як і у наших, регенерація була гормонезалежною [492, 493]. Разом з тим, автори повідомляють про те, що лише деякі лінії трансгенних коренів мали здатність формувати пагони, які укорінювалися та цвіли в умовах *in vitro*. У наших експериментах також було отримано регеновані з «бородатих» коренів пагони, які укорінювалися на середовищі без регуляторів росту та

цвіли через короткий термін після формування (2-3 міс.), незважаючи на те, що рослини цього виду є дворічними. Вірогідно, такий ефект є наслідком генетичної трансформації (перенесення чужорідних генів), при якій можуть відбуватися зміни у експресії генів рослин, що призводить у тому числі і до фенотипових та фізіологічних змін.

3.1.4. Молекулярно-біологічний аналіз коренів та рослин цикорію, отриманих після трансформації. Це у 90-х роках 20 ст. було визначено, що  $T_L$  фрагмент Т-ДНК плазмиди pRi агропінового типу містить гени *rolA*, B, C, D, які задіяні у процесі коренеутворення і відповідають за фенотип «бородатих коренів» [687, 688]. Отже, наявність цих генів свідчить про перенесення фрагмента бактеріальної Т-ДНК до рослин у процесі трансформування. У нашій роботі для підтвердження факту перенесення  $T_L$ -фрагмента Т-ДНК плазмиди pRi до коренів цикорію проводили ПЛР з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*. У результаті ампліфікації фрагмент ДНК розміром 780 п. н. знайдено в усіх аналізованих зразках, трансформованих як конструкцією pCB161 (8 ліній), так і pCB158 (1 лінія) або диким штамом агробактерій (рис. 3.9).

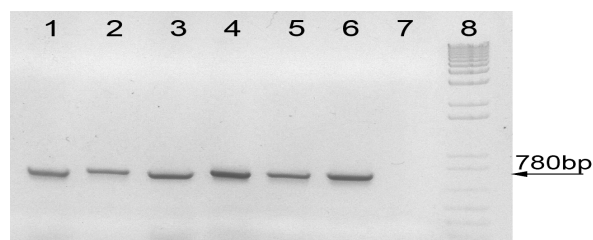


Рис. 3.9 – Електрофореграма продуктів ПЛР з використанням ДНК «бородатих коренів» цикорію, праймери до *rolB* гена: 1- позитивний контроль, ДНК *A. rhizogenes*; 2-6 – ДНК «бородатих коренів»; 7 – ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 8 –маркер (GibcoBRL 1kb Plus DNA Ladder)



Таким чином, дійсно відбулося перенесення T<sub>L</sub>-фрагменту Т-ДНК плазміди pRi, що і зумовило утворення гормонезалежних коренів типового фенотипу.

ПЛР-аналіз загальної ДНК коренів, отриманих після трансформації *A. rhizogenes* з вектором pCB161, виявив присутність як селективного гена *nptII*, так і цільового *ifn-α2b* (рис. 3.10, а). Аналіз коренів, отриманих після трансформації вектором pCB158, також показав присутність селективного та цільового гена (рис. 3.10, б).

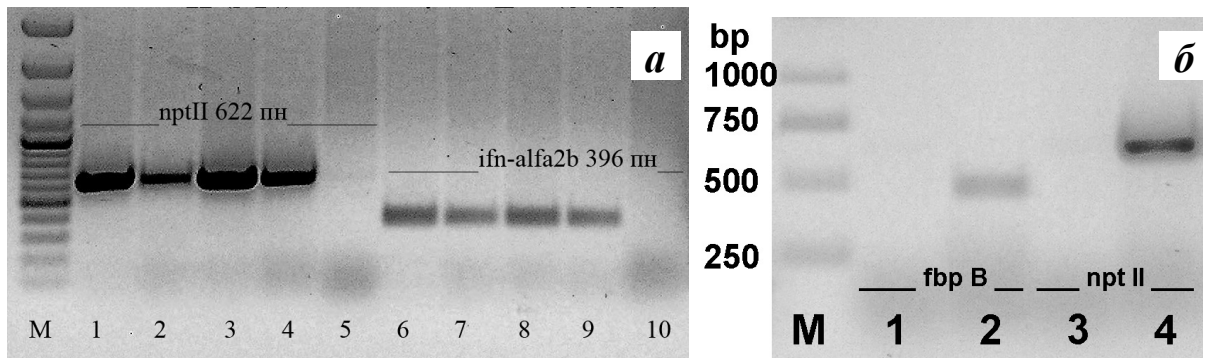


Рис. 3.10 – Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням праймерів, специфічних до генів *ifn-α2b* (а), *fbpB*<sup>ΔTMD</sup> (б), *nptII* (а, б); а: М – маркер 100 bp Plus DNA Ladder SM1153, Fermentas; 1-4, 6-9 – ДНК трансгенних коренів; 5, 10 – ДНК контрольної рослини; б: М – маркер O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder SM1163, Fermentas; 1, 3 – ДНК контрольної рослини; 2, 4 – ДНК трансгенного кореня

Для коренів, отриманих після трансформації вектором pCB161, було проведено вибіркового ПЛР-аналіз зворотних транскриптів селективного та цільового генів. Показано, що в усіх аналізованих лініях відбувалася транскрипція селективного та цільового генів (рис. 3.11). Таким чином, в аналізованих лініях не спостерігали явище мовчання генів, яке раніше було виявлено нами при трансформації рослин салату і цикорію конструкціями з генами інтерферону та антигенів мікобактерій.

Регеновані з «бородатих» коренів рослини мали зелене забарвлення листків на селективному середовищі з канаміцином, отже, вірогідно, мали так само як і вихідні трансгенні корені, перенесений ген

*nptII*. За допомогою ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізів визначили, що регенеровані рослини мали як селективний, так і цільовий гени (рис. 3.12), ці гени транскрибувалися ((рис. 3.13).

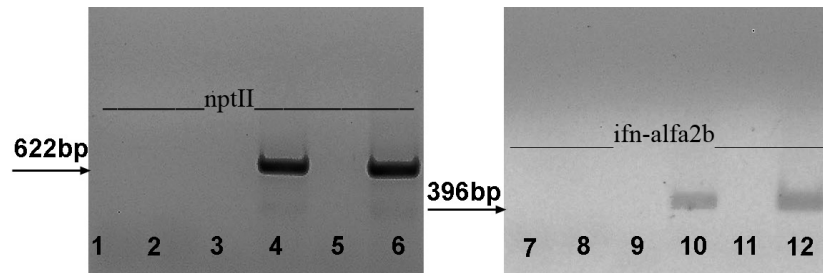


Рис. 3.11 – Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу зворотних транскриптів генів *nptII* (1-6) та *ifn- $\alpha$ 2b* (7-12): парні треки – синтез зворотних транскриптів у присутності ревертази, непарні – ЗТ-ПЛР без ревертази; 1, 2, 7, 8 – контрольні рослини, 3-6, 9-12 – трансгенні корені цикорію

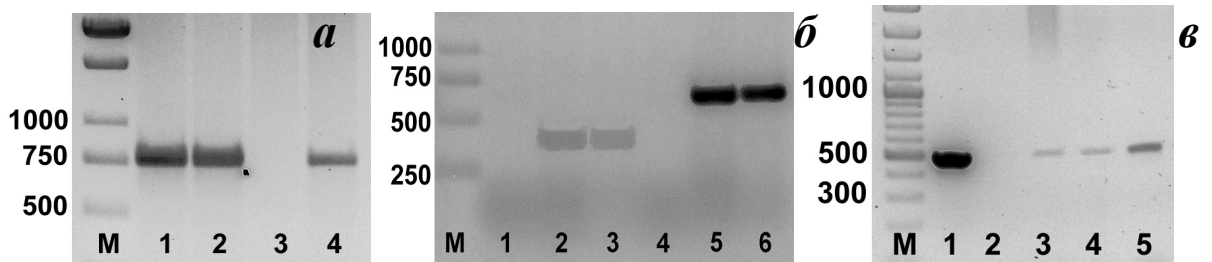


Рис. 3.12 – Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу регенерованих з «бородатих» коренів рослин цикорію з використанням праймерів до генів *rolB* (а), *ifn- $\alpha$ 2b* (б, 1-3), *nptII* (б, 4-6), та *fbpB<sup>ATMD</sup>* (в): а – М – ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas), 1, 2 – сумарна ДНК рослин, трансформованих рСВ161, 3 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини, 4 – позитивний контроль, плазмідна ДНК рСВ161; б – М – ДНК маркер (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas), 1, 4 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини, 2, 3, 5, 6 - сумарна ДНК рослин, трансформованих рСВ161; в – М – ДНК-маркер 100bp Plus DNA Ladder SM1153, Fermentas, 1 – позитивний контроль, плазмідна ДНК РСВ158, 2 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини, 3-5 – сумарна ДНК рослин, трансформованих вектором рСВ158.



Таким чином, уперше показано можливість використання *A. rhizogenes* для отримання культури трансгенних коренів цикорію [667, 668], які ростуть на живильному середовищі без регуляторів росту та мають ген *ifn- $\alpha$ 2b* або гени мікобактерій. Трансформовані корені цикорію отримано з частотою – 42,3 % при трансформуванні конструкцією pCB161 з геном *ifn- $\alpha$ 2b* та 5,9 % при використанні вектора pCB158 зі зливою послідовністю *esxA::fbpB<sup>ATMD</sup>* генів туберкульозних антигенів. В усіх аналізованих лініях коренів цикорію згідно з результатами ПЛР аналізу відбулося перенесення T<sub>L</sub>-фрагменту T-ДНК плазміди pRi, що зумовило утворення гормонезалежних коренів типового фенотипу. Методом ПЛР та ЗТ-ПЛР підтверджено наявність і транскрибування перенесених генів.

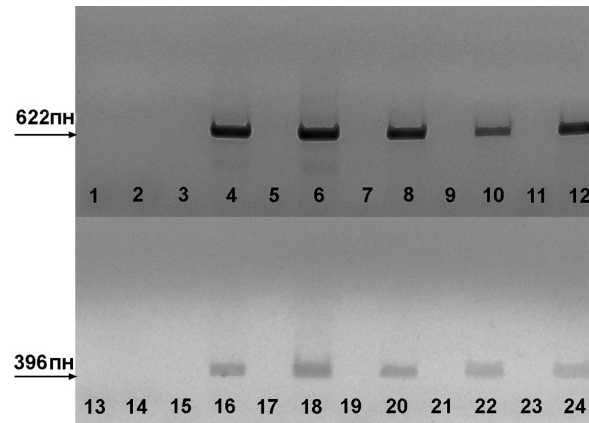


Рис. 3.13 – Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР аналізу регенованих з «бородатих» коренів рослин цикорію з використанням праймерів до генів *nptII* (1-12) та *ifn- $\alpha$ 2b* (13-24). 1, 2, 13, 14 – контроль; 3-12 та 16-24 – трансгенні рослини; непарні – без ревертази; парні – з ревертазою.

З отриманих після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* коренів регеновано пагони, які швидко укоріювалися на безгормональному середовищі 1/2МС. Регенерація рослин спостерігалася безпосередньо на коренях (без утворення калусних тканин), була світлозалежною і гормонезалежною. Аналізовані регеновані з трансгенних коренів

рослини мали селективний і цільові *ifn- $\alpha$ 2b* та *esxA* :: *fbpB* <sup>$\Delta$ TMD</sup> гени, а також ген *rolB* *A. rhizogenes*.

Отримані корені можуть становити практичний інтерес, оскільки у «бородатих» коренях можуть накопичуватися як сполуки, що синтезуються рослинами в природних умовах, так і сполуки, синтез яких кодується перенесеними генами. Для таких трансформованих коренів властивий швидкий ріст і, таким чином, значне накопичення біомаси [689, 690]. Крім того, технологія їх культивування *in vitro* є маловитратною, адже трансформовані корені ростуть на «мінімальному» середовищі (без регуляторів росту, зі зменшеним вмістом макро- та мікроелементів), не вимагають освітлення. Такі особливості привертають увагу до культури «бородатих корені» як продуцентів ряду сполук, в тому числі тих, що мають лікувальні властивості [691-695].

### 3.2. Генетична трансформація рослин салату

3.2.1. Використання *Agrobacterium tumefaciens* для трансформування рослин салату. Для генетичної трансформації рослин салату сорту «Рубінове мереживо» використовували у якості вихідних експлантів сім'ядолі культивованих *in vitro* 10-14 денних проростків. Трансформації проводили із застосуванням методу *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації. Використані агробактерії мали вектор pCB124 з цільовим геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини та селективним геном *nptII* (схему вектора див. у розділі 2.4). При проведенні трансформації застосовували методику, оптимізовану для трансформації рослин цикорію. Це дозволило перевірити, чи може така методика бути використана для отримання з високою ефективністю трансгенних рослин іншого виду. Регенерацію пагонів ініціювали на живильному середовищі, яке раніше нами було використано для отримання трансгенних рослин салату з генами антигенів ESAT6 та AG85B. Селекцію трансгенних рослин

проводили на живильному середовищі (табл.2.4) з додаванням канаміцину у концентрації 25 мг/л, оскільки саме така концентрація була визначена як селективна (рис. 3.14).

Після кокультивування з агробактеріями регенерація пагонів на експлантах починалася через 2-3 тижні, причому на кожному експланті формувалося від 6 до 10 пагонів (рис. 3.15).

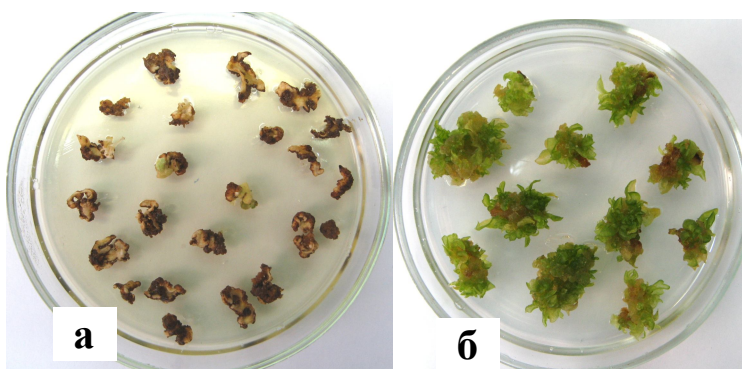


Рис. 3.14 – Регенерація пагонів салату (контрольні) на живильному середовищі з 25 мг/л канаміцину (а) та без антибіотика (б)

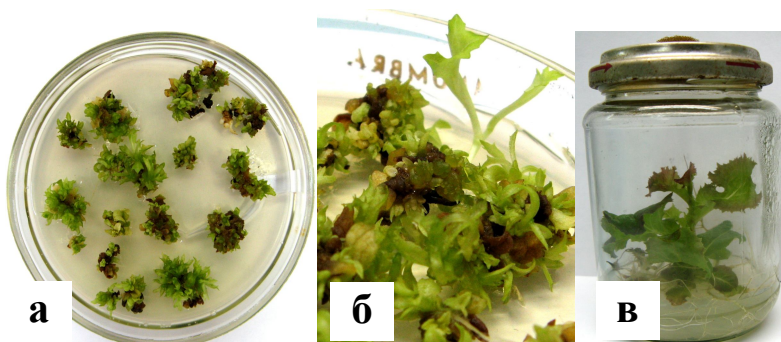


Рис. 3.15 – Регенерація пагонів салату у селективних умовах після трансформування *Agrobacterium tumefaciens*: а – початковий етап формування пагонів; б – ріст на живильному середовищі зі зменшеним вмістом регуляторів росту; в – укорінення регенованих пагонів

При використанні оптимізованої для рослин цикорію методики (культивування на живильному середовищі для регенерації рослин без додавання цефотаксиму протягом трьох діб та далі через одну добу перенесення на середовище такого самого складу з додаванням канаміцину) усі сформовані пагони салату мали зелене забарвлення. Таким чином, раннє додавання селективного антибіотика до живильного

середовища дозволило ефективно проводити селекцію та отримати лише зелені (з високою долею вірогідності трансгенні) рослини. Експланти з пагонами висотою більше 0,5 см переносили на агаризоване середовище зі зменшеним вмістом регуляторів росту (табл. 2.4) для подальшого росту. Частота регенерації зелених пагонів (відсоток експлантів з пагонами, у п'яти незалежних експериментах) становила  $81\% \pm 5,11$ . Отримані пагони відділяли та укорінювали на живильному середовищі 1/2МС з канаміцином та цефотаксимом та без регуляторів росту. Для підтвердження наявності перенесених генів у отриманих зелених рослинах використовували метод ПЛР-аналізу.

3.2.2. Молекулярно-біологічний аналіз рослин салату, отриманих після трансформації. Для визначення наявності перенесених генів вибірково відбирали 10 регенерованих зелених рослин, виділяли загальну ДНК (див. розділ 2.14) та проводили ПЛР аналіз з праймерами, специфічними до генів *ifn- $\alpha$ 2b* та *nptII*.

Отримані результати та наявність на електрофореграмах продуктів відповідного розміру (622 п.н та 396 п.н.) свідчила про наявність цільового та селективного генів у всіх аналізованих рослинах (рис. 3.16).

ЗТ-ПЛР аналіз підтвердив активність перенесених генів, оскільки в усіх аналізованих рослинах детектували мРНК цільового та селективного генів (рис. 3.17).

Отже, застосування оптимізованої методики **а** мало можливість з достатньо високою частотою отримати трансгенні рослини салату, причому не спостерігали утворення нетрансформованих (білих, чутливих до канаміцину) рослин. За результатами ПЛР-аналізу усі досліджувані рослини дійсно мали селективний ген *nptII* та цільовий ген *ifn- $\alpha$ 2b*. У вибірково аналізованих регенерованих зелених рослин не спостерігали явище «мовчання генів», оскільки в усіх аналізованих зразках було детектовано мРНК генів *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*. Таким чином, використана

методика виявилася ефективною та дозволила отримати трансгенні рослини салату з генами *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*.

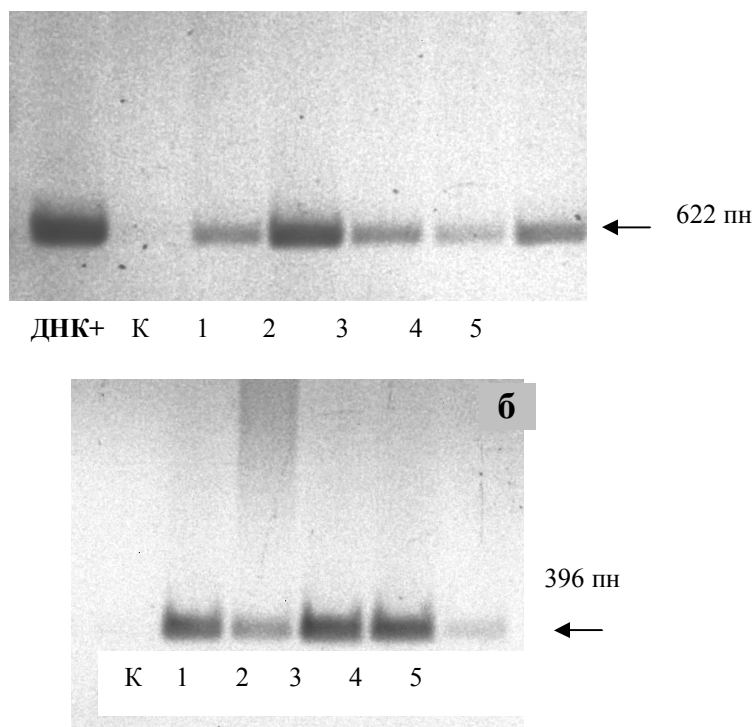


Рис. 3.16 – Електрофореграма продуктів ПЛР з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII* (а) та *ifn- $\alpha$ 2b* (б): 1–5 – ДНК досліджуваних зразків; К – ДНК контрольних рослин; ДНК+ – плазмідна ДНК

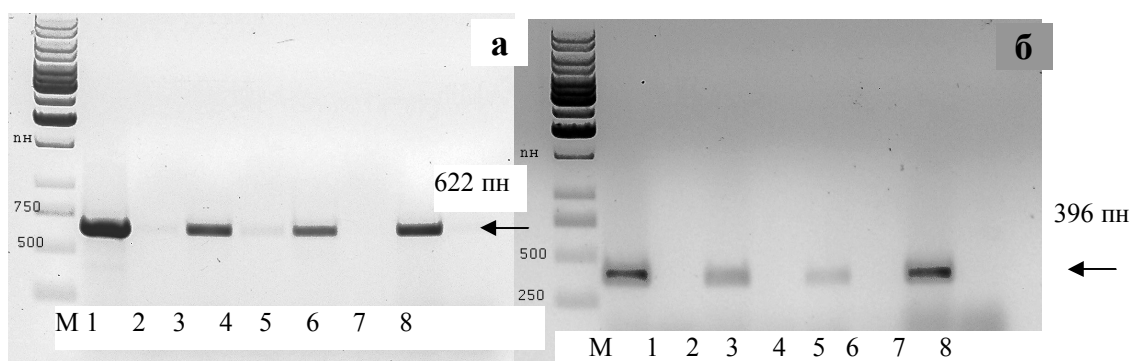


Рис. 3.17 – Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР аналізу з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII* (а) та *ifn- $\alpha$ 2b* (б): М– маркер Gene Ruler 1kb DNA Ladder SM1163, Fermentas; непарні треки – з ревертазою; парні треки – без ревертази

3.2.3. Трансформація салату з використанням *Agrobacterium rhizogenes*. Для генетичної трансформації рослин салату використовували проростки (10-12 діб) або листки культивованих у стерильних умовах рослин сорту «Рубінове мереживо». Трансформацію здійснювали шляхом кокультивування експлантів (сім'ядолі або зрілі листки) з суспензією *A. rhizogenes*. Бактерії несли вектори pCB124 та pCB161 з селективним геном *nptII* та цільовим геном *ifn-α2b* людини. Використовували також дикий штам агробактерій A4.

Ріст коренів на експлантах на безгормональному живильному середовищі з селективним антибіотиком канаміцином у концентрації 25 мг/л починався вже через 10-14 діб [728]. Частота утворення коренів становила  $74,60 \pm 5,5\%$ ,  $83,33 \pm 3,70$  та  $82,60 \pm 6,4\%$  відповідно після кокультивування з *A. rhizogenes* з вектором pCB124, pCB161 та штамом *A. rhizogenes* A4 (рис. 3.18). На листках контрольних рослин без кокультивування з агробактеріями за тих самих умов культивування корені не утворювалися.

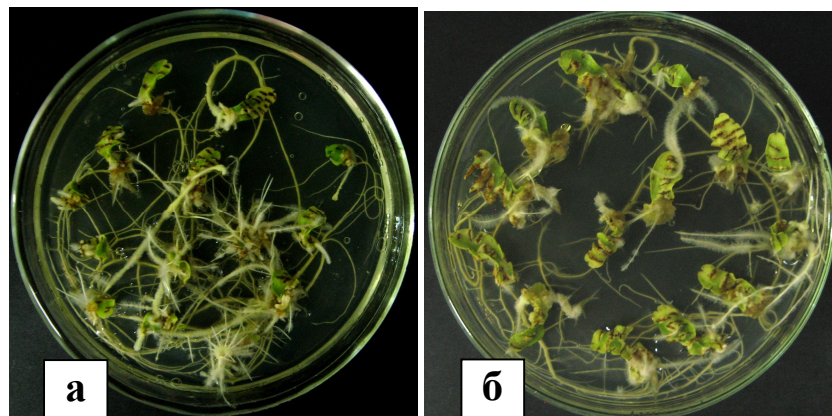


Рис. 3.18 – Формування коренів на експлантах після кокультивування з *A. rhizogenes* з вектором pCB124 (а) та штамом *A. rhizogenes* A4 (б)

Отримані корені відокремлювали від експлантів і переносили на середовище того ж складу для подальшого культивування та розмноження. Вони мали характерні для «бородатих» коренів ознаки (рис. 3.19 а): гормонезалежний ріст, відсутність позитивного геотропізму, сильне

розгалуження, що обумовлено перенесенням в геном TL фрагмента T-ДНК pRi плазміди. Оскільки при культивуванні трансгенних коренів на середовищі без регуляторів росту регенерація пагонів не спостерігалася, для отримання трансформованих рослин до середовища МС додавали кінетин і НОК у концентраціях відповідно 0,5 - 3 і 0,05 - 3 мг / л (табл. 2.4). Низькі концентрації кінетину і НОК не приводили до формування калусу або пагонів. Визначено, що підвищення концентрації НОК до 3 мг/л ініціювало ріст калусної тканини. На живильному середовищі, що містило 3 мг/л кінетину і 0,5 мг/л НОК, починав формуватися калус, а через 20-30 діб – регенерація пагонів (рис. 3.19, б). Рослини, які утворилися, пересажували для укорінення на безгормональне живильне середовище МС з антибіотиками канаміцином та цефотаксимом.

Таблиця 3.3 –

**Вплив складу живильного середовища на ріст трансгенних коренів салату та регенерацію пагонів**

№	Концентрація регуляторів росту, мг/л		Ріст		
	кінетин	НОК	коренів	калусної тканини	пагонів
1	0,5	0,05	+	-	-
2	0,5	3	-	+	-
3	3	0,5	-	+	+
4	0	0	+	-	-
+ наявність росту; - відсутність росту					

Як правило, рослини, одержувані після трансформації з використанням *A. rhizogenes*, мають специфічний фенотип. У них можуть бути зморщені листки, укорочені міжвузля, розгалужені стебла, порушено апікальне домінування, сильно розвинена плагіотропна коренева система. Однак, можуть бути отримані і рослини з невеликими порушеннями морфології або взагалі без них. Вираженість Ri-фенотипу трансгенних



рослин визначається (як один з можливих факторів) експресією *rol* генів у регеноерованих рослинах: «мовчання» цих генів призводить до утворення рослин з фенотипом дикого типу.

Проведений ЗТ-ПЛР аналіз визначив, що усі проаналізовані лінії салату мали ген *rolB*, що транскрибувався, проте їх фенотип не мав особливостей, характерних для *A. rhizogenes*-трансформованих рослин. Разом з тим, отримані нами трансгенні рослини вже на початковому етапі регенерації при однакових умовах культивування (склад середовища, температура, освітлення) відрізнялися як від контрольних, так і від рослин того ж сорту, трансформованих нами раніше за допомогою *A. tumefaciens* [16]. Для них характерним було швидке витягування стебла у висоту, подовження міжвузлів і раннє формування квітконоса (рис.3.20 а). У той же час контрольні та раніше отримані *A. tumefaciens*-трансформовані рослини [16] мали розеткову форму (рис.3.20 б). Аналогічний змінений фенотип ми спостерігали у рослин цикорію, трансформованих *A. tumefaciens* з вектором pCB124 (ген інтерферону- $\alpha 2$ в людини) [37]. Оскільки і рослини салату, і рослини цикорію, які мали змінений фенотип однакового характеру, отримано з використанням вектора pCB124, можна припустити можливість впливу саме гена інтерферону.

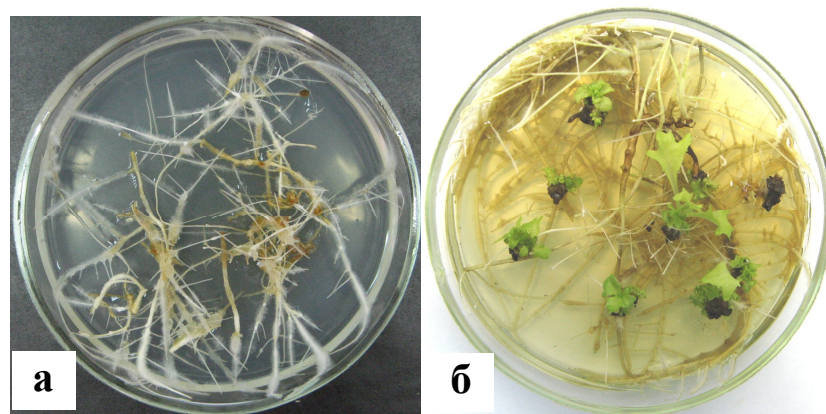


Рис. 3.19 – Ріст «бородатих» коренів (а) та регенерація рослин з утворених коренів (б) після трансформації салату шляхом *A. rhizogenes* А4-опосередкованої трансформації



Ще одна особливість частини регенованих рослин салату полягала у специфічному забарвленні листків. Листя рослин цього сорту мають у природних умовах при природному сонячному освітленні пурпурне забарвлення, що і дало назву сорту «Рубінове мереживо». При культивуванні у термальних кімнатах або теплиці (штучне освітлення) вони були зеленими (рис. 3.20 б, г). Забарвлення листків деяких *A. rhizogenes*-трансформованих ліній (загалом 40% від загальної кількості ліній) при культивуванні *in vitro* було подібне до забарвлення листків, культивованих у природних умовах (рис. 3.20в).

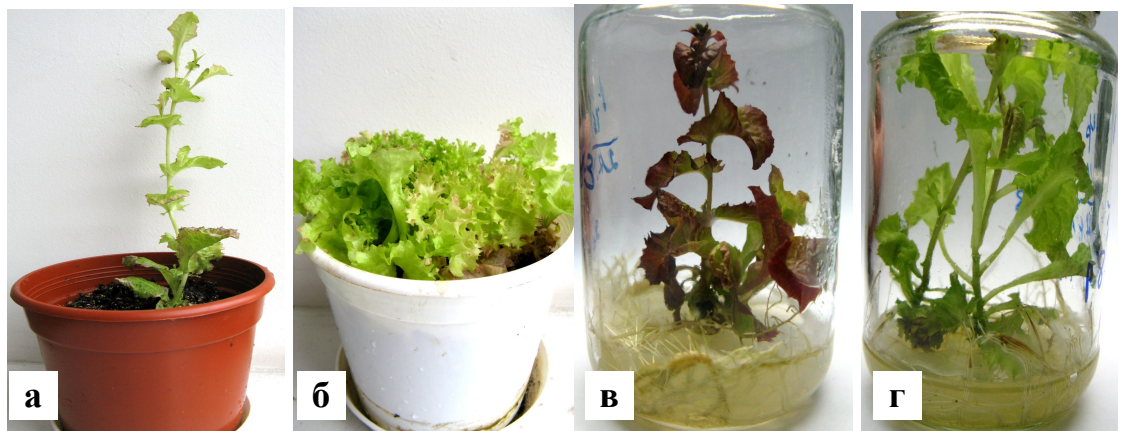


Рис. 3.20 – Особливості рослин салату, отриманих після трансформації за допомогою *A. rhizogenes*: **а** – трансгенна рослина, формування квітконоса; **б** – контрольна рослина, розеткова форма; **в, г** – два типи забарвлення листя трансгенних рослин

3.2.4. Молекулярно-біологічний аналіз трансгенних коренів та регенованих з них рослин. Для підтвердження перенесення генів при трансформації з використанням *A. rhizogenes* було проведено ПЛР-аналіз загальної ДНК з усіх отриманих ліній трансгенних коренів (усього підтримували в культурі *in vitro* 22 лінії). За результатами ПЛР-аналізу аналізовані лінії мали як селективний, так і цільовий гени (рис. 3.21). Усі досліджувані зразки мали також *rolB* ген *A. rhizogenes*, чим і зумовлено характерний ріст та фенотип коренів. ЗТ-ПЛР-аналіз показав,

що у всіх аналізованих лініях має місце транскрипція як селективного, так і цільового генів (рис. 3.21, г, д).

Підсумовуючи отримані результати, слід зазначити, що проведеними дослідженнями було визначено фактори, які впливають на частоту отримання трансгенних рослин – час вирощування експлантів після кокультивування з суспензією агробактерій на живильному середовищі без антибіотиків, а також час додавання селективного антибіотика. На основі проведених досліджень було визначено фактори, які впливають на частоту трансформації, оптимізовано методику трансформування та за її використання отримано трансгенні рослини і культури «бородатих» коренів їстівних рослин – салату та цикорію.

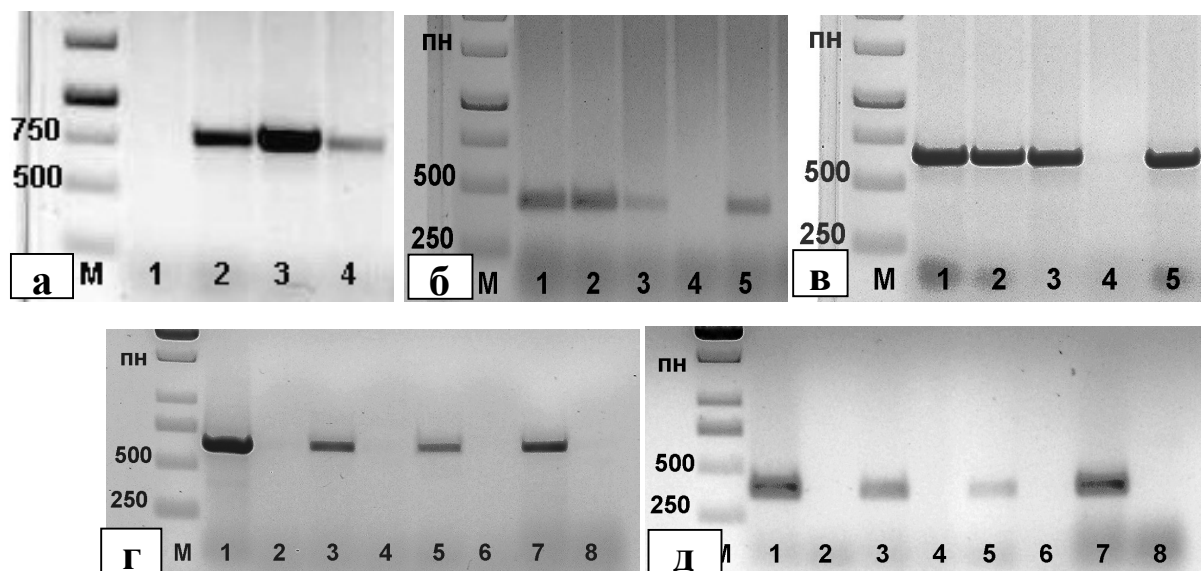


Рисунок 3.21 – Електрофореграма результатів ПЛР-аналізу загальної ДНК (а, б, в) та 3Т-ПЛР (г, д): *rolB* (а), *ifn-α2b* (б, д) та *nptII* (в, г); а: 1 – ДНК контрольної рослини салату; 2-4 – ДНК трансгенних рослин; б, в: 1-3 – ДНК трансгенних рослин; 4 – ДНК контрольної рослини; 5 – плазмідна ДНК; г, д: 1-8 – ДНК трансгенних рослин; непарні треки – синтез зворотних транскриптів у присутності ревертази, парні – без ревертази; М – маркер Gene Ruler 1kb DNA Ladder SM1163, Fermentas

Визначено, що за використання оптимізованої методики для перенесення цільових генів до рослин цикорію та салату можна

використовувати як *A. rhizogenes*, так і *A. tumefaciens* [725-728]. Слід відзначити, що бактерії *A. rhizogenes* була використані для генетичної трансформації рослин салату уперше.

Було визначено, що з культури «бородатих» коренів цикорію та салату можна отримати регенеровані пагони, причому регенерація пагонів цикорію є гормоннезалежною, а для ініціювання пагоноутворення салату необхідно використання регуляторів росту (3 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК).

Регенеровані пагони, так само, як і вихідні «бородаті» корені, мали перенесені гени – *rolB* ген агробактерій, селективний ген *nptII* та цільові гени *ifn- $\alpha$ 2b* або *esxA* залежно від використаного вектора.

Застосування оптимізованої методики дозволило отримати трансгенні рослини та «бородаті» корені рослин обох видів, причому частота трансформації становила до 86% та 83% відповідно для *C. intybus* та *L.sativa*. Отже, оптимізована методика може бути ефективно застосована для перенесення генів до рослин салату та цикорію, причому при її використанні можна отримати як трансгенні рослини, так і «бородаті» корені з високою частотою.

## РОЗДІЛ 4

### РОЗРОБЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ СТОСОВНО ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН – ПРОДУЦЕНТІВ БАС

Лікарські рослини здавна використовуються як джерело біологічно активних сполук та для лікування і профілактики ряду захворювань. Традиційно для цього використовують рослини, спеціально вирощені у польових умовах або забрані дикоростучі рослини. Однак, цей спосіб отримання цінних сполук має ряд недоліків. Вирощування таких рослин вимагає відведення під лікарські культури та використання значних земельних ділянок. Крім того, антропогенне забруднення довкілля, токсичні викиди промислових підприємств призводять до неможливості використання частини земель через суворі вимоги до чистоти ґрунтів для вирощування саме лікарських рослин. Використання біотехнологічних підходів для вирощування цінних культур дозволяє подолати ряд труднощів. Так, зменшується необхідність використання екологічно чистих земель, оскільки, наприклад, біотехнологічну культуру коренів рослин-продуцентів БАС можна вирощувати у біореакторах з контрольованими умовами та гарантованою чистотою отриманих сполук. Біотехнологічними методами можна створити рослини або культури «бородатих» коренів з підвищеним вмістом БАС, оскільки відомо, що генетична трансформація може призводити до підвищення рівня накопичення цукрів, вторинних метаболітів та інших біологічно активних сполук [696-698].

#### 4.1 Генетична трансформація рослин ряски з використанням

##### *A. rhizogenes*

Ряска *Lemna minor* L. – водна рослина, що належить до родини Lemnaceae (*Araceae*) класу однодольних. Особливістю рослин ряски є

швидке розмноження вегетативним шляхом [599], при якому з пазух листеців (кармашків) утворюються нові пагони, які потім відділяються від материнської рослини. Ряска містить багато білка, може вирощуватися у ферментерах, а швидке отримання великої кількості біомаси не вимагає значних фінансових витрат; вона є ідеальним об'єктом для генноінженерних досліджень. Отже, рослини ряски можуть використовуватися як об'єкт досліджень для створення трансгенних рослин – продуцентів рекомбінантних білків, зокрема цінних фармацевтичних сполук [611].

4.1.1 Збір рослинного матеріалу та уведення рослин ряски у стерильну культуру. Вихідним матеріалом для наших досліджень слугували рослини з природної водойми озера Опечень (Київ). Рослини було зібрано у невеликих заплавах водойми влітку 2010 р., їх зберігали у водному середовищі протягом 3 тижнів. Першим етапом роботи було уведення рослин ряски у стерильну культуру. Було виявлено їх високу чутливість до використовуваного стерилізаційного агента. Так, якщо при обробці препаратом «Білизна» (1:5) протягом 1 хв. виживало 100% експлантів, то при збільшенні терміну стерилізації до 5 та 10 хв. виживання рослин становило відповідно 5 та 1%; бактеріальної та мікробіотичної контамінації не спостерігали.

4.1.2. Генетична трансформація рослин ряски з використанням *A. rhizogenes*. Для трансформування використовували дикий штам А4 та *A. rhizogenes* з векторними конструкціями рСВ124 та рСВ158 (рис. 2.2). Культивовані *in vitro* рослини трансформували за допомогою *A. rhizogenes* за методикою, описаною у розділі «Матеріали та методи». Листеці протягом трьох днів після кокультивування з бактеріями витримували на середовищі МС, після чого до живильного середовища додавали цефотаксим для елімінації

агробактерій та ще через день – канаміцин для селекції трансформованих рослин. Попередніми експериментами було визначено, що використання канаміцину в концентрації 25 мг/л дає можливість поводити селекцію трансформованих рослин за ознакою збереження зеленого забарвлення у стійких до канаміцину рослин.

Процес росту нових листеців з карманців експлантів, підданих трансформації, розпочинався через 2-3 дні. Через 2 тижні після трансформування агробактеріями з вектором pCB158 було відібрано 2 клони, листеці яких мали зелене забарвлення на селективному середовищі (рис. 4.1), що становило 2 % від загальної кількості експлантів.

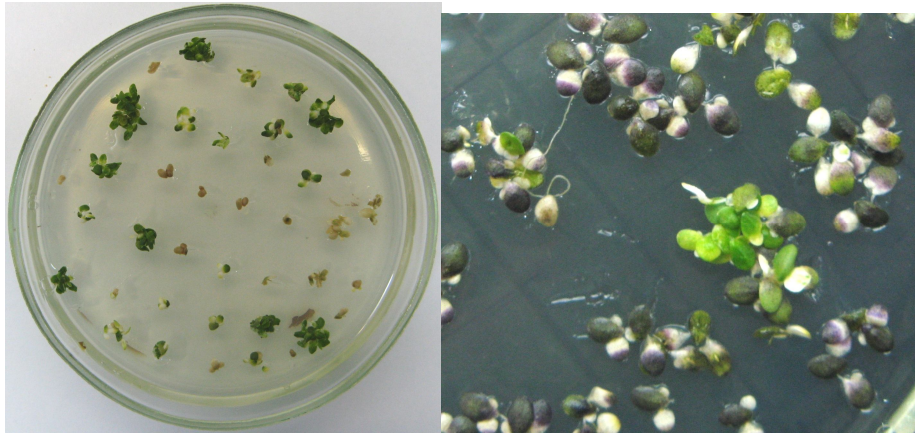


Рис. 4.1 – Селекція листеців ряски на середовищі з канаміцином після кокультування з *A. rhizogenes* з вектором pCB158

Отримані стійкі до канаміцину рослини розмножували шляхом відокремлення листеців та вирощували протягом 3 місяців на селективному середовищі з антибіотиками у концентрації 600 мг/л цефотаксиму та 25 мг/л канаміцину (рис. 4.2). З використанням дикого штаму агробактерій отримати рослини або корені не вдалося (рис. 4.3 а). Після кокультування листеців з агробактеріями, що несли вектор pCB124, відмічено появу листеців з частковим зеленим забарвленням (рис. 4.3 б), однак при подальшій селекції трансгенні рослини не було отримано.

Оскільки для трансформації було використано бактерії *A. rhizogenes*, можна було б сподіватися на інтенсивний ріст коренів та специфічні для трансформованих цією бактерією їх ознаки (наприклад, відсутність



позитивного геотропізму). Однак, нами після генетичної трансформації не було отримано культуру коренів, разом з тим було отримано трансгенні рослини. Відібрані при селекції рослини за розмірами, морфологією не відрізнялися від контрольних нетрансформованих рослин. Вони так само розмножувалися шляхом утворення нових листеців та мали по одному корінцю довжиною близько 10 мм або корінці були відсутні. Прямую регенерацію трансгенних рослин з експлантів (без стадії коренеутворення) після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* описано для ряду рослин, зокрема, троянди, ківі, лайму [699-701] та ін. Слід зазначити, що в цитованих роботах, на відміну від наших експериментів [702], поряд із регенерованими рослинами формувалися також «бородаті корені».

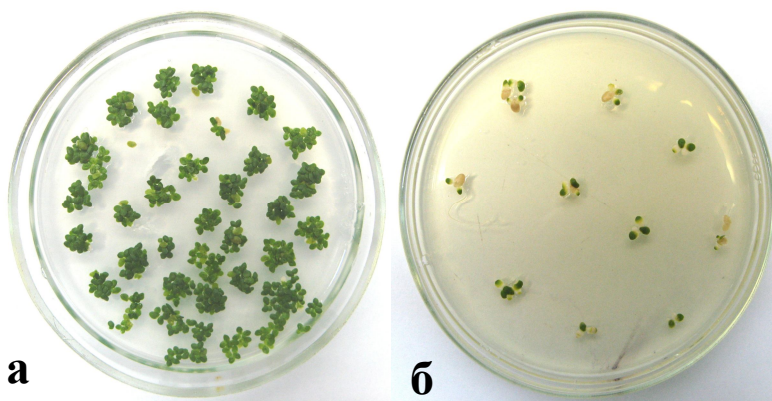


Рис. 4.2 – Трансформовані (а) та контрольні (б) рослини ряски на середовищі з 25 мг/л канаміцину

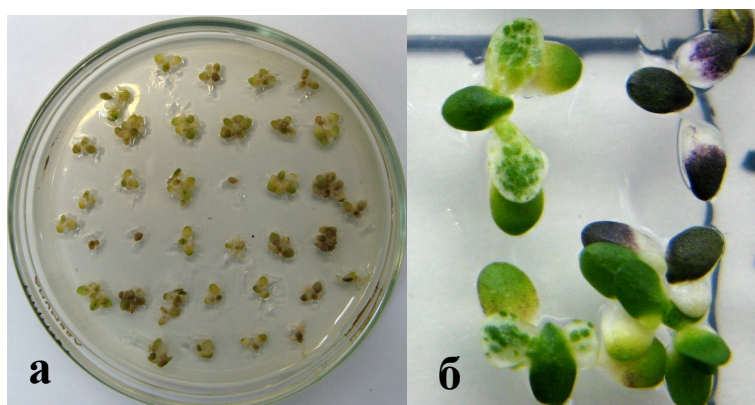


Рис. 4.3 – Культивування на селективному середовищі листеців після трансформування диким штамом агробактерій (а) та *A. rhizogenes* з векторною конструкцією pCB124 (б)

Агробактерії як засіб перенесення генів використовують головним чином для трансформування дводольних рослин. Використання цього способу трансформації для рослин класу однодольних є обмеженим внаслідок природного бар'єру, який перешкоджає взаємодії бактерій та рослинних клітин [703]. Це пов'язано, зокрема, з тим, що рослини класу однодольних не виділяють специфічних сигнальних сполук, які активізують гени вірулентності агробактерій. Використання таких сполук (наприклад, ацетосерингону) в процесі трансформування рослин дає можливість зняти природну перешкоду та отримувати трансгенні однодольні рослини з використанням бактерій роду *Agrobacterium*. У описаних в літературі експериментах з агробактеріальної трансформації ряскових використовували ацетосерингон [610], клітинну суспензію дводольних рослин (наприклад, 1–10% суспензію клітин *Nicotiana tabacum*) та інші сполуки або специфічні для цих рослин штами *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* ЕНА105, ЕНА101, GVE3103) [704] з метою подолання бар'єру та перенесення трансгенів. Крім того, автори вказаних публікацій піддавали трансформуванню калусні тканини з метою в подальшому шляхом регенерації отримати трансгенні рослини.

В наших експериментах не використовували ацетосерингон при трансформуванні рослин ряски за допомогою *A. rhizogenes*. У результаті зі 100 експлантів було отримано лише два трансформовані клони, отже, частота трансформації виявилася невисокою. Однак, за літературними даними відсоток трансгенних рослин родини Lemnaceae при агробактеріальній трансформації за допомогою *A. tumefaciens* навіть з використанням спеціальних сигнальних сполук (наприклад, ацетосерингону) коливається у широких межах та у значній мірі є видозалежним. Так, цей показник становив 92% для *Spirodela punctata*, 14% для *Lemna obscura*, 8% – *Lemna gibba*, 9% – *Wolffia australiana*, 0.1% – *Wolffia brasiliensis* [704]. Разом з тим, є очевидним, що ряска, яка належить до класу однодольних, може бути трансформована з використанням



агробактерій, зокрема, *A. rhizogenes*, і без застосування ацетосерингону або інших сполук.

Наші експерименти відрізнялися від цитованих вище тим, що: 1) як засіб перенесення чужорідних генів уперше використовували *A. rhizogenes*; 2) не застосовували ацетосерингон чи іншу сполуку, яка дає можливість трансформувати рослини, що не синтезують специфічні сигнальні сполуки; 3) після трансформації листеців напряду (без стадій калусоутворення та регенерації) отримали трансгенні рослини; 4) при використанні *A. rhizogenes* отримано саме трансгенні рослини, а не «бородаті» корені.

Як відомо, плазміда pRi агропінових штамів *A. rhizogenes* має два окремих фрагменти T-ДНК, що переносяться до рослинної клітини: правий T<sub>R</sub>-ДНК та лівий T<sub>L</sub>-ДНК [705]. Останній містить гени *rolA*, B, C, D, які задіяні в процесі коренеутворення і відповідають за специфічність фенотипу «бородатих коренів» [706]. T<sub>L</sub>- і T<sub>R</sub>-ДНК переносяться у геном незалежно, тому трансформовані кореневі культури і отримані з них рослини можуть розрізнятися за кількістю копій, довжині фрагментів, а також сайтам інтеграції T-ДНК [707]. Інтеграція T-ДНК бінарного вектора також відбувається незалежно, завдяки чому можна отримати трансгенні рослини, які містять лише T-ДНК бінарного вектора без T<sub>L</sub>- і T<sub>R</sub>-ДНК з pRi онкоплазміди у випадку прямої регенерації рослин (без стадії «бородатих коренів») на селективному середовищі. У випадку, коли відбирають кореневі культури, фенотип яких обумовлений кількістю та експресією перенесених *rol* генів T<sub>L</sub>-ДНК, трансгенні рослини, які регенерують з таких культур, містять як гени бінарного вектора, так і *rol* гени. Проте в подальших поколіннях при мейозі може статися генетична сегрегація T-ДНК, що дозволяє отримати нормальні за фенотипом трансгенні рослини, які містять лише T-ДНК бінарного вектора без генів pRi і асоційованих з цим морфологічних змін [708, 709]. У результаті наших досліджень після трансформації з використанням *A. rhizogenes* було напряду отримано

зелені рослини за селекції у присутності канаміцину, що могло свідчити про перенесення гена *nptII*, продукт якого зумовлює стійкість до антибіотика. У той же час, пряма регенерація рослин (без формування «бородатих» коренів) давала підстави вважати, що фрагмент T<sub>L</sub>-ДНК агробактерій перенесено не було. Для визначення того, чи дійсно були перенесені гени, було проведено ПЛР аналіз отриманих рослин.

4.1.3 Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після трансформації для підтвердження перенесення трансгенів. У наших дослідах відсутність появи коренів специфічного фенотипу можна пояснити тим, що в процесі трансформування рослин ряски не відбулося перенесення *rol* генів *A. rhizogenes* до рослинного геному, що і було підтверджено ПЛР-аналізом трансформованих клонів (рис. 4.4). Ампліфікація сумарної ДНК з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*, який поряд з іншими генами *rol*-локуса задіяний в процесі коренеутворення і відповідає за фенотип «бородатих коренів», не виявила фрагменту очікуваного розміру (780 п. н.).

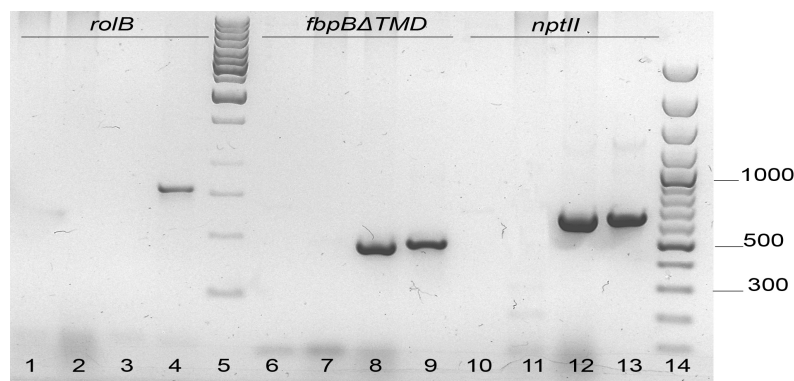


Рис. 4.4 – Електрофореграма результатів ПЛР аналізу сумарної ДНК рослин ряски з використанням праймерів до генів *rolB* (1-4), *fbpB*<sup>ΔTMD</sup> (6-9) та *nptII* (10-13): 1, 6, 10 – негативний контроль, без ДНК-матриці; 2, 7, 11 – ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 3, 8, 12 – ДНК рослини ряски, трансформованої *A. rhizogenes* pCB158; 4, 9, 13 - позитивний контроль,

сумарна ДНК *A. rhizogenes* pCB158; 5, 14 – ДНК-маркери (1 kb DNA Ladder SM1163 та 100bp Plus DNA Ladder SM1153, Fermentas).

Аналіз ДНК рослин ряски показав наявність як селективного, так і цільових генів (рис. 4.4). Аналіз на наявність *vir* генів виявився негативним, отже, отримані рослини були вільні від бактерій, які використовували для трансформації. Таким чином, дійсно відбулося перенесення селективного та цільових генів до рослинних клітин.

Таким чином, уперше створено трансгенні рослини ряски з використанням *A. rhizogenes*. Отримані результати свідчать про те, що:

- *A. rhizogenes* можна застосовувати для перенесення чужорідних генів до рослин ряски;

- очевидно, ряска *L. minor* в деякій мірі синтезує сигнальні сполуки, необхідні для активації агробактерій, оскільки трансгенні рослини було отримано без застосування при трансформації спеціальних сигнальних сполук я для підвищення ефективності трансформації. Разом з тим, вірогідно, концентрація їх у клітинах ряски є невеликою, про що свідчить низька ефективність отримання трансформованих рослин без використання ацетосерингону (2%);

- трансгенні рослини ряски можна отримати за допомогою *A. rhizogenes* шляхом прямої регенерації та подальшого вегетативного розмноження без проміжних стадій калусоутворення та регенерації. Такий спосіб значно економить час, необхідний для отримання трансформованих рослин, адже шляхом трансформування калусних тканин трансгенні рослини можна отримати приблизно через 12-16 тижнів після кокультивування з агробактеріями, при прямій регенерації – через 2-3 тижні;

- є можливим отримати трансгенні рослини ряски, що мають цільові гени туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B, наявність яких у трансгенних рослинах підтверджено результатами ПЛР. Такі рослини

можуть становити практичний інтерес як джерело рекомбінантних білків виходячи з фізіологічних особливостей ряски – швидкого вегетативного розмноження, невибагливості до умов росту та можливості культивування у ферментерах, що не суперечить нормативам використання трансгенних рослин.

#### 4.2. Отримання культури трансгенних коренів козельців

4.2.1. Уведення рослин *Tragopogon porrifolius* у стерильну культуру. Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *Tragopogon porrifolius*. Після поверхневої стерилізації за методикою, описаною у розділі 2.2, насіння культивували на поверхні агаризованого живильного середовища 1/2МС у чашках Петрі при температурі +24°C. Схожість насіння виявилася дуже низькою та становила лише 10%. Отримані сім'ядолі проростків використовували для генетичної трансформації.

4.2.2. Трансформація рослин козельців з використанням *A. rhizogenes*. Для трансформації використовували *A. rhizogenes* А4 з векторними конструкціями pCB161 та pCB124 з генами *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b* (див. рис. 2.2), які відрізнялися за промотором гена *ifn- $\alpha$ 2b*, та дикий штам агробактерій А4. Як об'єкти трансформації використовували сім'ядолі з отриманих проростків. Трансформацію проводили згідно оптимізованої методики, описаної у розділі 2.7. У якості контролю використовували сім'ядолі, на яких робили надрізи, витримували протягом 30 хв у живильному середовищі LB і далі переносили на поверхню агаризованого середовища 1/2МС.

На контрольних експлантах рослин (без кокультивування з агробактеріями) ріст коренів був відсутнім. Коренеутворення на експлантах починалося через 14-20 діб як при використанні дикого штаму

бактерій, так і при використанні *A. rhizogenes* A4 з векторними конструкціями pCB161 та pCB124 (рис. 4.5). Корені на експлантах, які кокультивували з *A. rhizogenes* A4, росли швидше, ніж корені, утворені після трансформування агробактеріями з векторами – приріст довжини становив відповідно 5-10 мм та 1 – 2 мм за 10 діб.

Частота коренеутворення при використанні *A. rhizogenes* A4 була вищою, ніж після кокультивування листків з *A. rhizogenes* pCB161 і pCB124 та становила  $59,4 \pm 3,54$  % ,  $37,5 \pm 2,83$  % та  $38,3 \pm 3,51$  відповідно. Термінальні ділянки коренів довжиною близько 10 мм відділяли від експлантів та переносили на поверхню живильного середовища 1/2МС для нарощування біомаси. Усі отримані корені мали характерний для «бородатих» коренів фенотип – розгалуження, відсутність позитивного геотропізму – та росли на середовищі без регуляторів росту, що обумовлено перенесенням у геном рослин  $T_L$  фрагменту T-ДНК pRi плазмиди бактерій. Слід зазначити, що корені *T. porrifolius* не мали значної кількості корневих волосків, ступінь галуження був відносно невисоким, корені були значно потовщеними у порівнянні з коренями контрольних нетрансформованих рослин (рис. 4.6).

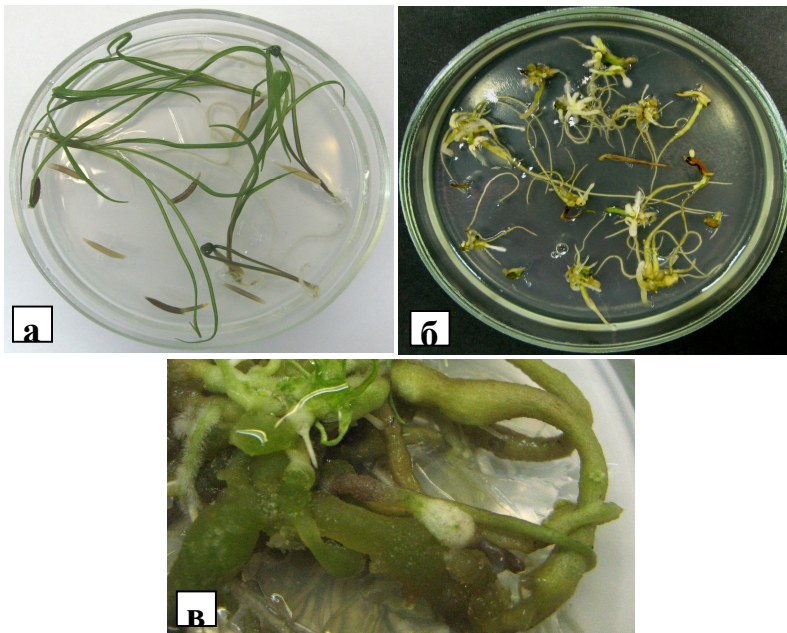


Рис 4.5 – Вихідні рослини *T. porrifolius*, культивовані *in vitro* (а), формування коренів на експлантах після трансформації (б), потовщення трансгенних коренів (в)

Фенотип коренів не змінювався протягом тривалого часу вирощування (більше двох років). На коренях через 3-4 місяці культивування при освітленні спостерігали пряму регенерацію пагонів (рис. 4.6), причому додавання до живильного середовища регуляторів росту не було необхідною умовою регенерації. При вирощуванні у темряві регенерація не відбувалася. Отже, регенерація рослин з трансгенних коренів козельців є світло залежною та гормонезалежною. Такий самий тип формування пагонів на трансгенних коренях спостерігався нами і для рослин цикорію.

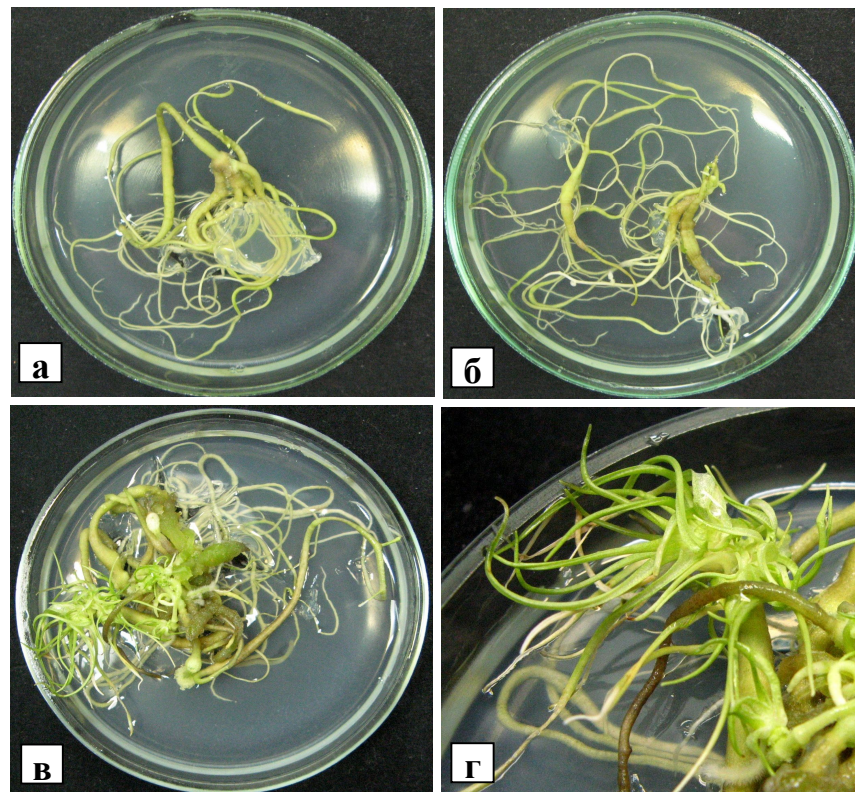


Рис 4.6 – Ріст трансгенних коренів, отриманих після трансформування диким штамом агробактерій (а), агробактеріями з вектором pCB161 (б) та регенерація рослин з цих коренів (б, в)

4.2.3. Молекулярно-біологічний аналіз коренів козельців, отриманих після трансформації, та регенованих з них рослин для підтвердження перенесення трансгенів. Методом ПЛР визначали трансгенну природу коренів, отриманих після кокультування з *A. rhizogenes*, а також регенованих з



цих коренів рослин. Показано, що усі аналізовані лінії коренів, отримані після трансформації диким штамом агробактерій, мали *rolB* ген (рис. 4.7). Корені, трансформовані *A. rhizogenes* з вектором pCB161 та pCB124, несли як агробактеріальний ген *rolB*, так і плазмідні гени (рис. 4.7). Перенесені гени як бактеріальної природи (*rolB*), так і гени *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b* мали також регенеровані з трансгенних коренів рослини козельців (рис. 4.8). Таким чином, після трансформування частота перенесення трансгенів до отриманих культур коренів становила 100%.

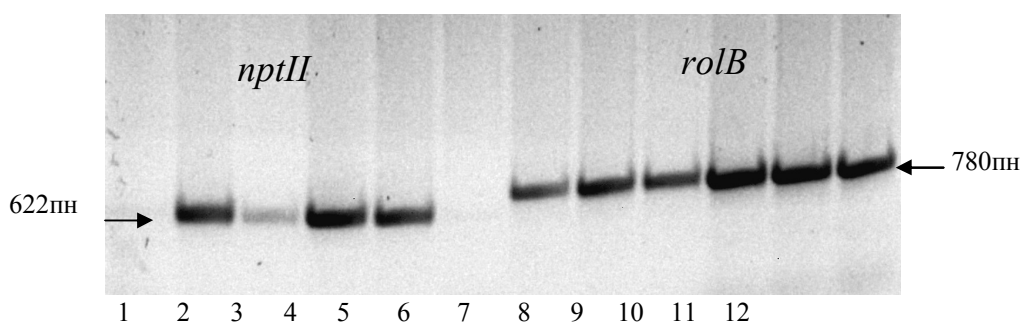


Рис. 4.7 – Електрофореграма продуктів ампліфікації сумарної ДНК коренів козельців з використанням праймерів до генів *nptII* (1-5) та *rolB* (6-12): 1, 6 – ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 2-5 та 7-12 – ДНК коренів, трансформованих *A. rhizogenes*

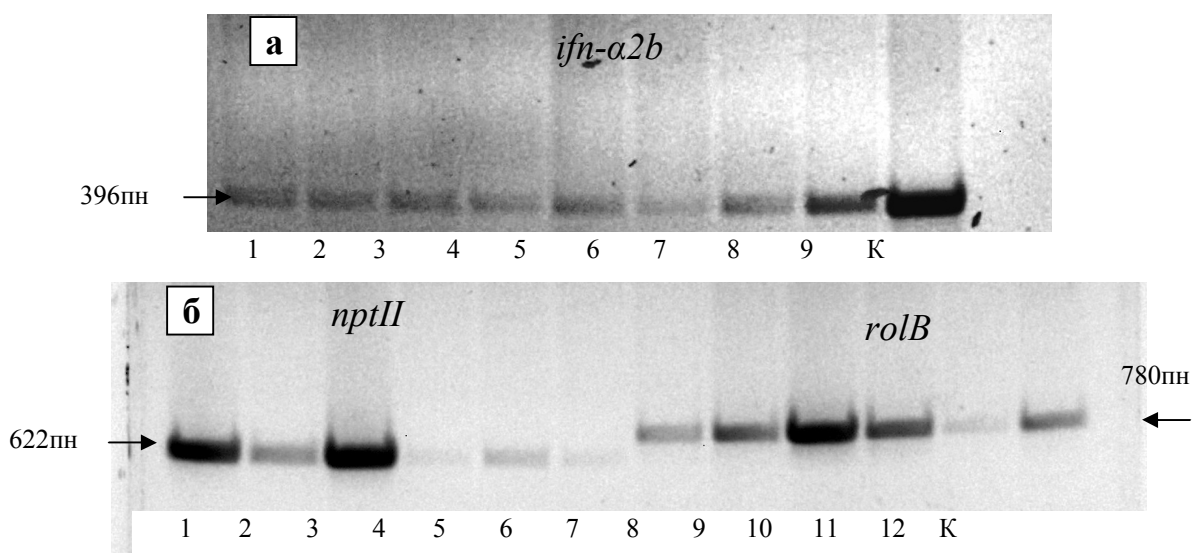


Рис. 4.8 – Електрофореграма продуктів ампліфікації сумарної ДНК рослин, регенерованих з коренів козельців, з використанням праймерів до генів *ifn- $\alpha$ 2b* (а, 1-9), *nptII* (б, 1-6) та *rolB* (б, 7-12); К – ДНК вихідної нетрансформованої рослини

У коренях, трансформованих векторами з геном інтерферону, підтверджено транскрибування цільового та селективного генів (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 –

**Результати ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізу зразків ДНК коренів  
козельців, отриманих з шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої  
трансформації**

№	Зразок коренів, № лінії	ПЛР аналіз на наявність генів			ЗТ-ПЛР аналіз транскрибування генів	
		<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	<i>nptII</i>	<i>rolB</i>	<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	<i>nptII</i>
1	контроль	-	-	-	-	-
2	pCB161 №1	+	+	+	+	+
3	pCB161 №3	+	+	+	+	+
4	A4 №1/3	-	-	+	*	*
5	A4 №2	-	-	+	*	*
6	A4 №4	-	-	+	*	*
7	A4 №6	-	-	+	*	*
8	A4 №7	-	-	+	*	*
9	pCB124 №1	+	+	+	+	+
10	pCB124 №5	+	+	+	+	+
+ Позитивний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; – Негативний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз * не аналізували						

Отже, методом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано культуру «бородатих» коренів рослин *T. porrifolius* [730]. Трансгенні корені росли на середовищі без регуляторів росту та мали характерний для них специфічний фенотип, який виражався у значному



потовщенні у порівнянні з коренями контрольних рослин та невеликій кількості кореневих волосків (мала «опушеність» коренів). Усі аналізовані лінії коренів несли перенесені гени – *rolB* у випадку трансформування диким штамом агробактерій та перенесені гени *rolB*, *ifn-α2b* та *nptII* після трансформування *A. rhizogenes* з вектором pCB161. Регенерація пагонів з трансгенних коренів *T. porrifolius* виявилася світлозалежною і гормонезалежною, вимагала досить тривалого часу культивування коренів на безгормональному живильному середовищі. Регенеровані з «бородатих» коренів рослин *T. porrifolius* рослини, так само як і «бородаті» корені, згідно результатів ПЛР мали перенесені гени *rolB*, *ifn-α2b* та *nptII*. Оптимізований метод трансформації рослин козельців є досить простим, не вимагає наявності складного обладнання. Отримана культура «бородатих» коренів може слугувати модельним об'єктом у дослідженнях впливу трансформації на рослини, а також як можливе джерело біологічно активних сполук, оскільки відома властивість трансгенних коренів синтезувати БАС [195, 196, 204, 710-713], а рослини *T. porrifolius* є лікарськими та синтезують сполуки з антиоксидантною, антипроліферативною, гепатопротекторною активністю [572-573].

#### 4.3. Генетична трансформація рослин *Althaea officinalis*

Рослини *Althaea officinalis* L. (алтея лікарська) є лікарськими, синтезують біологічно активні речовини. Вони виявляють противірусну, імуностимулюючу, протизапальну активність [714,, 715]. Тому ці рослини є цінним об'єктом біотехнологічних досліджень як джерело біологічно активних сполук.

4.3.1. Уведення рослин алтеї у стерильну культуру. Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *A. officinalis*, яке поверхнево стерилізували за методом, описаним у розділі 2.2. Енергія

проростання насіння становила 95%. Отримані проростки відокремлювали від коренів та переносили на живильне середовище 1/2МС. Розмножували рослини *in vitro* шляхом живцювання на тому самому середовищі (рис. 4.9). Для генетичної трансформації використовували листки та частини міжвузля (10 мм довжиною) культивованих у стерильних умовах рослин.

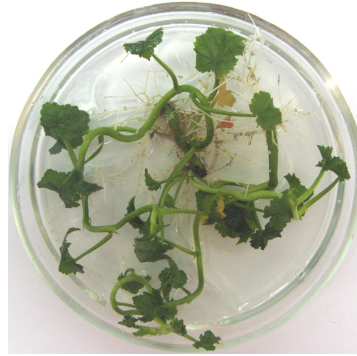


Рис. 4.9 – Ріст рослин алтеї у стерильних умовах

4.3.2. Трансформація рослин алтеї з використанням *A. rhizogenes*. Для генетичної трансформації використовували дикий штам *A. rhizogenes* A4, а також *A. rhizogenes* з векторними конструкціями pCB161 та pCB124 (рис. 2.2) та оптимізовану нами раніше методику. Експланти культивували на безгормональному живильному середовищі 1/2МС протягом 3 діб, далі переносили на те саме середовище, до якого додавали антибіотик цефотаксим у концентрації 600 мг/л для того, щоб позбутися бактеріальної контамінації та селективний антибіотик канаміцин у концентрації 25 мг/л (у випадку використання агробактерій, які мали плазміді pCB161 та pCB124 з геном *nptII*) (рис. 4.10). Ріст коренів (рис. 4.11) на листових експлантах починався вже через 5-7 діб після кокультивування з бактеріями, а на стеблових експлантах – через 10-12 діб.

Частота отримання коренів з листових експлантів становила 100% незалежно від використаних бактерій (дикий тип або бактерії з плазмідами pCB161 та pCB124). Частота коренеутворення з міжвузля була меншою та дорівнювала  $80 \pm 6,2\%$ ,  $76 \pm 5,9\%$  та  $70 \pm 5,6\%$  при використанні відповідно

дикого штаму агробактерій та *A. rhizogenes* з векторами pCB161 та pCB124 (рис. 4.12).

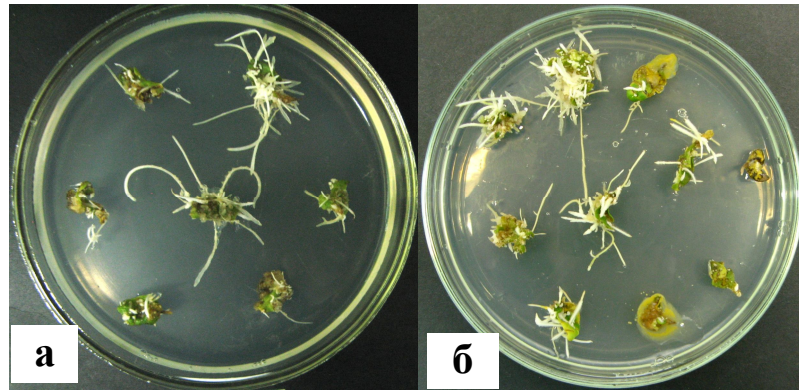


Рис. 4.10 – Початок коренеутворення на листових експлантах алтеї після трансформування агробактеріями з вектором pCB161 (а) та диким штамом А4 (б)

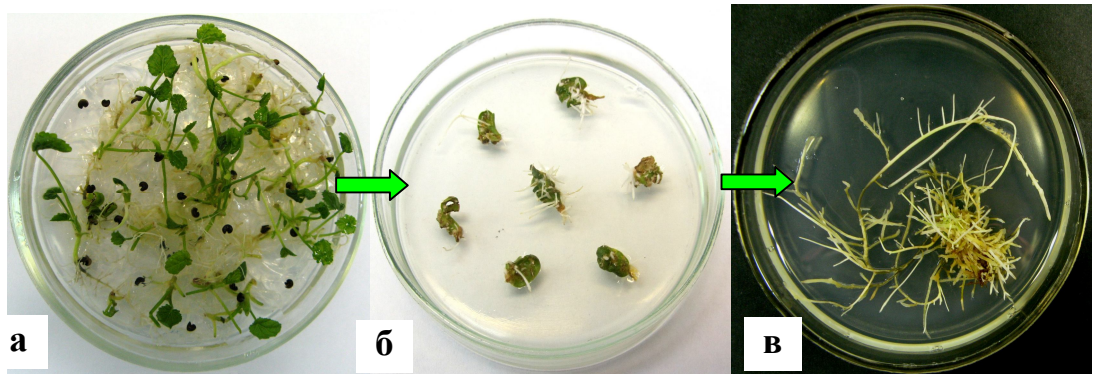


Рис. 4.11 – Отримання «бородатих» коренів *Althaea officinalis*: культивовані *in vitro* рослини (а), формування коренів на листках після трансформації (б), трансгенні корені, культивовані на безгормональному живильному середовищі 1/2МС (в)

Термінальні ділянки коренів довжиною близько 10 мм відділяли від експлантів та переносили на поверхню живильного середовища 1/2МС для нарощування біомаси. Всі отримані корені мали характерний для «бородатих» коренів фенотип – розгалуження, відсутність позитивного геотропізму, та росли на середовищі без регуляторів росту, що може бути обумовлено перенесенням в геном рослин  $T_L$  фрагменту Т-ДНК pRi плазмиди агробактерій. Разом з тим, корені різних ліній незалежно від способу їх отримання (трансформування диким штамом або бактеріями з

векторами pCB161 та pCB124) значно відрізнялися за фенотипом та швидкістю росту. Так, 2 % ліній відзначалися потовщенням коренів та позеленінням при вирощуванні в умовах освітлення (рис. 4.13, а), 3% ліній відрізнялися повільним ростом (рис. 4.13, б), інші лінії відзначалися швидким ростом та значним галуженням (рис. 4.13, в).

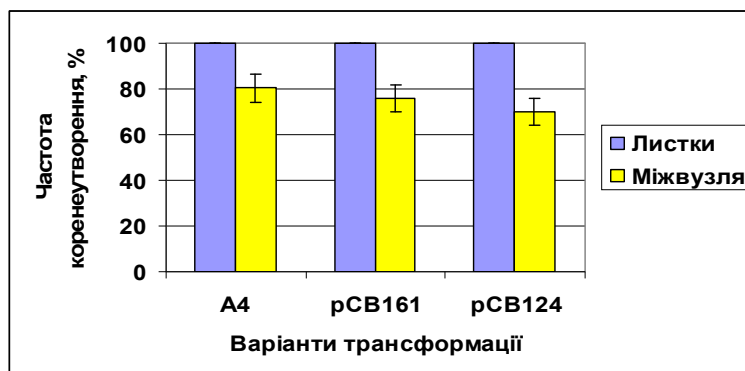


Рис. 4.12 – Частота коренеутворення *Althaea officinalis* після трансформування за допомогою *A. rhizogenes* (A4 – дикий штам A4, pCB161 та pCB124 – агробактерії з вектором pCB161)

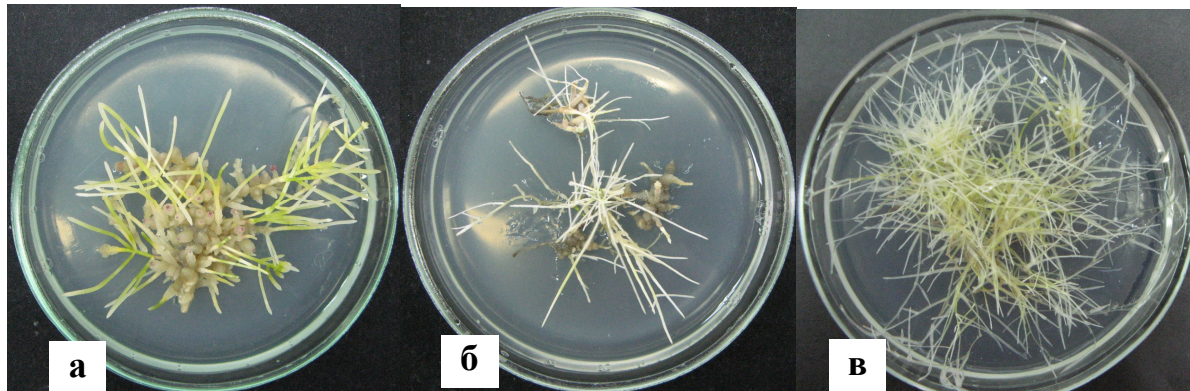


Рис. 4.13 – Відмінності у фенотипі ліній трансгенних коренів, отриманих після трансформування з використанням *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації: потовщення коренів (а), повільний ріст (б), швидкий ріст, значне галуження (в). Ріст протягом 30 діб.

4.3.3. Молекулярно-біологічний аналіз коренів алтеї, отриманих після трансформації. Методом ПЛР було визначено, що усі досліджувані зразки ДНК з трансгенних коренів мали *rolB* ген (рис. 4.14, а, лінії 6-9), у контрольних зразках цей ген не детектувався (лінія 10).

Корені, отримані з використанням агробактерій з векторами pCB161 та pCB124, мали цільові гени *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b* (рис. 4.14, а, треки 1-4 та рис. 4.14, б, треки 1-3, 5, 6). Отже, застосована методика генетичної трансформації з використанням бактерій *A. rhizogenes* як дикого штаму, так і тих, що несли вектори з генами *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*, виявилася ефективною, 100% аналізованих коренів мали перенесені гени. З метою визначення того, чи транскрибуються перенесені гени *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*, використовували полімеразну ланцюгову реакцію, пов'язану зі зворотною транскрипцією. Вибірковий аналіз виявив зворотні транскрипти в усіх досліджуваних зразках (рис. 4.14, в, табл. 4.2).

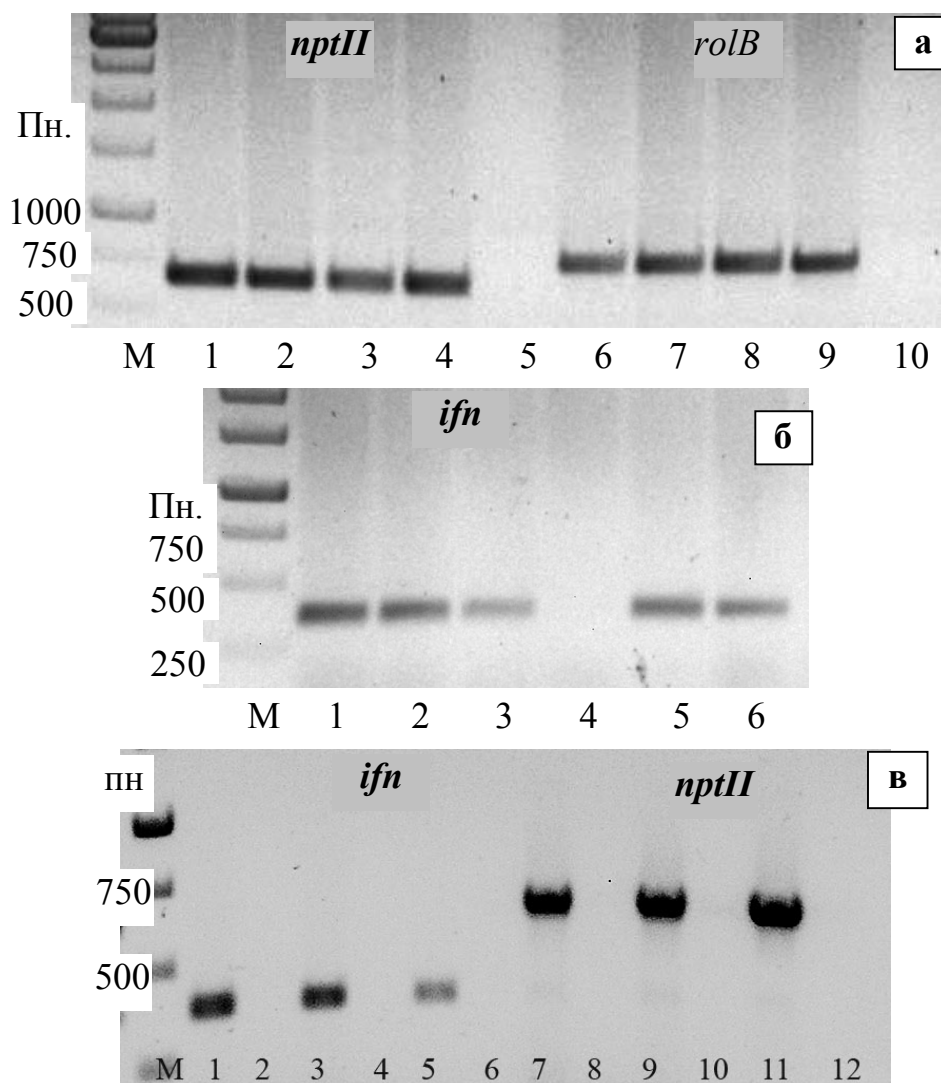


Рис. 4.14 – Електрофореграма продуктів ПЛР (а, б) «бородатих» коренів алтеї та ЗТ-ПЛР (в): а – з використанням праймерів до генів *nptII* (1-5, 622 п.н.) та *rolB* (6-10, 780 п.н.), 5 та 10 – ДНК вихідної



нетрансформованої рослини; **б** – з використанням праймерів до гена *ifn- $\alpha$ 2b* (396 п.н.), **4** – ДНК нетрансформованої рослини; **в** – непарні з ревертазою, парні без ревертази; **М** – маркер Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas

Таблиця 4.2 –

**Результати ЗТ-ПЛР аналізу зразків коренів алтеї, отриманих з шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації**

№	Зразок коренів, № лінії	ПЛР аналіз на наявність генів			ЗТ-ПЛР аналіз транскрибування генів	
		<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	<i>nptII</i>	<i>rolB</i>	<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	<i>nptII</i>
1	контроль	-	-	-	-	-
2	pCB124 №1	+	+	+	+	+
3	pCB124 №2	+	+	+	+	+
4	pCB124 №4	+	+	+	+	+
5	pCB124 №6	+	+	+	*	*
6	pCB124 №8	+	+	+	*	*
7	pCB124 №9	+	+	+	*	*
8	pCB124 №10	+	+	+	*	*
9	pCB161 №2	+	+	+	+	+

Продовження таблиці 4.2						
10	pCB161 №бн	+	+	+	+	+
11	pCB161 №1	+	+	+	+	+
12	pCB161 №5	+	+	+	+	+
13	pCB161 №7	+	+	+	+	+
14	A4 №1	-	-	+	*	*
15	A4 №3	-	-	+	*	*
16	A4 №7	-	-	+	*	*
17	A4 №8	-	-	+	*	*
18	A4 №9	-	-	+	*	*
19	A4 №10	-	-	+	*	*
+ Позитивний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; – Негативний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; * Не аналізували						

Таким чином, явища мовчання перенесених генів, яке іноді має місце при трансформації ядерної ДНК, у отриманих трансгенних коренях алтеї не спостерігалось.

Отримані результати свідчать про те, що бактерії *A. rhizogenes* як дикого штаму А4, так і бактерії, що несуть чужорідну плазмиду (вектор pCB161 або pCB124), можуть бути використані для трансформування та отримання культури «бородатих» коренів рослин *A. officinalis*. Частота трансформації рослин *A. officinalis* залежала від типу експланту. Максимальна частота отримання «бородатих коренів становила 100% при використанні у якості експлантів листків культивованих *in vitro* рослин. Дещо нижчою виявилася частота отримання коренів з міжвузль. Вона становила  $80\pm 6,2\%$ ,  $76\pm 5,9\%$  та  $70\pm 5,6\%$  при використанні відповідно

дикого штаму агробактерій А4 та *A. rhizogenes* з векторами pCB161 та pCB124.

Отримані корені різних ліній незалежно від того, якими агробактеріями здійснювали трансформацію (трансформування диким штамом А4 або бактеріями з векторами pCB161 та pCB124) значно відрізнялися за фенотипом та швидкістю росту. Ряд ліній коренів фенотипові відрізнялися потовщенням та позеленінням при вирощуванні в умовах освітлення, частина ліній мала низьку швидкість росту, інші лінії відзначалися швидким ростом та значним галуженням.

Методом ПЛР було визначено, що усі досліджувані зразки ДНК з трансгенних коренів мали перенесені гени (*rolB* ген у випадку трансформування диким штамом агробактерій та *rolB*, *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b* у випадку використання для трансформації бактерій з векторами pCB161 та pCB124), у всіх аналізованих лініях транскрибувалися перенесені гени. Таким чином, використання оптимізованого методу *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації дало можливість з високою ефективністю (до 100%) отримати культури трансгенних коренів *A. officinalis* з генами *rolB*, *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*.

#### 4.4. Генетична трансформація рослин *Artemisia tilesii*

4.4.1. Трансформація рослин полину з використанням *Agrobacterium rhizogenes*. Для трансформації використовували рослини *A. tilesii* з колекції зародкової плазми ІКБП. У якості експлантів брали листки рослин, культивованих *in vitro*. Використовували методику, описану у розділі 2.11. Трансформування здійснювали бактеріями дикого типу *A. rhizogenes* А4, а також агробактеріями з векторами pCB 124 та pCB161. Перші корені на експлантах при культивуванні на живильному середовищі 1/2МС утворювалися уже через 6 діб після трансформації (рис. 4.15). Через 10 діб після трансформація визначали частоту отримання



«бородатих» коренів (табл. 4.3). Попередньо проведені експерименті свідчили про те, що кількість сформованих коренів після нетривалого часу культивування експлантів на середовищі без цефотаксиму є невисокою, ріст коренів у цьому випадку був повільний, хоча кількість експлантів, на яких корені утворювалися, становила 38-60%. Тому для трансформації було використано методику, оптимізовану при генетичній трансформації рослин цикорію. Так само як і для цикорію, доведено, що збільшення терміну культивування без цефотаксиму з 1 до 3 діб призводить до підвищення відсотку експлантів, на яких утворювалися корені (з 60 до 100%), збільшення кількості коренів, утворених на одному експланті ( $2,3 \pm 0,57$  до  $3,85 \pm 1,06$ ) та збільшенні середньої довжини коренів (з  $4,5 \pm 0,54$  до  $14 \pm 2,07$  мм).

Таблиця 4.3 –

**Параметри процесу коренеутворення на листових експлантах *A. tilesii* за різних умов культивування після трансформації з використанням *A. rhizogenes***

Використані вектори	Характеристика коренеутворення при різному терміні культивування експлантів без цефотаксиму після трансформації (доба)		
	Частота, %	Кількість коренів на експлант, шт.	Довжина коренів, мм
Одна доба			
pCB 124	40	1	$0,23 \pm 0,06$
pCB161	60	$2,3 \pm 0,57$	$4,5 \pm 0,54$
A4	$38,3 \pm 3,27$	$3,57 \pm 0,39$	$3,71 \pm 0,56$
Три доби			
pCB 124	$65 \pm 5,65$	$7,1 \pm 1,96$	$14,37 \pm 1,7$
pCB161	100	$3,85 \pm 1,06$	$14 \pm 2,07$
A4	100	$4,14 \pm 0,66$	$9,86 \pm 2,36$

Утворені на експлантах корені відділяли від листків та переносили на живильне середовище з цефотаксимом для повної елімінації агробактерій. Субкультивування коренів проводили на тому самому живильному середовищі

кожних два тижні. Через два місяці культивування було проведено ПЛР аналіз на наявність агробактеріальної контамінації (визначення присутності *virD* гена агробактерій, який для усіх аналізованих ліній був негативним. Отримані корені мали характерний для «бородатих» коренів фенотип, значне галуження та виражений від'ємний геотропізм (рис. 4.15).

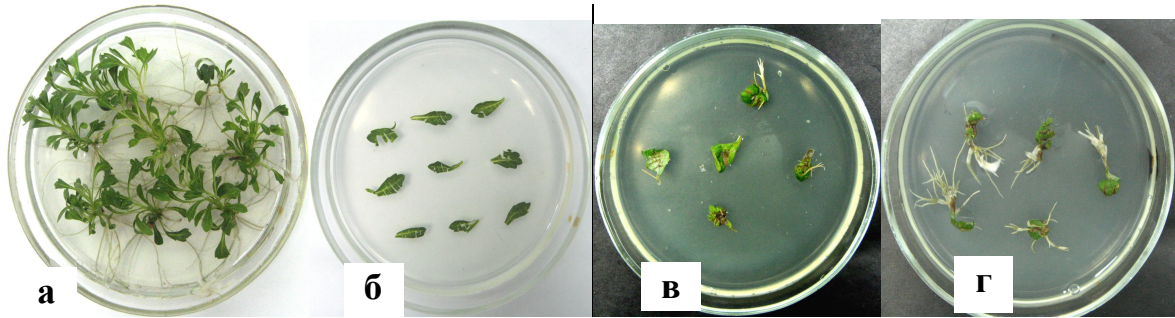


Рис. 4.15 – Трансформація листових експлантів *Artemisia tilesii* plants з використанням *A. rhizogenes* : **а** – вихідні рослини, культивовані у стерильних умовах; **б** – контроль, листки полину на середовищі 1/2МС без кокультивування з агробактеріями; **в, г** – початок формування «бородатих» коренів на експлантах за різного часу культивування (1 та 3 доби) на живильному середовищі без цефотаксиму

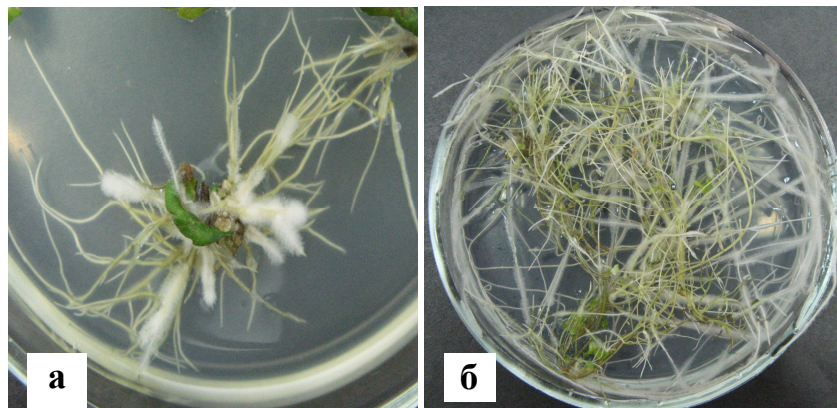


Рис. 4.16– Ріст «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* через три тижні (**а**) та два місяці (**б**) після кокультивування з *A. rhizogenes*

4.4.2. Визначення наявності та активності перенесених генів у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii*. Для визначення наявності перенесених генів у «бородатих» коренях *A. tilesii* використовували ПЛР аналіз загальної ДНК «бородатих» коренів з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII*, *ifna2b* та *rolB* (див.

табл. 2.6). Усього було проаналізовано 16 ліній коренів, з них 6 отримано з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* A4, 6 – з використанням *A. rhizogenes*, які мали вектор pCB124 та 4 – з використанням *A. rhizogenes* з вектором pCB161. Отримані результати свідчать про те, що усі аналізовані зразки ДНК мали відповідні до використаних для трансформації агробактерій та векторів гени – *nptII*, *ifn $\alpha$ 2b* та *rolB* при трансформуванні векторами pCB 124 та pCB161 або лише *rolB* ген агробактерій після трансформування диким штамом агробактерій (рис. 4.17).

ПЛР аналізи було повторно проведено після шести місяців субкультивування ліній коренів. Результати цих аналізів виявилися аналогічними попереднім. Таким чином, наявність вказаних генів свідчить про трансгенну природу отриманих коренів та ефективність застосованої методики трансформації.

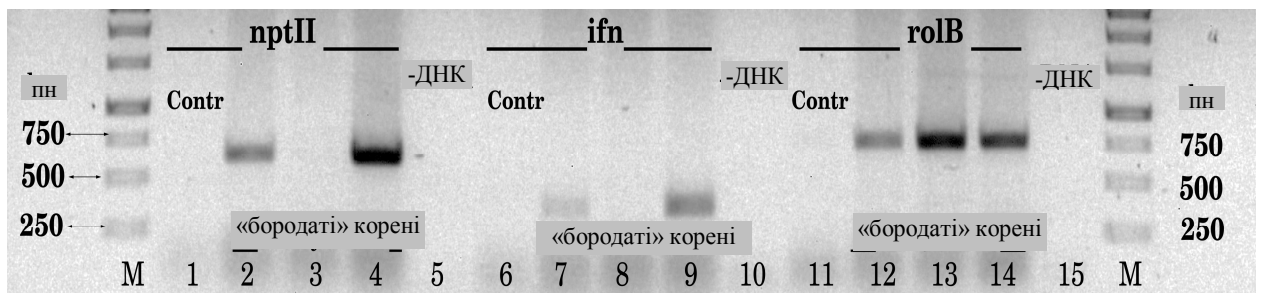


Рис. 4.17 – Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу загальної ДНК «бородатих» коренів *A. tiliacii* з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII*, *ifn- $\alpha$ 2b* та *rolB*: ДНК контрольної нетрансформованої рослини (1, 6, 11); клони, трансформовані *A. rhizogenes* A4 (3, 8, 13), *A. rhizogenes* pCB124 (2, 7, 12), *A. rhizogenes* pCB161 (4, 9, 14); -DNA – без ДНК; *nptII*, *ifn* та *rolB* – аналіз ДНК з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII* (622 пн), *ifn- $\alpha$ 2b* (396 пн) та *rolB* (780 пн); М –маркер Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas

Ряд ліній коренів вибірково аналізували методом полімеразної ланцюгової реакції, пов'язаної із зворотною транскрипцією, для визначення транскрибування перенесених генів *nptII* та *ifn- $\alpha$ 2b*. Такий

аналіз виявив, що у декількох з аналізованих (4 з 9) ліній мРНК досліджуваного гена *ifn $\alpha$ 2b* не детектувалася (рис. 4.18), що свідчить про неактивність цього гена. В той же час, у всіх досліджених зразках було виявлено зворотні транскрипти гена *nptII*, що є цілком логічним, оскільки культивування зразків проводили у присутності канаміцину.

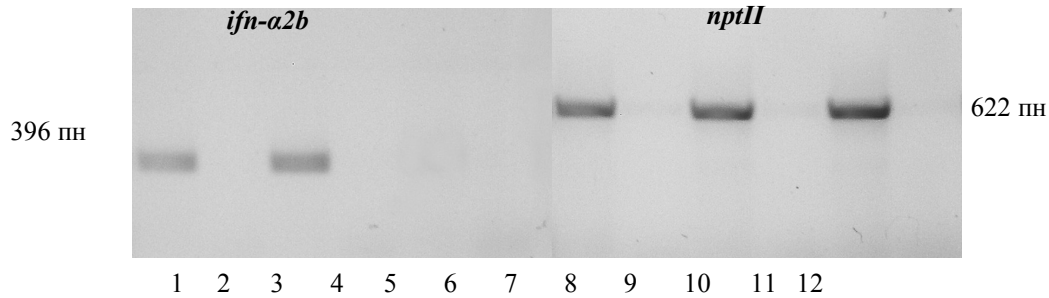


Рис. 4.18 – Електрофореграма продуктів аналізу зворотніх транскриптів генів *nptII* (622 п.н) та *ifn- $\alpha$ 2b* (396 п.н) у «бородатих» коренях *A. tiliisii*: парні треки – без ревертази, непарні – з ревертазою

Таким чином, при використанні дикого штаму *A. rhizogenes* A4, *A. rhizogenes* pCB124 та *A. rhizogenes* pCB161 з частотою до 100% (залежно від умов кокультивування з агробактеріями та використаного вектору) отримано культури «бородатих» коренів *A. tiliisii*. Визначено, що збільшення часу культивування експлантів після трансформації на живильному середовищі без цефотаксиму до трьох діб призводило до збільшення частоти трансформації та кількості коренів, утворених на одному експланті. Методом ПЛР підтверджено наявність перенесених генів в усіх аналізованих зразках. ЗТ-ПЛР аналіз у частини зразків не виявив наявності мРНК гена інтерферону- $\alpha$ 2b при наявності мРНК для гена *nptII* в усіх аналізованих зразках. Такий факт свідчить про те, що у ряді випадків (чотири з дев'яти аналізованих зразків) відбувалося мовчання цільового гена інтерферону-  $\alpha$ 2b. Аналогічне явище нами раніше було виявлено і при аналізі отриманих трансгенних рослин цикорію.

**Результати ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізів ДНК  
«бородатих» коренів *A. tilesii***

№	Зразок коренів, № лінії	ПЛР аналіз на наявність генів			ЗТ-ПЛР аналіз транскрибування генів	
		<i>ifn- α2b</i>	<i>nptII</i>	<i>rolB</i>	<i>ifn-α2b</i>	<i>nptII</i>
1	контроль	-	-	-	-	-
2	pCB124 №1	+	+	+	+	+
3	pCB124 №2	+	+	+	+	+
4	pCB124 №5	+	+	+	+	+
5	pCB124 №5/1	-	-	+	-	+
6	pCB124 №10	+	+	+	-	+
7	pCB161 №2	+	+	+	+	+
8	pCB161 №2/1	+	+	+	+	+
9	pCB161 №7	+	+	+	-	+
10	pCB161 №5	+	+	+	-	+
11	A4 №1	-	-	+	*	*
12	A4 №3	-	-	+	*	*

+ Позитивний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; – Негативний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; \* Не аналізували

#### 4.5. Генетична трансформація рослин *Bidens pilosa*

4.5.1. Отримання культури трансгенних коренів причепи волосистої з використанням *A. rhizogenes*. У експериментах використовували листки та міжвузля рослин, які попередньо було уведено в культуру *in vitro* з насіння, зібраного у природному ареалі виду в Еквадорі (територія Ла Фаворита, висота над рівнем моря 1100 м) та які вирощували і розмножували живцюванням на агаризованому живильному середовищі 1/2МС при температурі +24°C та 16-годинному освітленні. Для генетичної трансформації використовували бактерії *A. rhizogenes* з векторними конструкціями pCB161 та pCB124, які мала гени *ifn-α2b* (MII або 35S промотор, оcs термінатор) та *nptII* (nos промотор, nos термінатор) та дикий штам агробактерій А4. У якості контролю використовували експланти, які не культивували у бактеріальній суспензії. Після кокультивування з агробактеріальною суспензією листових та стеблових експлантів ріст коренів розпочинався через 7-10 діб, причому на листових експлантах кількість утворених коренів була значно меншою, ніж на стеблових (2-8 та 12-22 відповідно, рис. 4.19).

Відокремлені від експлантів корені культивували на середовищі 1/2МС з цефотаксимом для елімінації агробактерій та субкультивували щотижня. Частота коренеутворення була вищою при використанні стеблових експлантів та становила  $56,7 \pm 6,5\%$  та  $84,4 \pm 5,8\%$  при використанні дикого штаму А4,  $43,3 \pm 6,5\%$  та  $65,7 \pm 11,1\%$  при використанні вектора pCB124,  $50,0 \pm 8,0\%$  та  $70,0 \pm 8,0\%$  при використанні вектора pCB161 відповідно для листових та стеблових експлантів. Через 3-4 тижні вирощування на живильному середовищі 1/2МС з 600 мг/л цефотаксиму корені мали характерний фенотип – значне галуження, від’ємний геотропізм та росли на середовищі без регуляторів росту. Лінії «бородатих» коренів уже на початковому етапі культивування відрізнялися фенотипові за ступенем галуження, а також за швидкістю росту (рис. 4.20).



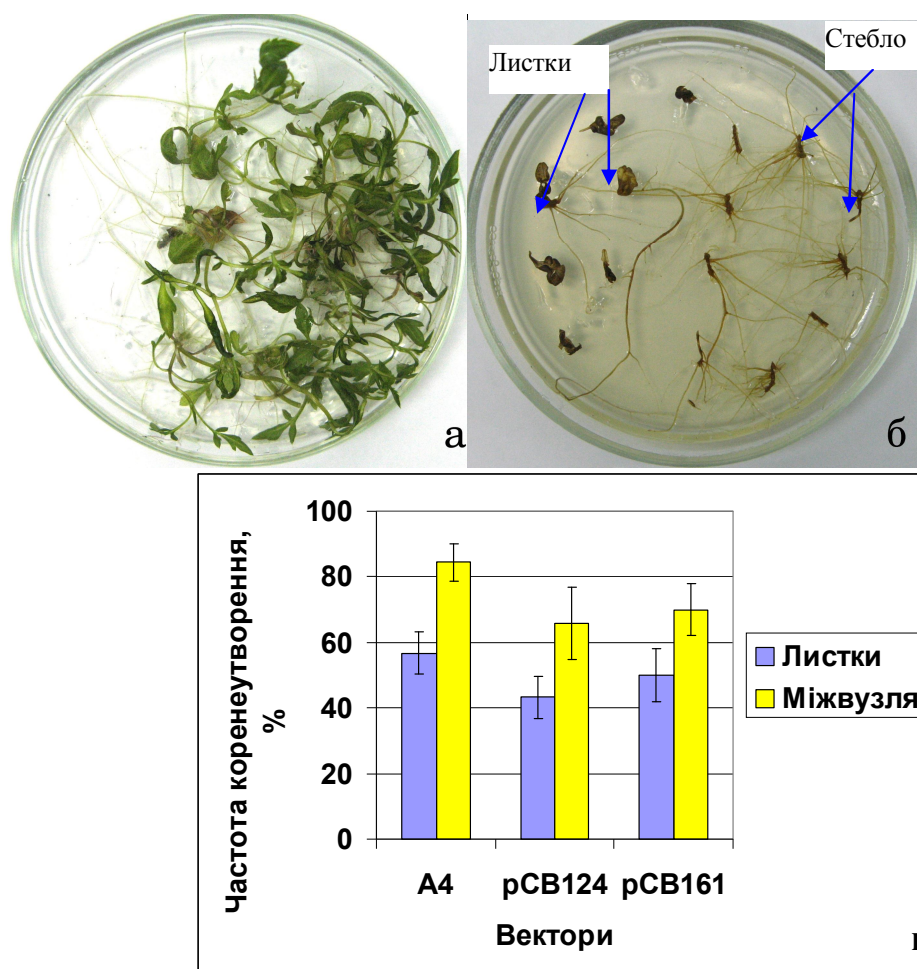


Рис. 4.19 – Ріст рослин *B. pilosa in vitro* (а), утворення «бородатих» коренів на листових та стеблових експлантах після трансформування з використанням *Agrobacterium rhizogenes* (б) та частота коренеутворення при використанні листків та міжвузль у якості експлантів (в)

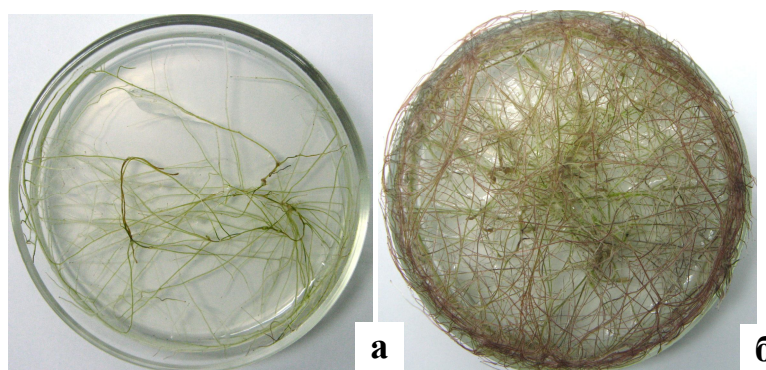


Рис. 4.20 – Відмінності у швидкості росту ліній трансгенних коренів *B. pilosa*: повільний (а) та швидкий (б) ріст (культивування протягом 30 діб)

Отже, вперше показано можливість генетичної трансформації рослин *B. pilosa* з використанням *A. rhizogenes*. Шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації було отримано «бородаті» корені, причому більш придатним типом експлантів для генетичної трансформації виявилися міжвузля культивованих *in vitro* рослин *B. pilosa*. Частота отримання «бородатих» коренів за їх використання становила до 84,4±5,8%, 65,7±11,1% та 70,0±8,0% за використання відповідно дикого штаму А4, агробактерій з векторами pCB124 та pCB161.

4.5.2. Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів *B. pilosa*. Молекулярно-біологічний аналіз отриманих коренів *B. pilosa* виявив наявність як *rolB* генів *A. rhizogenes*, так і селективного гена *nptII* та цільового гена *ifn- $\alpha$ 2b* (рис. 4.21). При повторному аналізі, проведеному через 6 місяців субкультивування отриманих коренів, трансгени також детектувалися.

Аналіз зворотних транскриптів гена *ifn- $\alpha$ 2b* у 50% аналізованих коренів був негативним (рис. 4.22). У той же час, зворотні транскрипти гена неоміцинофосфотрансферази II детектувалися у всіх досліджених зразках. Отже, для ряду ліній коренів, так само як і у «бородатих» коренях цикорію, спостерігалось явище мовчання цільового гена *ifn- $\alpha$ 2b* за активності селективного гена.

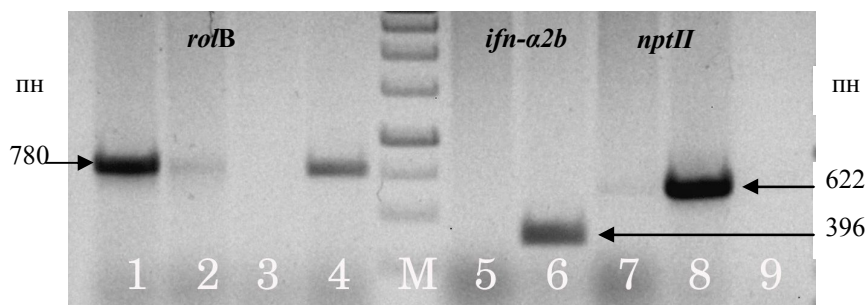


Рис. 4.21 – Електрофореграма продуктів ампліфікації на наявність перенесених генів: *rolB* (1- 4, 780 п.н.); *ifn- $\alpha$ 2b* (5, 6, 396 п.н.) та *nptII* (7, 8, 622 п.н.); 9 – без ДНК; 3, 5, 7 – ДНК коренів контрольних рослин, М – маркер Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas



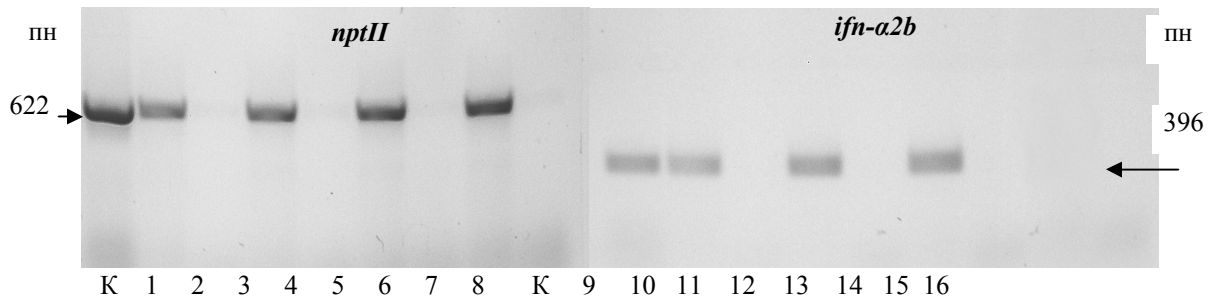


Рис. 4.22 – Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами, специфічними до генів *nptII* (622 п.н) та *ifn-α2b* (396 п.н) у «бородатих» коренях причепи: парні треки – проведення реакції без ревертази, непарні – з ревертазою; К – плазмідна ДНК; 1-16 – трансгенні корені

Таблиця 4.5 –

**Результати ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізів ДНК  
«бородатих» коренів *A. tilesii***

№	Зразок коренів, № лінії	ПЛР аналіз на наявність генів			ЗТ-ПЛР аналіз транскрибування генів	
		<i>ifn-α2b</i>	<i>nptII</i>	<i>rolB</i>	<i>ifn-α2b</i>	<i>nptII</i>
1	контроль	-	-	-	-	-
2	pCB124 №1	+	+	+	-	+
3	pCB124 №3	+	+	+	+	+
4	pCB124 №5	+	+	+	+	+
5	pCB161 №3	+	+	+	+	+
6	pCB161 №4	+	+	+	-	+
7	pCB161 №7	+	+	+	-	+
8	A4 №1	-	-	+	*	*
9	A4 №2	-	-	+	*	*

+ Позитивний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; – Негативний ПЛР або ЗТ-ПЛР аналіз; \* Не аналізували

Таким чином, було отримано корені, які мали характерний для «бородатих» коренів фенотип та росли на середовищі без додавання

регуляторів росту. Методом ПЛР з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB* *A. rhizogenes*, та праймерів до генів *ifn- $\alpha$ 2b* і *nptII* було підтверджено трансгенну природу отриманих культур. Отже, використана методика трансформування з використанням *A. rhizogenes* виявилася достатньо ефективною та дала можливість отримати трансгенні корені рослин *B. pilosa*, хоча у декількох випадках виявлено мовчання цільового гена. Частота трансформації виявилася значно вищою, ніж у єдиних опублікованих у 2012 р. дослідженнях з трансформування *B. pilosa* Wang зі співавторами [586], у яких за використання *A. tumefaciens* з 1373 експлантів було отримано лише 13 трансгенних рослин, тобто, частота трансформації становила близько 1%.

Слід відзначити, що раніше для трансформації *B. pilosa* використовували лише бактерії *A. tumefaciens*. У наших експериментах уперше було запропоновано використання *A. rhizogenes* для генетичної трансформації рослин череди волосистої, розроблено ефективну систему їх трансформування та з частотою до  $84,4 \pm 5,8\%$  отримано культуру «бородатих» коренів з типовим для трансгенних коренів фенотипом. Методом ПЛР підтверджено наявність перенесених генів *rolB*, *ifn- $\alpha$ 2b* та *nptII*. Запропонована нами методика може бути використана для ефективного отримання культури трансгенних коренів *B. pilosa* як із застосуванням агробактерій дикого типу, так і для перенесення до цих рослин цільових генів, які відповідають за синтез біологічно активних сполук.

#### 4.6. Генетична трансформація рослин *Ruta graveolens*

4.6.1. Розроблення методики мікроклонального розмноження рослин рути. Для отримання рослин рути духмяної використовували насіння, яке поверхнево стерилізували за наведеною вище (див. розділ 2.2) методикою. Рослини вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2МС. Визначали оптимальний тип експланту (листки, черешки,

міжвузля, корені) та оптимальний склад живильного середовища для отримання максимально ефективної регенерації пагонів. Зазначену методику розробляли, виходячи з необхідності мати велику кількість рослинного матеріалу як експлантів для генетичної трансформації, оскільки схожість використовуваного насіння була невисокою (до 20%), швидкість росту малою та малими розмірами сім'ядоль, що утруднювало їх використання.

Листки, черешки, міжвузля та корені відділяли, робили на експлантах надрізи та вирощували їх при 16-годинному освітленні та температурі 24°C на живильних середовищах, склад яких наведено у табл. 4.6. Регенераційна здатність міжвузль виявилася найвищою, частота регенерації пагонів становила 30% - 100% у залежності від використаних регуляторів росту та їх концентрацій. Вирощування міжвузль на живильному середовищі з додаванням БАП у концентрації 0,5-2,5 мг/л або на середовища з 0,5 – 1,0 мг/л БАП та 0,05 – 0,5 НОК дозволило через 10 діб отримати регеновані пагони з частотою 100% (рис. 4.23).

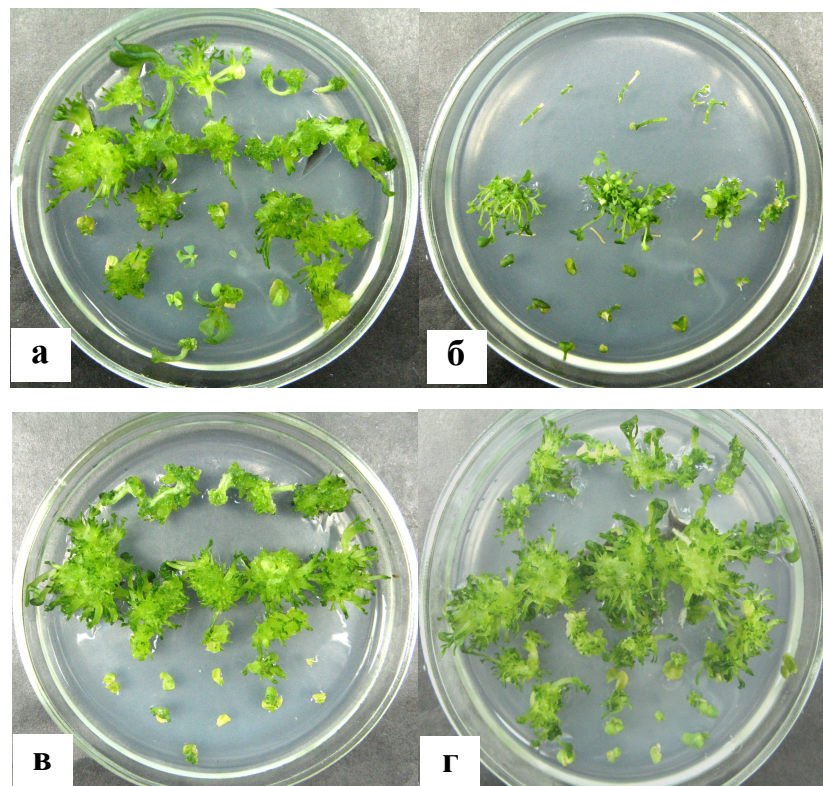


Рис. 4.23 – Регенерація рослин *Ruta graveolens* на живильних середовищах, що містили 2.5 мг/л БАП (а), 1 мг/л Кін (б), 1 мг/л БАП (в), 0.5 мг/л БАП та 0.05 мг/л НОК (г)

**Частота регенерації пагонів *R. graveolens* на живильному середовищі  
МС з додаванням регуляторів росту**

Середовища, №	Концентрація регуляторів росту, мг/л			Частота регенерації (%) при використанні різних експлантів			
	БАП	НОК	Кін	листки	корені	черешки	міжвузля
1	0.5	—	—	50	100	100	100
2	1	—	—	20	100	40	100
3	2.5	—	—	60	0	80	100
4	0.5	0.05	—	50	100	100	100
5	0.5	0.1	—	30	100	80	100
6	0.5	0.5	—	80	60	40	100
7	1	0.05	—	40	100	100	100
8	1	0.1	—	10	0	40	100
9	1	0.5	—	0	0	40	100
10	2.5	0.05	—	30	60	100	100
11	2.5	0.1	—	0	0	80	30
12	2.5	0.5	—	0	0	80	100
13	—	—	0.5	20	0	15	0
14	—	—	1	0	0	0	70
15	—	—	2.5	0	0	40	70
16	—	0.05	—	0	0	0	0
17	—	0.1	—	0	0	40	10
18	—	0.5	—	0	0	0	0

Частота утворення пагонів на листках була найменшою та варіювала у межах 0- 80% у залежності від складу середовища. Найбільшою була частота пагоноутворення з цих експлантів при використанні середовища МС з додаванням 0,5 та 0,5 мг/л НОК. Використання такої комбінації регуляторів росту дозволило підвищити частоту регенерації до 80%. Вирощування кореневих експлантів на середовищі, яке містило 0,5-1,0 або одночасно БАП та НОК у концентраціях відповідно 0,5 + 0,05 мг/л, 0,5 + 0,1 мг/л або 1,0 + 0,05 мг/л дозволило отримати пагони з частотою до 100%.

При використанні черешків частота регенерації пагонів коливалася від 15 до 100% у залежності від складу середовища. Регенерацію з частотою 100% спостерігали при культивуванні черешків на середовищі МС з додаванням БАП у концентрації 0,5 мг/л або на середовищі, яке містило комбінацію регуляторів росту БАП+НОК у концентраціях 0,5+0,05 мг/л, 1,0+0,05 мг/л та 2,5+0,05 мг/л. Слід зазначити, що БАП у найбільшій з використаних концентрацій (2,5 мг/л) пригнічував процес регенерації та значно знижував кількість експлантів усіх типів, на яких формувалися пагони.

Відомо, що регулятори росту рослин БАП та НОК використовуються для індукції регенерації пагонів рослин різних видів. Їх використовували, наприклад, для регенерації пагонів лікарських рослин *Basilicum polystachyon* [716], *Musa sapientum* L. [717], *Rauwolfia serpentine* [718], *Citrullus colocynthis* [719] та ін. У нашому дослідженні визначено, що комбінація двох регуляторів росту, БАП та НОК, є найбільш ефективною практично для усіх використовуваних типів експлантів, причому підвищення концентрації НОК (0,1-0,5 мг/л) призводило до зменшення частоти регенерації пагонів. Використання кінетину не було ефективним для регенерації пагонів рослин рути. Так, частота регенерації при використанні листків, коренів, черешків та міжвузль у якості експлантів на живильних середовищах з додаванням кінетину у концентраціях 0,1-2,5

мг/л становила відповідно 0 – 20%, 0%, 0 – 40%, 0 – 70%. Додавання до середовища МС лише ауксину НОК призводило до формування коренів при використанні листових та кореневих експлантів та до регенерації пагонів з частотою 40% або 10% при використанні відповідно черешків або міжвузль.

Таким чином, регенерація пагонів *R. graveolens* залежала як від типу використовуваного експланту, так і від наявності та концентрації регуляторів росту рослин – кінетину, бензиламінопурину та нафтилоцтової кислоти. Найкращі результати було отримано при використанні у якості експлантів міжвузль. У цьому випадку частота регенерації становила 100% у більшості варіантів експерименту, при вирощуванні на 11 живильних середовищах з 18 використовуваних. Додавання до живильного середовища МС регуляторів росту у концентраціях 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л БАП+0,05 мг/л НОК або 1,0 мг/л БАП+0,05 мг/л НОК призводило до збільшення кількості експлантів, на яких формувалися пагони. Хоча частота регенерації на міжвузлях при використанні переважної більшості живильних середовищ була високою, слід розглядати як перспективний також спосіб отримання регенерованих пагонів з використанням черешків. Це особливо може мати переваги при необхідності швидкого отримання великої кількості рослин, оскільки довжина черешків рослин рути при вирощуванні *in vitro* становила близько 40 мм, а міжвузля – лише 10 мм. Крім того, кількість черешків на одній рослині значно перевищувала кількість міжвузля, які можна використовувати для високоефективного міклоклонального розмноження. Отже, вважаємо, що найкращим типом експланту для масової регенерації рослин рути та для отримання максимальної кількості рослин доцільним є використання саме черешків та їх культивування на живильному середовищі МС з додаванням 0,5 мг/л БАП або одночасного додавання 0,5 мг/л БАП та 0,05 мг/л НОК. За таких умов при використанні мінімальних концентрацій регуляторів росту можна отримати регенеровані пагони рути з частотою 100%.

4.6.2. Трансформування рути з використанням *A. rhizogenes*. Для отримання трансгенних коренів рослин *Ruta graveolens* використовували черешки вирощуваних *in vitro* рослин (рис. 4.24). Генетичну трансформацію проводили з використанням бактерій *A. rhizogenes* з вектором pCB124 (гени *ifn- $\alpha$ 2b* та *nptII*), а також диким штамом *A. rhizogenes* A4.

При проведенні експериментів за використання оптимізованої нами раніше методики (кокультивування експлантів з агробактеріальною суспензією протягом 30 хв, культивування експлантів на живильному середовищі без канаміцину протягом 3 діб, перенесення їх на середовища з цефотаксимом, вирощування на середовищі з канаміцином та цефотаксимом) отримати «бородаті» корені на експлантах рути не вдалося. Експланти, хоча і не гинули одразу після трансформації, коренів не формували.

Як можливе пояснення проблем, які виникли при трансформації, було висунуто припущення щодо наявності сполук у рослинах рути, які інгібують ріст *A. rhizogenes*. Основою для такого припущення є дані щодо синтезу у рослинах *R. graveolens* сполук з антимікробною активністю. Наприклад, виявлено протимікробну активність екстрактів з рослин рути проти патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* та ін. [720-722].

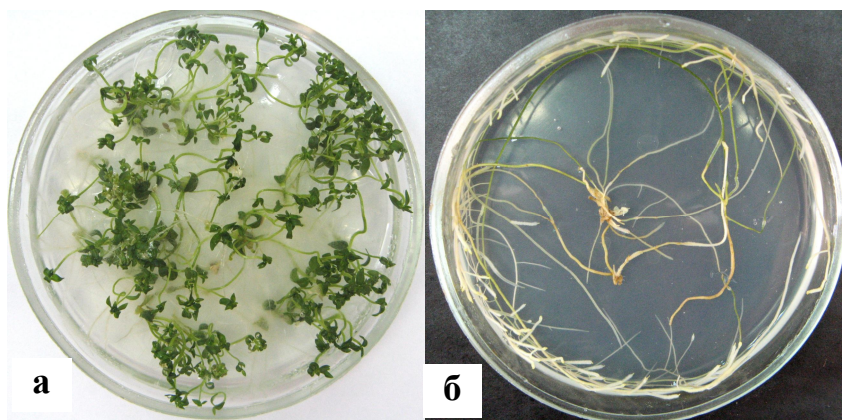


Рис. 4.24 – Культивовані у стерильній культурі рослини *Ruta graveolens* (а) та культура трансгенних коренів рути (б)



Для підтвердження наявності в рослинах рути сполук, які пригнічують ріст агробактерій, готували екстракти з рослин, культивованих *in vitro*. Тестування протимікробної активності досліджуваних екстрактів проводили диск-дифузним методом відповідно до стандарту (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993). Було визначено, що екстракти з рослин *R. graveolens* дійсно інгібували ріст агробактерій. Так, діаметр зони відсутності росту бактерій навколо диска з нанесеним екстрактом для водних, ДМСО, етанольних та ацетонових екстрактів становив відповідно  $12\pm 2$ ,  $20\pm 2$ ,  $22\pm 1$  та  $19$  мм (рис. 4.25).

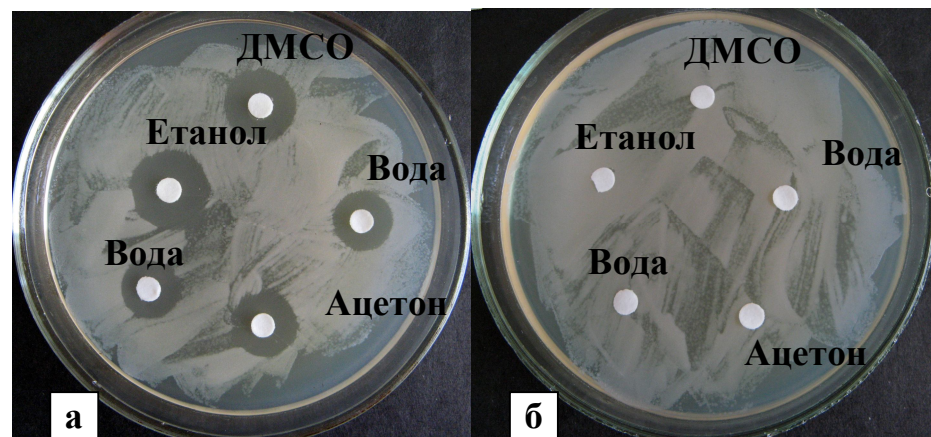


Рис. 4.25 – Визначення антимікробної активності екстрактів з рослин рути диск-дифузним методом: **а** – наявність зони відсутності росту при тестуванні дисків з екстрактами; **б** – відсутність антибактеріальної активності дисків з екстрагентами

Отже, виявлені проблеми отримання «бородатих» коренів після кокультивування черешків *R. graveolens* з суспензією *A. rhizogenes*, вірогідно, можна пояснити саме синтезуванням у цих рослинах сполук з протимікробною дією. Такі дані співставні з даними літературних джерел щодо наявності у рослин рути біологічно активних сполук. Зокрема, відома наявність інсектицидної, фунгіцидної, протизапальної, антиоксидантної активності у екстрактах з рослин рути [624, 625, 629, 723, 724]. Визначено також наявність антимікробної активності проти патогенних та умовно патогенних бактерій [636, 720-722, 723].



Нами визначено, що подовження терміну культивування експлантів на живильному середовищі 1/2МС без додавання цефотаксиму, який інгібує ріст бактерій, до 6-8 діб дало можливість отримати «бородаті» корені (рис. 4.26). У даному дослідженні частота трансформації виявилася значно нижчою, ніж при трансформуванні рослин інших видів, та становила лише  $3 \pm 0,47\%$  після трансформації *A. rhizogenes* A4. Вірогідно, за таких умов агробактерії частково виживали, розмножувалися та виконували властиву для них функцію перенесення генів до клітин рослин. Разом з тим, отримати трансгенні корені при використанні інших агробактерій не вдалося.

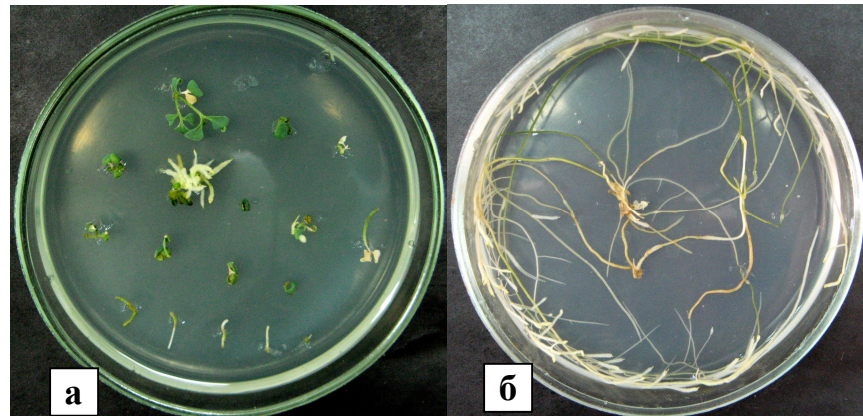


Рис. 4.26– Утворення та ріст «бородатих» коренів рослин рути духмяної на живильному середовищі без регуляторів росту: **а** – початок формування коренів на експлантах; **б** – ріст отриманих «бородатих» коренів на середовищі без регуляторів росту

4.6.3. Молекулярно-біологічний аналіз отриманих «бородатих» коренів рути. Для визначення наявності перенесених генів у отриманих коренях рути духмяної використовували метод ПЛР. Молекулярно-біологічний аналіз отриманих коренів *R. graveolens* було проведено через 3 та 6 місяців після кокультування з агробактеріями. Було виявлено наявність *rolB* генів *A. rhizogenes* (рис. 4.27).

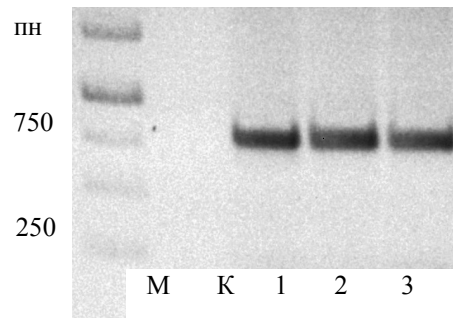


Рис. 4.27 – Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК «бородатих» коренів рути з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*: К – ДНК контрольних рослин; 1-3 – ДНК з ліній трансгенних коренів; М – маркер 1kb DNA Ladder SM1163 Fermentas

Таким чином, методом ПЛР підтверджено трансгенну природу отриманих після кокультивування з агробактеріями коренів рути духмяної.

4.6.4. Регенерація трансгенних рослин з культури «бородатих» коренів рути. При досить тривалому, більше ніж три місяці без субкультивування, вирощуванні трансгенних коренів на живильному середовищі 1/2МС без додавання регуляторів росту спостерігали пряму регенерацію пагонів без стадії формування калусу (рис. 4.28). Регеновані пагони мали фенотип, що не відрізнявся від фенотипу нетрансформованих рослин. Для укорінення пагонів їх переносили на агаризоване живильне середовище 1/2МС, при культивуванні на якому упродовж 5-12 діб формувалися пагони.

Проведений ПЛР аналіз підтвердив наявність перенесеного гена *rolB* (рис. 4.29). Таким чином, при вирощуванні трансгенних коренів рути, так само як і при культивуванні «бородатих» коренів цикорію та козельців, спостерігали пряму гормонезалежну регенерацію рослин безпосередньо з трансгенних коренів. Однак слід відзначити, що регенерація рослин рути відбувалася лише після досить тривалого вирощування коренів, що відрізняє регенераційний процес рослин цього виду від регенерації нових пагонів, наприклад, у цикорію, для якого характерна швидке спонтанне формування пагонів на трансгенних коренях.

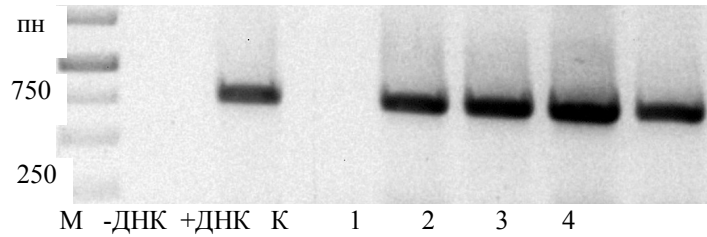


Рис. 4.28 – Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин, регенованих з «бородатих» коренів рути з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*: К – ДНК контрольних рослин; 1, 2 – ДНК «бородатих» коренів; 3, 4 – ДНК регенованих рослин; М – маркер 1kb DNA Ladder SM1163 Fermentas

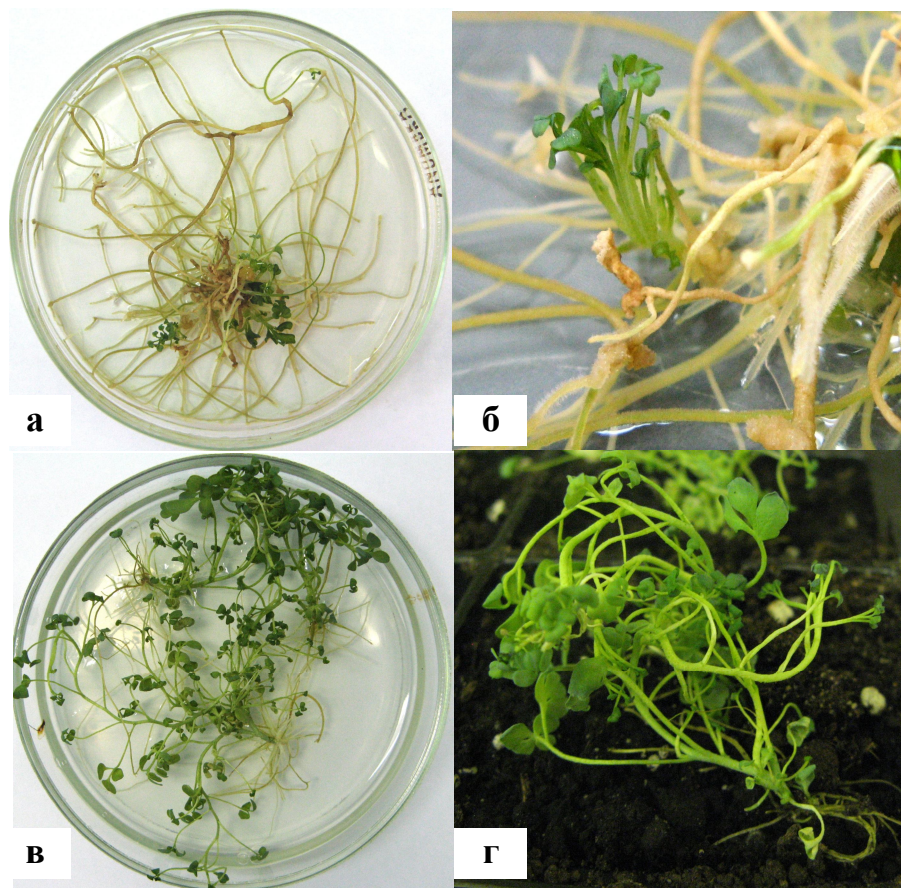


Рис. 4.29 – Регенерація пагонів з «бородатих» коренів рути (а, б), укорінення (в) та ріст у ґрунті (г)

Отримані дані щодо можливості регенерації пагонів з трансгенних коренів рути є новими, оскільки раніше не було отримано трансгенні рослини рути духмяної шляхом *A.rhizogenes*-опосередкованої

трансформації. Слід також зазначити, що такі пагони було отримано, незважаючи на наявність у рослин рути сполук, які пригнічують ріст агробактерій. Отже, шляхом подовження часу культивування експлантів після трансформації на живильному середовищі без цефотаксиму дозволяє отримати трансгенні корені і потім – регенеровані пагони, які легко укорінюються без застосування регуляторів росту. Такий спосіб, вірогідно, можна застосовувати і для трансформації інших видів рослин, що синтезують сполуки, які пригнічують ріст агробактерій.

При узагальненні результатів, викладених у даному розділі, можна визначити, що для ефективного створення трансгенних рослин чи «бородатих» коренів (їстівні та лікарські рослини) було розроблено оптимізований протокол трансформації. При проведенні досліджень було визначено фактори, які суттєво впливають на частоту отримання трансгенних рослин або «бородатих» коренів. Такими визначено час вирощування експлантів на живильному середовищі без антибіотика, який призначений для елімінування агробактерій, а також час, через який необхідно додавати до живильного середовища селективний антибіотик. Доведено, що подовження часу вирощування експлантів на живильному середовищі без цефотаксиму та зменшення часу вирощування без селективного тиску дозволяє підвищити частоту трансформації та отримати більшу кількість регенерованих пагонів або ліній «бородатих» коренів. Оптимізована методика була перевірена при генетичній трансформації рослин цикорію та салату шляхом трансформації з використанням агробактерій [725-733].

Доведено, що запропонована оптимізована методика може бути застосована при трансформації як з використанням *A. tumefaciens*, так і з використанням *A. rhizogenes* для отримання відповідно трансгенних рослин та культури «бородатих» коренів.

Оптимізована методика трансформації з використанням *A. rhizogenes* була застосована для отримання культури «бородатих»

коренів ряду лікарських видів рослин, зокрема, козельців, рути духмяної, причепи волосистої, алтеї лікарської, алеутського полину. Підтверджено, що за використання запропонованої методики можна отримати культури «бородатих» коренів названих видів рослин з високою частотою.

Виключенням є рослини рути, частота трансформації яких була невисокою, що пов'язано з наявністю сполук, які інгібують ріст бактерій *A. rhizogenes*. Було визначено, що наявність у рослин протимікробної активності проти агробактерій вимагає подовження терміну кокультивування на середовищі без антибіотиків для отримання трансформованих ліній. Такий методологічний підхід дозволив отримати трансгенні корені рути незважаючи на протимікробну активність екстрактів з цих рослин.

Отже, оптимізація методики регенерації та селекції рослин в умовах *in vitro*, генетичної трансформації, зокрема, умов кокультивування з агробактеріями, часу культивування без антибіотика, який пригнічує ріст бактерій, часу додавання селективного антибіотика, складу живильного середовища дозволило з високою частотою отримати трансформовані рослини та трансгенні корені їстівних (салат, цикорій) та лікарських (козельці, алеутський полин, причепа волосиста) рослин. Свідченням ефективності застосованої оптимізованої методики генетичної трансформації досліджуваних рослин є той факт, що методом ПЛР підтверджено наявність перенесених генів у 100% досліджуваних зразків. Методом ЗТ-ПЛР визначено, що ген *nptII* транскрибуватися в усіх аналізованих зразках досліджуваних видів рослин, в той час як у ряді випадків детектовано «мовчання» цільового гена (зокрема, у 37,5% аналізованих рослин цикорію). Незважаючи на це, висока частота регенерації пагонів після трансформування з використанням *A. tumefaciens* та отримання «бородатих» коренів після трансформування *A. rhizogenes*, а також наявність мРНК цільового гена у більшості аналізованих зразків дозволяє визначити розроблену методику трансформації ефективною та

такою, що може бути використана для трансформації рослин ряду видів, зокрема, цикорію, салату, причепи волосистої, рути духмяної, козельців, алеутського полину.

Можливість трансформації рослин *L. sativa*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* з використанням *A. rhizogenes* було визначено уперше. Слід зазначити, що також уперше запропоновано використання *A. rhizogenes* для отримання трансгенних рослин ряски малої (клас однодольні) [702], оскільки у раніше проведених дослідженнях для цієї мети використовували або *A. tumefaciens*-опосередковану трансформацію, або метод бомбардменту. Нами було визначено, що за використання *A. rhizogenes* можна отримати напряду саме рослини ряски без проміжного етапу формування «бородатих» коренів.

Таким чином, пропонована оптимізована методика генетичної трансформації може бути застосована для отримання як трансгенних рослин, так і культури «бородатих» коренів рослин різних видів з частотою до 100%. Шляхом збільшення часу культивування рослинних експлантів з агробактеріями, очевидно, можна отримати і трансгенні корені/рослини тих видів, які у певній мірі пригнічують ріст агробактерій.

## РОЗДІЛ 5

### ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ НА МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ

#### 5.1. Особливості отриманих трансгенних коренів рослин різних видів

5.1.1. Фенотипові відмінності ліній «бородатих» коренів. Отримані «бородаті» корені рослин ряду видів, як лікарських, так і їстівних, мали специфічні риси. До ознак, які були притаманні усім культурам коренів, незалежно від виду трансформованих рослин, належать такі:

- значне галуження;
- негативний геотропізм;
- гормонезалежний ріст.

Разом з тим, «бородаті» корені рослин різних видів мали відмінності. Для більшості ліній трансгенних коренів *цикорію* характерним була спонтанна регенерація пагонів на безгормональному середовища 1/2МС при вирощуванні в умовах освітлення (рис. 5.1). Однак, при культивуванні коренів однієї лінії регенерація пагонів на безгормональному середовища 1/2МС не спостерігалася. Трансгенні корені різних ліній *цикорію* відрізнялися за швидкістю росту. Так, приріст маси за 30 діб у перерахунку на одну точку росту коливався від  $21,67 \pm 1,72$  до  $221,67 \pm 25,52$  мг (рис. 5.2). Такі відмінності, вірогідно, пов'язані з тим, що при трансформуванні ядерної ДНК неможливе контрольоване вбудовування трансгенів у певно визначене місце. Так званий ефект положення генів, вірогідно, є причиною особливості синтезу ендогенних фітогормонів, що і призводить у кінцевому випадку до відмінностей у регенераційній здатності, а також швидкості росту коренів різних ліній.



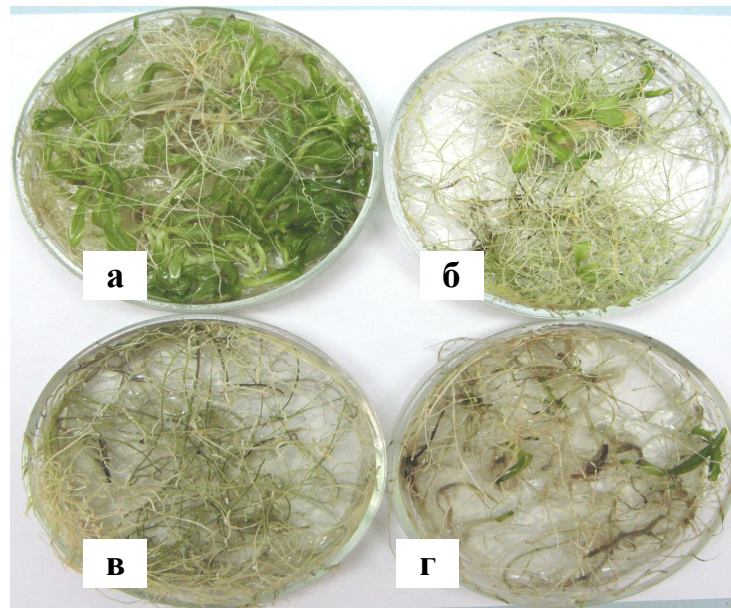


Рис. 5.1 – Фенотипові відмінності трансгенних коренів цикорію: *a* – швидка та масова регенерація пагонів на середовищі без регуляторів росту; *б* – регенерація з невисокою ефективністю; *в* – відсутність регенерації пагонів; *г* – уповільнений ріст коренів

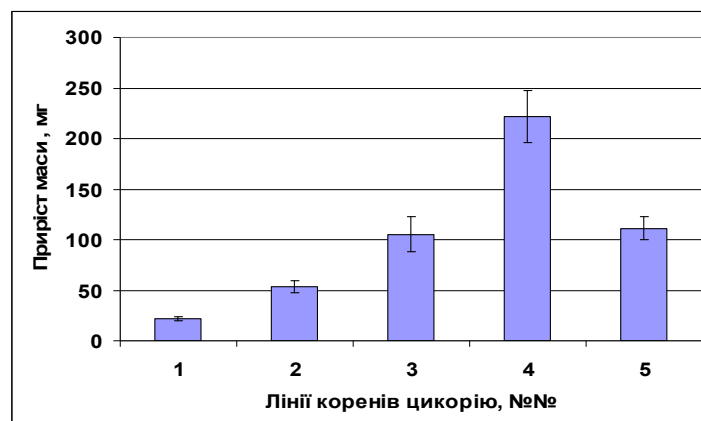


Рис. 5.2 – Відмінності у прирості маси трансгенних коренів цикорію при вирощуванні на агаризованому живильному середовищі 1/2МС

У лініях трансгенних коренів *салату* також спостерігали фенотипові відмінності. У порівнянні з «бородатими» коренями цикорію, корені салату мали злегка жовте забарвлення, були дещо потовщеними та менш розгалуженими (рис. 5.3). Регенерації пагонів на безгормональному середовищі не спостерігали, однак додавання регуляторів росту БАП та НОК у концентрації 0,5 мг/л та 0,05 мг/л відповідно дозволило отримати регеновані пагони, які укорінювалися на живильному середовищі



1/2МС. Однак, регеновані пагони вдалося отримати лише з двох ліній трансгенних коренів (з шести досліджуваних).

Трансгенні корені різних ліній салату, так само як і корені цикорію, відрізнялися за швидкістю росту, яка коливалася від  $17,67 \pm 2,84$  до  $142 \pm 8,16$  мг (приріст маси за 30 діб на одну точку росту) (рис. 5.3, 5.4).

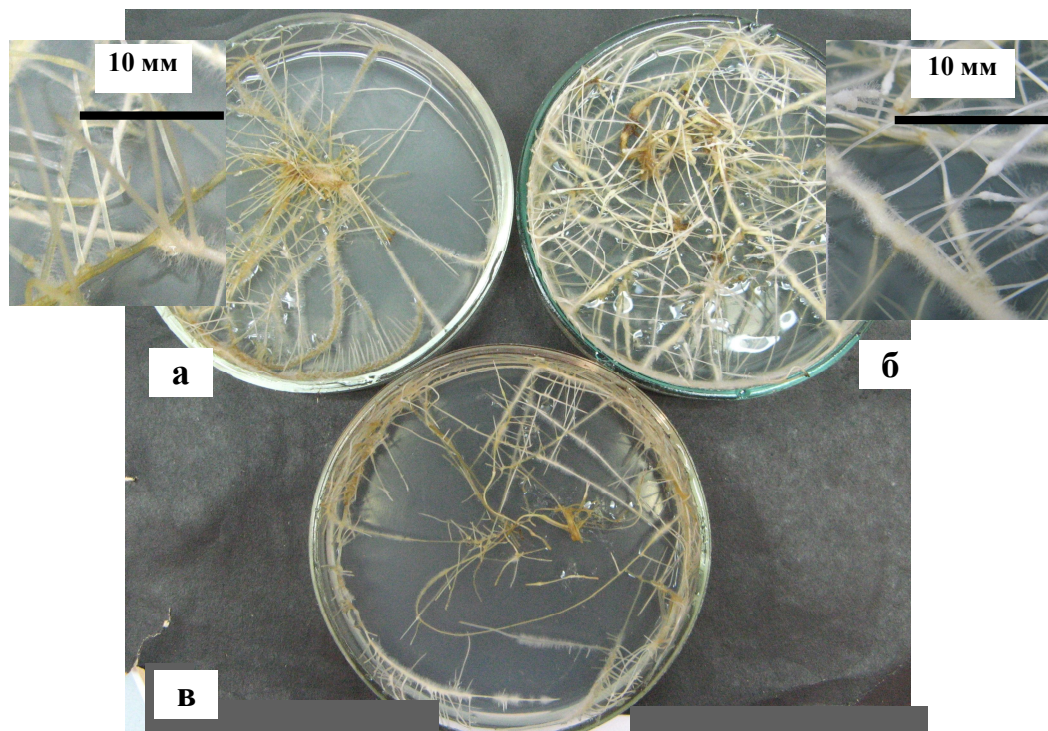


Рис. 5.3 – Відмінності ліній (а-в) трансгенних коренів салату у швидкості росту (б – найшвидший ріст) та у товщині коренів

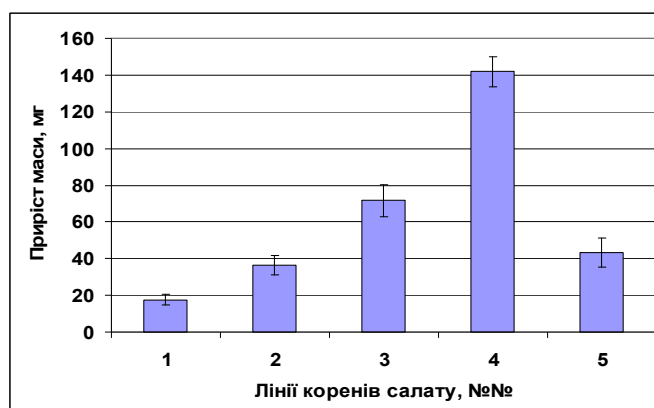


Рис. 5.4 – Приріст маси трансгенних коренів салату (у перерахунку на одну точку росту) за 30 діб

Усі трансгенні корені *козельців* росли на безгормональному середовищі, однак фенотипово відрізнялися від трансгенних коренів цикорію та салату меншим галуженням, значним потовщенням (товщина

коренів до 5 мм) та позеленінням (рис. 5.5). У них мало вираженим був негативний геотропізм. Так само, як і для коренів цикорію, у випадку вирощування «бородатих» коренів козельців спостерігали спонтанну регенерацію пагонів на безгормональній середовищі, однак, період, за який формувалися нові пагони, був значно довшим, ніж у цикорію, та становив 3-6 міс.

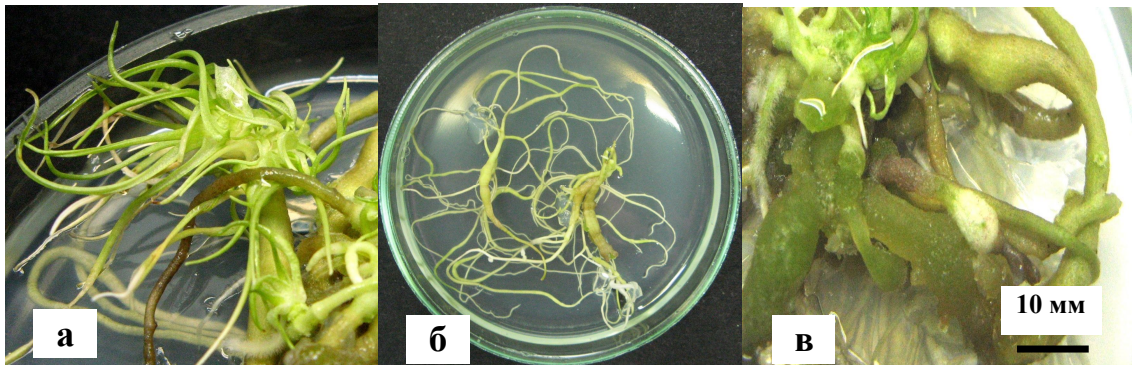


Рис. 5.5 – Відмінності росту трансгенних коренів козельців: **а** – регенерація пагонів на середовищі без регуляторів росту; **б** – регенерація відсутня, **в** – значне потовщення коренів.

Швидкість росту «бородатих» коренів козельців була невисокою, корені рослин цього виду росли повільніше, ніж корені інших досліджуваних рослин (цикорію, салату, алтеї, льонку, полину та причепи). Так само, як і для трансгенних коренів вищеназваних видів, серед ліній «бородатих» коренів козельців спостерігали значні відмінності у швидкості росту. Приріст маси за 30 днів становив  $31,67 \pm 6,67$  –  $64,67 \pm 5,10$  мг у залежності від лінії (рис. 5.6).

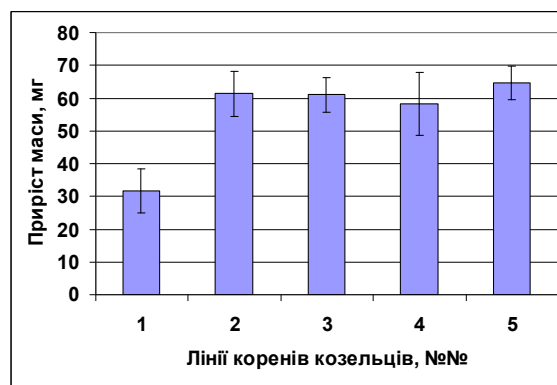


Рис. 5.6 – Приріст маси ліній трансгенних коренів козельців за 30 діб

Для отриманих ліній коренів *алтеї* був характерний ріст на середовищі без регуляторів росту, значне галуження та негативний геотропізм. Разом з тим, лінії трансформованих коренів алтеї відрізнялися між собою фенотипові. Серед них відзначено такі, для яких була характерна більша товщина коренів, до 1,5 мм (рис. 5.7). Дві лінії з отриманих зеленіли при вирощуванні в умовах освітлення. На відмінність від трансформованих коренів цикорію, козельців та салату, регенерація не відбувалася ні при культивуванні на безгормональному середовищі, ні при додаванні регуляторів росту БАП, кінетину, НОК, ІОК у різних концентраціях (від 0,05 мг/л до 3 мг/л).

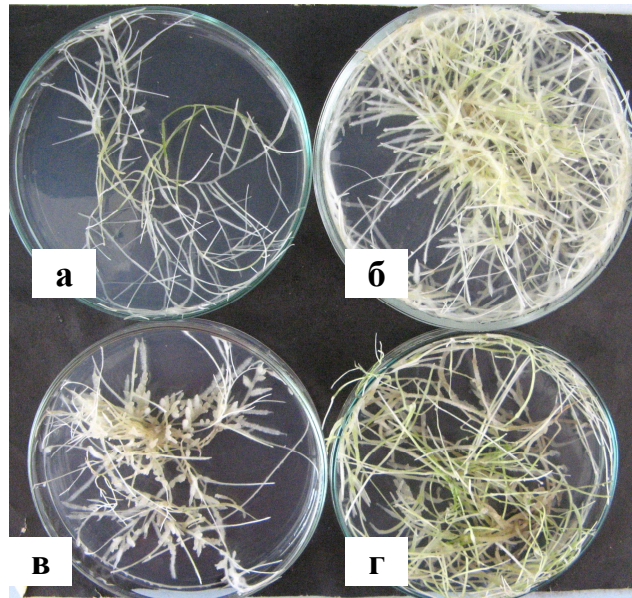


Рис. 5.7 – Фенотипові особливості росту трансгенних коренів алтеї: **а** та **б** – уповільнений та швидкий ріст відповідно; **в** – потовщення коренів; **г** – позеленіння коренів

Лінії «бородатих» коренів алтеї значно відрізнялися за швидкістю росту. Так, серед 18 ліній дві виділялися дуже швидким ростом, приріст маси за 30 діб становив до  $172,3 \pm 7,70$  мг. Отримано також корені, які росли значно повільніше. Так, найменший приріст маси коренів за 30 діб культивування становив  $51,0 \pm 10,91$  мг на одну точку росту (рис. 5.8).



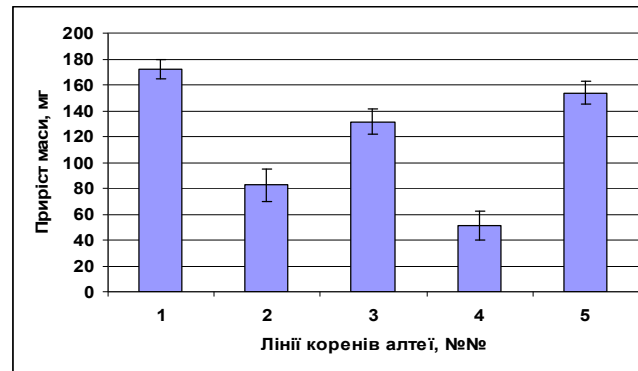


Рис. 5.8 – Приріст маси ліній «бородатих» коренів алтеї за 30 діб

«Бородаті» корені *причепи* мали свої характерні особливості (рис. 5.9). На відміну від культури трансгенних коренів інших видів (наприклад, козельців, алтеї), у них було відсутнє потовщення, діаметр не перевищував 0,5 мм. Для коренів був характерний явно виражений негативний геотропізм, значне галуження, відсутність значного опушення. Швидкість приросту маси коренів коливалася від  $61,30 \pm 13,12$  до  $153,00 \pm 13,97$  мг за 30 діб культивування на середовищі 1/2МС (рис. 5.10). Одна з ліній відзначалася наявністю фіолетово-червоного забарвлення при культивуванні більш ніж 2 тижні на живильному середовищі 1/2МС. Спонтанна регенерація не відбувалася. Регенерація не відбувалася також і при культивуванні на середовищі з додаванням регуляторів росту БАП, кінетину, НОК, ІОК у концентраціях від 0,05 мг/л до 3 мг/л.

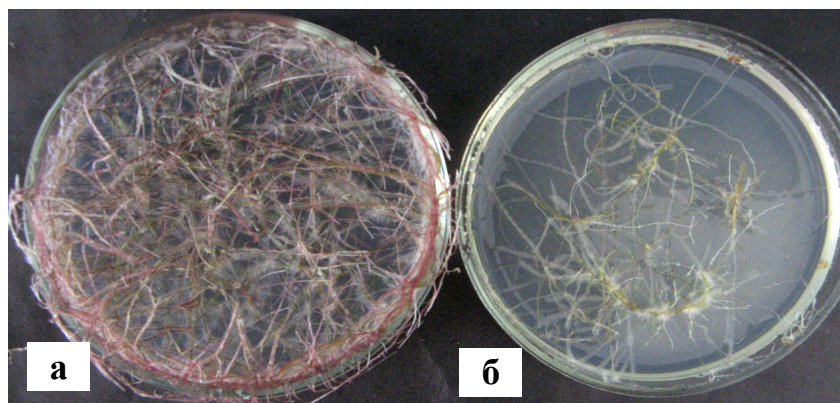


Рис. 5.9 – Ріст трансгенних коренів причепи: **а** – швидкий ріст, поява фіолетового забарвлення; **б** – ріст з повільною швидкістю, відсутність забарвлення

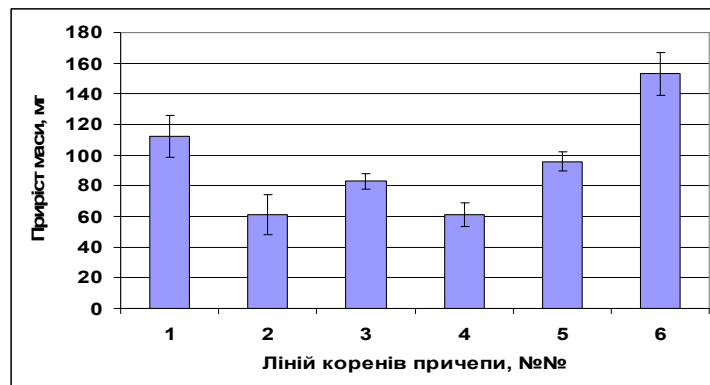


Рис. 5.10 – Приріст маси ліній трансгенних коренів причепи за 30 діб росту

Для більшості ліній «бородатих» коренів *полину* найбільш характерною ознакою було значне опушення (рис. 5.11). Усі лінії характеризувалися негативним геотропізмом, рослин на безгормональному живильному середовищі, однак відрізнялися за швидкістю росту. Для двох ліній цих коренів також характерною ознакою було позеленіння при культивуванні в умовах освітлення, хоча регенерація пагонів не відбувалася навіть при додавання до живильного середовища регуляторів росту. Приріст маси залежав від лінії та коливався у межах  $84,7 \pm 14,77$  –  $194,3 \pm 10,51$  мг за 30 діб на одну точку росту (рис. 5.12).

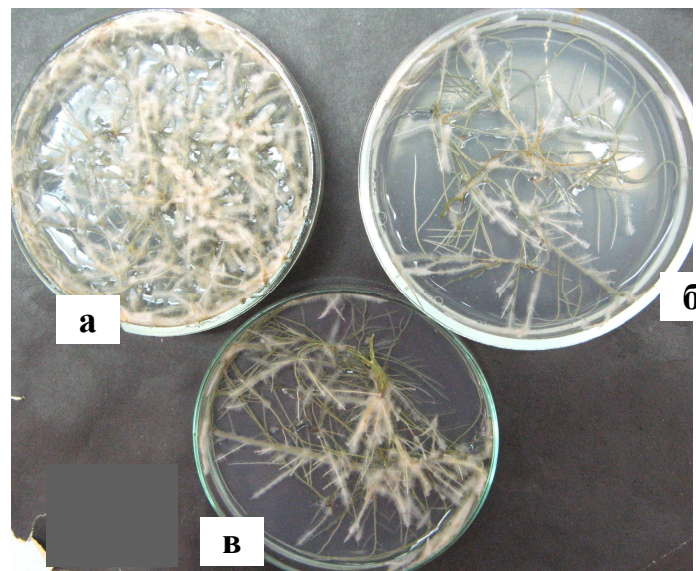


Рис. 5.11– Особливості росту трансгенних коренів *полину*: **а** – швидкий ріст, значна опушеність коренів; **б, в** – ріст з повільною швидкістю, незначна опушеність коренів; **в** – позеленіння при культивуванні в умовах освітлення

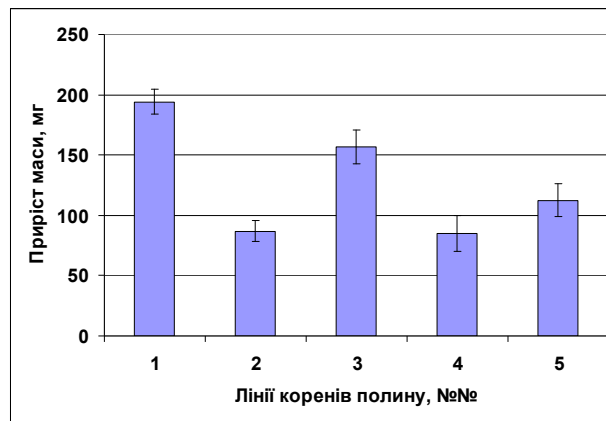


Рис. 5.12– Приріст маси ліній трансгенних коренів полину

Таким чином, визначено, що лінії трансгенних коренів рослин різних видів (цикорію, салату, козельців, алтеї, полину, причепи) мали характерний «бородатий» фенотип, росли на живильному середовищі без регуляторів росту. Для усіх досліджуваних видів рослин визначено відмінності між лініями отриманих коренів, які виявлялися в різниці у:

- швидкості росту (було характерним для усіх видів рослин);
- товщині коренів (особливо виявлялося у трансгенних коренів козельців та алтеї);
- наявності значної опушеності (спостерігали лише у трансгенних коренів полину);
- ступені галуження (був невисокий у коренів козельців);
- наявності специфічного забарвлення коренів (ця особливість була характерна для однієї лінії трансгенних коренів причепи);
- позеленінні при вирощуванні в умовах освітлення (спостерігали у ряді ліній коренів алтеї);
- неявно вираженому негативному геотропізмі (характерно для козельців);
- спонтанній (у «бородатих» коренях цикорію, козельців, рути) або індукованій (у салату) регенерації пагонів;

- відсутності регенерації при вирощуванні на живильних середовищах з додаванням регуляторів росту для алтеї, причепи, полину.

Трансгенні корені усіх досліджуваних видів рослин та усіх ліній зберігали свій характерний фенотип, мали перенесені гени при тривалому (до п'яти років) культивування *in vitro*.

Отже, визначено ряд закономірностей впливу генетичної трансформації на фенотипові та фізіологічні ознаки трансгенних коренів рослин, які належать до різних видів (*Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Tragopogon porrifolius*, *Artemisia tilesii*, *Bidens pilosa*, *Althaea officinalis*, *Ruta graveolens*) та родин (Compositae, Rutaceae, Malvaceae). Вони виражалися у лінієспецифічних особливостях росту «бородатих» коренів (швидкість росту, ступінь галуження коренів, довжина кореневих волосків), появи неспецифічного забарвлення, регенерації пагонів, індукованій регуляторами росту або спонтанній. Такі особливості були характерні для усіх рослин незалежно від виду.

Використання різних векторних конструкцій та перенесення різних генів (цільових, селективних та генів агробактерій) для трансформування призвело до однакового впливу на рослини та процес формування «бородатих» коренів рослин різних видів. Отже, вірогідно, виявлені фенотипові та фізіологічні особливості у першу чергу залежали від наявності саме перенесених генів агробактерій та не залежали від того, які гени додатково були перенесені при трансформації до рослин.

Разом з тим, виявлено і видоспецифічність фенотипових особливостей отриманих «бородатих» коренів, що, вірогідно, пов'язано з характерними рисами рослин того чи іншого виду. Наприклад, значне потовщення трансгенних коренів рослин козельців співвідноситься з характерними рисами, які притаманні кореням рослин цього виду, а дуже швидка регенерація пагонів з трансгенних коренів цикорію пов'язана з природною особливістю цього виду формувати нові рослини з

кореневища. Визначена варіабельність за параметром швидкості росту у ліній «бородатих» коренів може становити практичний інтерес, оскільки дає можливість відбору саме ліній, які швидко накопичують біомасу, для їх подальшого використання у біотехнологіях отримання біологічно активних сполук з трансформованих коренів лікарських рослин.

5.1.2. Вживаність трансгенних та контрольних рослин при дії абіотичного стресового фактору. Протягом останніх 30 років розроблено методи трансформації ядерного та хлоропластного геномів, а коло видів трансформованих рослин дуже широке. Однак, досі докладно, комплексно та системно не вивчалися фізіологічні та біохімічні характеристики, особливості та відмінності саме трансформованих рослин (зокрема, стійкість до абіотичних стресових факторів, вміст фотосинтетичних пігментів як показник стресового стану рослин, вміст сполук, які синтезуються при дії стресових факторів тощо) у порівнянні з вихідними. Разом з тим, перенесення чужорідного гену до геному рослин, сам процес трансформування, якій включає контакт з фітопатогенними мікроорганізмами у разі використання агробактерій, може розглядатися як стресовий фактор та призводити до фізіологічних змін у отриманих біотехнологічних рослин. Такі зміни можуть виражатися у появі специфічних особливостей метаболізму рослин, варіабельності адаптивних здатностей, зокрема, у адаптації до дії стресових чинників. Наявність змін може дозволити відібрати лінії, які характеризуються цінними ознаками, наприклад, зразки, більш стійкі до дії стресових факторів або такі, що продукують більше цінних сполук.

У роботі ми досліджували, яким чином трансформування впливає на реакцію рослин на дію абіотичного стресу на прикладі стресу, модельованого сполукою токсичного Cr(VI), зміненням температурним режимом, а також на вміст фотосинтетичних пігментів як маркера стресового стану організму.



Рослини ряски – водні рослини, які відрізняються швидким ростом та є чутливими до забруднення води: наявність токсичних сполук призводить до пожовтіння, появи темних плям на листецях. Рослини використовують як візуальний індикатор якості води [734-736]. Тому ці рослини ми використовували як модельні для порівняльного дослідження впливу абіотичного стресу, індукованого токсичною сполукою шестивалентного хрому, на контрольні та трансгенні рослини ряски. На першому етапі визначено характерні особливості росту нетрансформованих рослин в стресових умовах, модельованих наявністю у живильному середовищі токсичного металу, далі проведено порівняння виживаності трансгенних та нетрансформованих рослин, а також їх здатність накопичувати та відновлювати Cr(VI) до нетоксичного Cr(III).

Потягом усього часу спостережень за ростом нетрансформованих рослин найбільшим закономірно був приріст кількості листеців у контрольних варіантах без хромату. При культивуванні протягом нетривалого проміжку часу (3 доби) приріст листеців у варіантах з різними концентраціями сполуки суттєво не відрізнявся. Зі збільшенням часу культивування у стресових умовах виявлялися відмінності у рості рослин при різних концентраціях токсичної сполуки. Так, через 6 діб ріст нетрансформованих рослин на середовищах, що містили до 1 мМ Cr(VI), достовірно не відрізнявся від росту контрольних рослин – приріст становив відповідно 62 та 58 листеців. Більші концентрації пригнічували ріст рослин, що відбивалося на прирості кількості листеців, який становив 29, 18, 19, 10 шт. відповідно на середовищах з 1, 2, 4 та 8 мМ Cr(VI) (рис. 5.13).

При дослідженні росту трансгенних рослин у присутності сполуки Cr(VI) отримано такі результати. Через три та шість діб ріст трансгенних рослин в присутності 1 мМ хрому(VI) ( $\Delta N_3 = 20,0 \pm 9,8$ ;  $\Delta N_6 = 33,7 \pm 10,5$ ) достовірно не відрізнявся від росту цих рослин на середовищі без хромату, для яких приріст зелених листеців становив  $27,3 \pm 8,0$  та  $44,3 \pm 11,6$  відповідно за 3

та 6 діб. При вищих концентраціях Cr(VI) (2, 4, 8 мМ) приріст кількості листеців трансформованих рослин становив  $9,7 \pm 6,2$ ,  $8 \pm 2,3$ ,  $6,3 \pm 1,7$  шт. через 3 доби та  $11,0 \pm 6,0$ ,  $10,0 \pm 6,0$ ,  $11,0 \pm 4,1$  шт. через 6 діб, нетрансформованих – відповідно  $10,0 \pm 4,9$ ,  $9,7 \pm 11,2$ ,  $7,3 \pm 3,5$  шт. через 3 доби та  $28,7 \pm 5,4$ ,  $19,0 \pm 15,7$  та  $10,0 \pm 2,3$  шт. через 6 діб (рис. 5.14), фактично значущих відмінностей не спостерігали. Через 12 діб кількість зелених листеців трансгенних рослин у контролі перевищувала кількість листеців у дослідних варіантах (з хроматом) відповідно у 1,5, 2,5, 3,2 та 4,3 рази при 1, 2, 4 та 8 мМ Cr(VI), а через 21 добу – у 2, 4,2, 10,3 та 21,6 разів. При високих концентраціях хрому(VI) – 4 та 8 мМ – спостерігали поступову загибель трансгенних рослин: зменшення кількості зелених листеців, пожовтіння та відсутність приросту кількості листеців. Через 21 добу кількість зелених листеців становила 100, 100, 62,2 та 31,3% від загальної відповідно при 1, 2, 4 та 8 мМ хрому(VI).

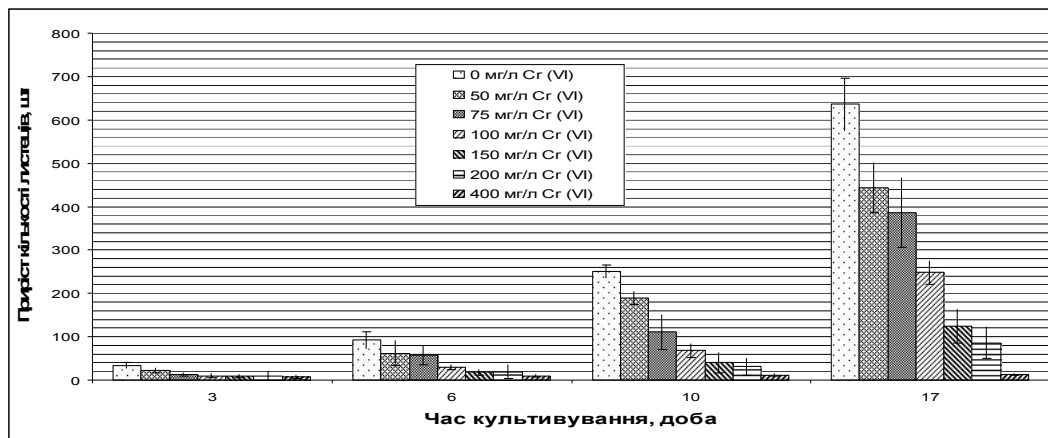


Рис. 5.13 – Приріст кількості листеців протягом 3–17 діб культивування нетрансформованих рослин ряски в присутності 0; 1; 1,5; 2; 3; 4 та 8 мМ Cr(VI)

Високі концентрації (4 та 8 мМ) виявилися порівняно менш токсичними для рослин дикого типу, ніж для трансгенних. Так, за період культивування на середовищі з вмістом 4 та 8 мМ хрому(VI) загибель рослин дикого типу (кількість жовтих листеців) становила відповідно 15,8% та 22,4%. У той же час, кількість жовтих листеців у трансформованих рослин дорівнювала 39,3% і 68,7% при тих самих вихідних концентраціях хрому(VI). При менших

концентраціях жовті листеці були відсутні для обох типів рослин. Слід зазначити, що за однакових умов приріст кількості листеців трансгенних рослин ряски ніколи не перевищував такий для рослин дикого типу.

Зі збільшенням часу культивування у трансгенних рослин ряски при концентраціях 4 та 8 мМ, а у ряски дикого типу тільки при 8 мМ хрому(VI) спостерігався від'ємний приріст за рахунок загибелі рослин (рис. 5.14). На середовищі з вихідною концентрацією 4 мМ хрому(VI) спостерігалися загибель частини листеців при збільшенні їх загальної кількості (особливо для ряски дикого типу). При концентрації 8 мМ хрому(VI) спостерігалось майже повне припинення росту листеців та їх швидке пожовтіння.

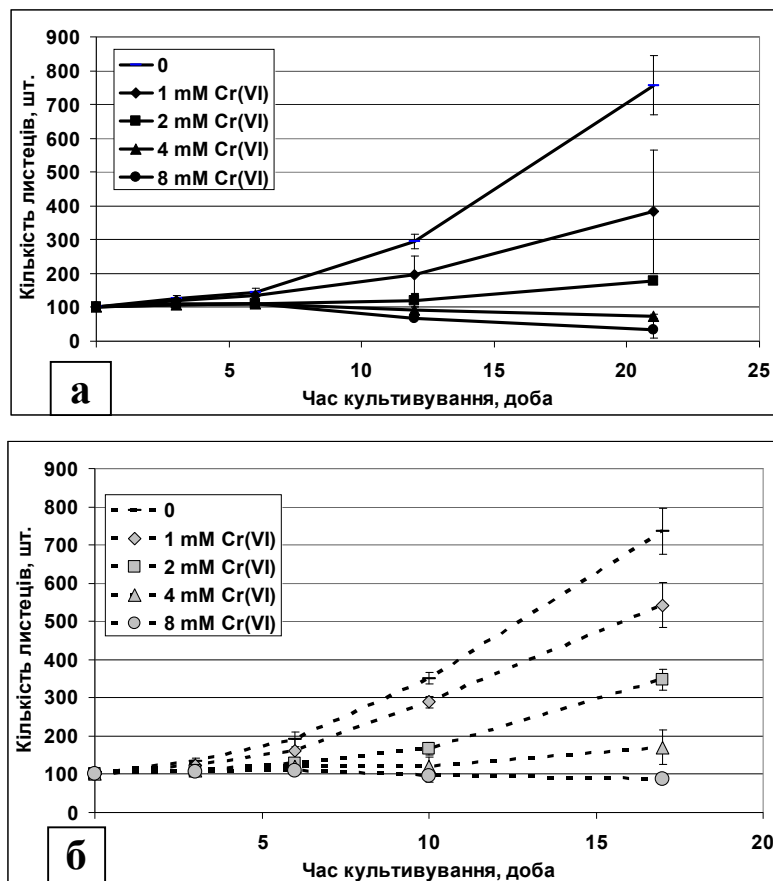


Рис. 5.14 – Зміна кількості зелених листеців під час росту трансгенних (а) та нетрансформованих (б) рослин ряски у середовищі з хромом(VI) у концентраційному діапазоні 1 ... 8 мМ

Відносна швидкість приросту кількості листеців (рис. 5.15) залежала від концентрації хрому(VI) та часу культивування. Особливістю трансформованих

рослин було зменшення відносної швидкості росту листеців на шосту добу порівняно з попередніми вимірами на третю добу з подальшим збільшенням на дванадцятую добу, причому такий характер росту спостерігався не тільки в присутності 1 та 2 мМ Cr(VI), але і у середовищі без хрому (рис.3). Збільшення відносної швидкості росту після шостої доби відмічено тільки при культивуванні в присутності до 4 мМ хрому(VI) для нетрансформованих та до 2 мМ для трансгенних рослин. Додавання 8 мМ хрому(VI) призводило до істотного зниження відносної швидкості росту для рослин обох типів.

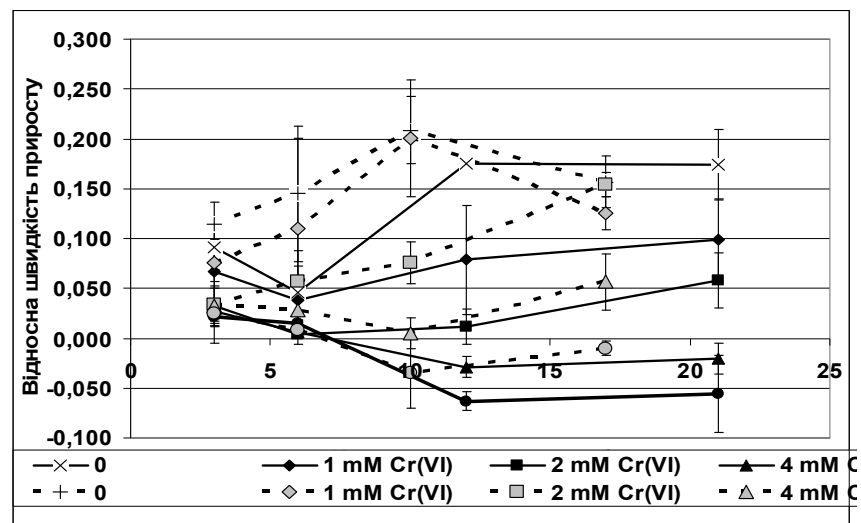


Рис. 5.15 – Відносна швидкість приросту кількості листеців у трансгенних (суцільна лінія) та нетрансформованих (пунктирна лінія) рослин ряски

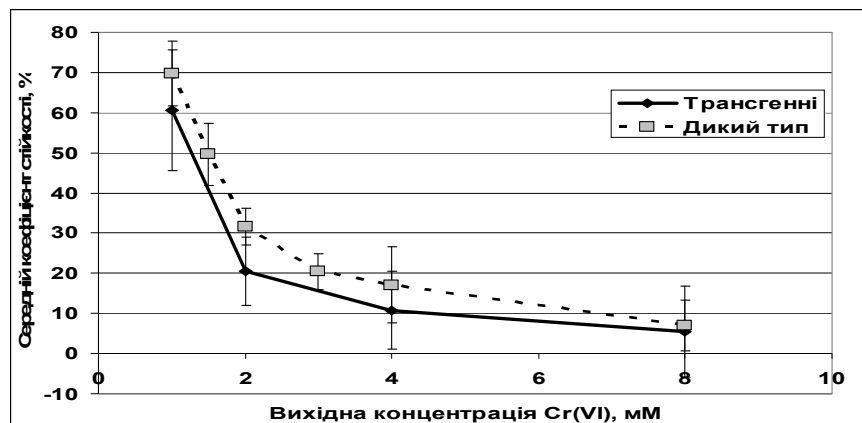


Рис. 5.16 – Середній коефіцієнт стійкості трансгенних (суцільна лінія) та нетрансформованих (пунктир) рослин ряски при культивуванні в присутності хрому(VI).

Середній коефіцієнт стійкості рослин наочно характеризує кількісні параметри впливу хрому(VI) на ріст рослин в залежності від концентрації.

Як видно з рис. 5.16, тенденція залежності росту трансгенних рослин та рослин дикого типу від концентрації Cr(VI) була однаковою.

При рості ряски концентрація хрому(VI) у живильному середовищі зменшувалася, вірогідно, за рахунок відновлення високотоксичного розчинного хрому(VI) до нерозчинного і малотоксичного  $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  рослинними екзометаболітами. Підтвердженням цього є кольорові зміни у середовищі, які проявляються у зникненні характерного для хромат-аніону яскраво-жовтого забарвлення (рис. 5.17) та появи осаду сіро-блакитного кольору, притаманного нерозчинному гідроксиду хрому(III)  $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Крім того, одночасно з вказаними змінами спостерігалось зменшення вмісту хромат-аніону за специфічною реакцією кількісного аналітичного визначення з дифенілкарбозидом.

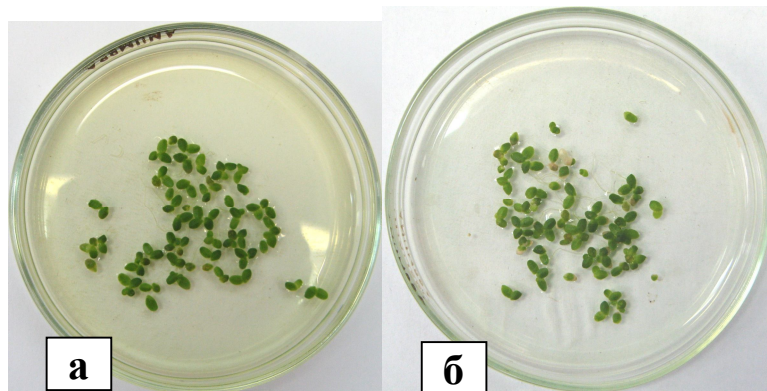


Рис. 5.17 – Зникнення жовтого забарвлення середовища, зумовленого наявністю розчинного хрому(VI), 3 (а) та 6 (б) діб, 4 мМ

Швидкість детоксикації середовища трансгенними рослинами, що виявляється у зменшенні концентрації хрому(VI), на початковому етапі культивування була вищою, ніж рослинами дикого типу (рис. 5.18). Так, через 3 доби концентрації хрому(VI) зменшувалися відповідно з 8 мМ до  $2,7 \pm 0,3$  та  $6,2 \pm 0,5$  мМ, з 4 мМ до  $1,5 \pm 0,2$  та  $2,8 \pm 0,2$  мМ, з 2 мМ до  $0,85 \pm 0,08$  та  $0,95 \pm 0,08$  мМ (трансгенні та нетрансформовані рослини). Для трансгенних рослин такого часу (3 доби) було достатньо для зменшення концентрації хрому(VI) з 1 мМ до аналітичного нуля (за дифенілкарбозидом). У той же час, при культивуванні рослин дикого типу за таких самих умов вміст хрому(VI) становив  $0,36 \pm 0,21$  мМ. Однак,

трансгенні рослини за 12 діб не змогли повністю відновити 4 мМ хрому(VI) (залишкова концентрація становила  $0,35 \pm 0,01$  мМ), тоді як рослини дикого типу за 10 діб зменшили концентрацію Cr(VI) 4 мМ у середовищі до нуля. Вихідна концентрація 8 мМ хрому(VI) виявилася токсичною як для трансгенних, так і нетрансформованих рослин. За цих умов припинявся ріст, спостерігалась загибель рослин, а концентрація хрому(VI) у середовищі зменшувалася лише до 0,4 та 0,7 мМ відповідно.

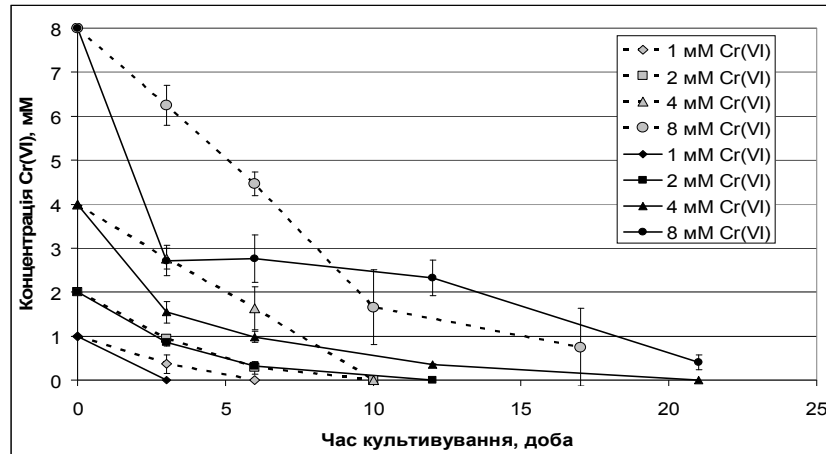


Рис. 5.18 – Зменшення концентрації Cr(VI) у живильному середовищі при рості трансгенних (суцільна) та нетрансформованих (пунктирна лінія) рослин ряски

Відомо, що рослини різних родин, у тому числі *Letnaseae*, здатні до поглинання токсичних металів (транспорту всередину клітин) [737]. Відновлення хрому(VI) до хрому(III) відбувається не тільки у середовищі, але й всередині клітин живих організмів [738]. Неспецифічний транспорт до клітин хромат-аніону  $\text{CrO}_4^{2-}$  здійснюється завдяки близькості його іонного радіусу та радіусів аніонів  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{PO}_4^{3-}$  [739]. Саме тому акцепторні та транспортні системи клітин «помиляються», та поглинають хромати разом з сульфатами та фосфатами. Після поглинання, всередині клітин відбувається подальше відновлення хромат-аніону до нерозчинного гідроксиду  $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ .

Аналіз водних екстрактів з досліджуваних рослин показав відсутність хрому(VI) в тканинах трансгенних і нетрансформованих рослин, які культивували у середовищі з 1 мМ хрому(VI) (рис. 5.19).

Очевидно, за такої відносно невеликої концентрації здійснювався транспорт хрому(VI) до клітин та його подальше повне відновлення усередині клітин. Накопичення Cr(VI) в рослинах відбувалося лише за його вихідної концентрації у середовищі 2 та 4 мМ. Вміст Cr(VI) становив  $0,221 \pm 0,52$  і  $0,236 \pm 0,125$  мг/г маси трансгенних рослин та  $0,077 \pm 0,014$  і  $0,313 \pm 0,138$  мг/г маси рослин дикого типу (відповідна вихідна концентрація Cr(VI) у середовищі 2 та 4 мМ). Відсутність Cr(VI) в рослинах при вихідній концентрації у середовищі 8 мМ та зменшення його концентрації у середовищі свідчить про те, що детоксикація хрому у середовищі, можливо, здійснюється не тільки за рахунок його накопичення та відновлення у листецях (адже відбувається пожовтіння та загибель листеців), але й шляхом відновлення Cr(VI) екзометаболітами рослин.

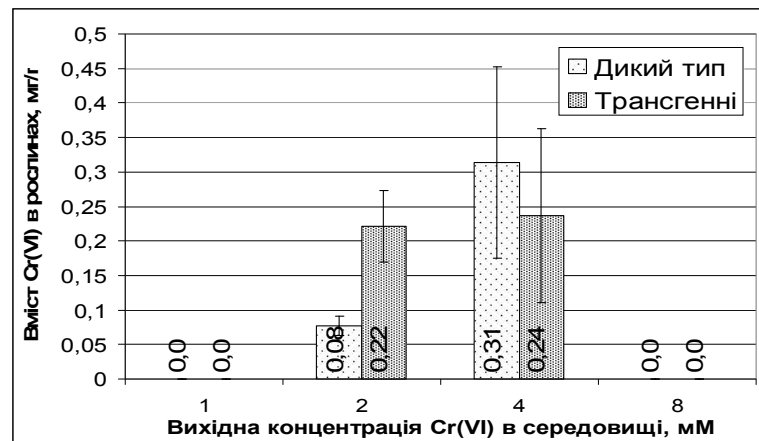


Рис. 5.19 – Вміст Cr(VI) у трансгенних та нетрансформованих рослинах ряски при їх культивуванні в присутності 1, 2, 4, 8 мМ Cr(VI).

Слід відзначити, що трансформація не призвела до значних змін у чутливості рослин до токсичної сполуки, хоча шестивалентний хром у концентрації від 1 до 8 мМ пригнічував ріст трансгенних рослин ряски у більшому ступені, ніж ріст контрольних рослин [740, 741]. Зокрема, кількість жовтих листеців трансгенних та рослини дикого типу становила 15,8% та 22,4% проти 39,3% та 68,7 відповідно при 4 та 8 мМ Cr(VI). Разом з тим, стійкість трансгенних та контрольних рослин до дії хрому(VI) закономірно зменшувалася з підвищенням його концентрації. Хоча

показники середнього кофіцієнту стійкості рослин дикого типу був вищим, ніж трансгенних, достовірних відмінностей у цих показниках не виявлено. Згідно з отриманими результатами, при культивуванні як контрольних, так і трансформованих рослин ряски в умовах стресу, викликаного наявністю шестивалентного хрому, вірогідно, відбувається декілька процесів (рис. 5.20): виділення у середовище екзометаболітів, які відновлюють частину Cr(VI) до Cr(III), про що свідчить поява зеленуватого осаду; транспортування Cr(VI) до рослинних клітин та накопичення Cr(VI) в рослинах (зафіксовано наявність Cr(VI) у суспендованих клітинах); відновлення Cr(VI) до Cr(III) безпосередньо у рослинах.

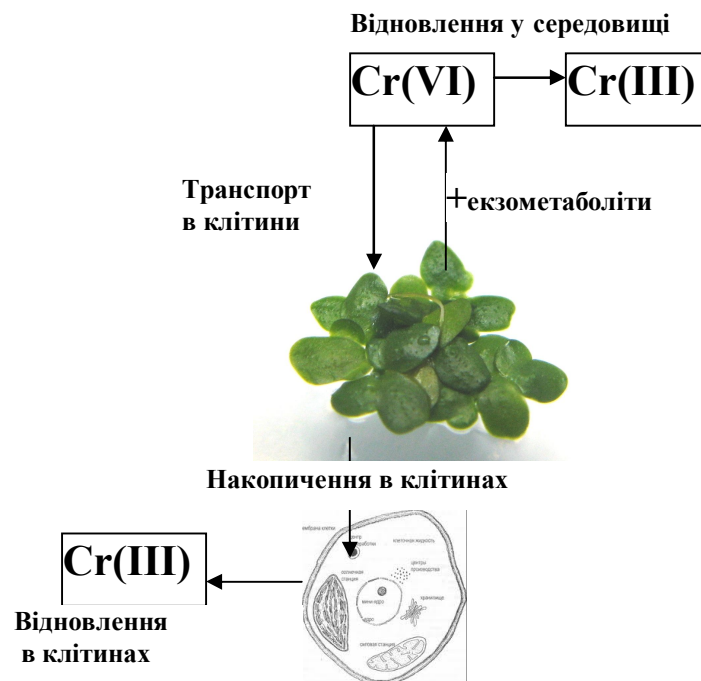


Рис. 5.20 – Вірогідні процеси, що відбуваються при культивуванні рослин ряски у середовищі з Cr(VI)

5.1.3. Порівняння виживаності контрольних та трансгенних рослин ряски при різних температурних умовах. Тенденції росту трансгенних рослин ряски при різних температурних умовах практично не відрізнялися від таких для контрольних рослин. Так, культивування при температурі +3°C призводило до зменшення приросту маси як трансгенних, так і контрольних рослин. Збільшення терміну



виращування при пониженій температурі з двох до п'ятнадцяти діб пригнічувало ріст контрольних та трансгенних рослин, що виявлялося у подальшому зменшенні приросту маси. Аналогічним чином впливало і короткострокове культивування рослин при підвищеній температурі (рис. 5.21).

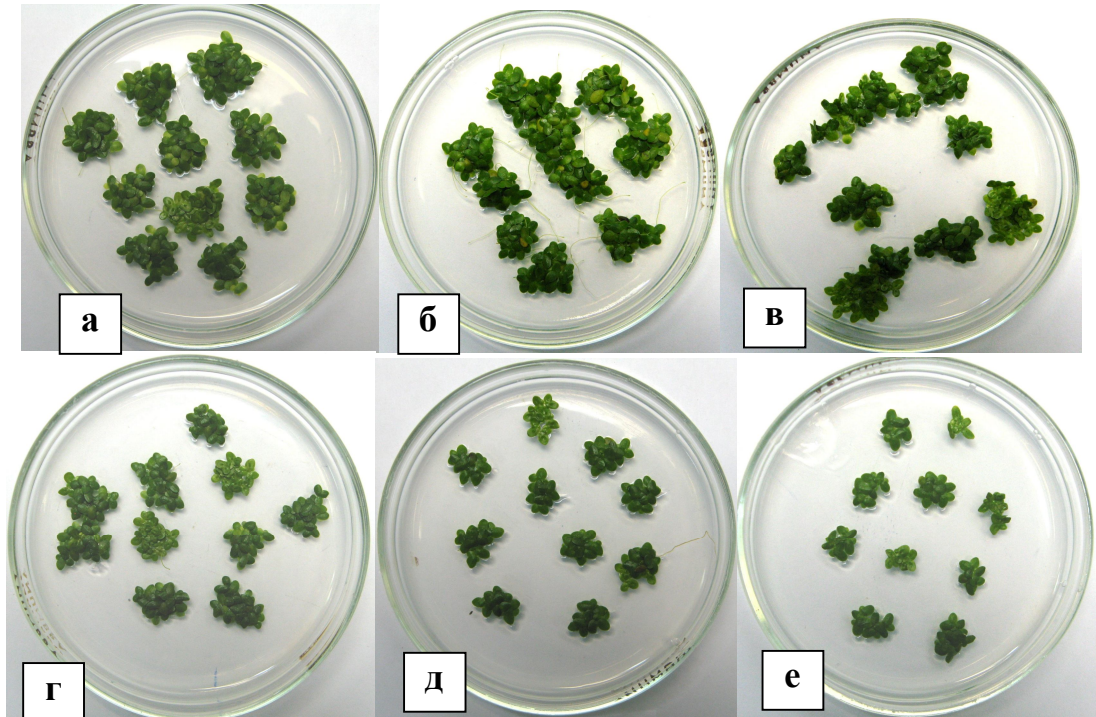


Рис. 5.21 – Ріст трансгенних (а, в, д) та контрольних (б, г, е) рослин ряски при різних температурних умовах: при +24°C (а, б); чотири доби при +36°C, далі при +24°C, тепловий стрес (в, г); 25 діб при +3°C, далі при +24°C, холодний стрес (д, е)

Слід зазначити, що зміна температурних умов у досліджуваних варіантах культивування рослин не призвела до достовірних відмінностей у вмісті загального розчинного білка як у контрольних, так і у трансгенних рослинах (рис. 5.22). Разом з тим, короткостроковий холодний стрес, а також короткострокове підвищення температури спричинило достовірне збільшення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів (рис. 5.23). При цьому достовірні відмінності у реакції контрольних та трансгенних рослин за швидкістю формування нових листеців не спостерігали.

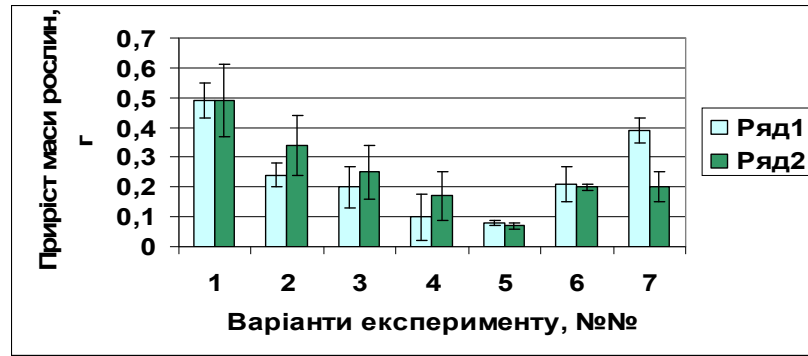


Рис. 5.22 – Залежність приросту маси трансгенних (ряд 1) та контрольних (ряд 2) рослин ряски від температурних умов: **1** – +24° С; **2** – 2 доби +3° С, потім +24° С; **3** – 15 діб +3° С, потім +24° С; **4** – 20 діб +3° С, потім +24° С; **5** – 25 діб +3° С, потім +24° С; **6** – 2 доби +36° С, потім +24° С; **7** – 4 доби +36° С, потім +24° С

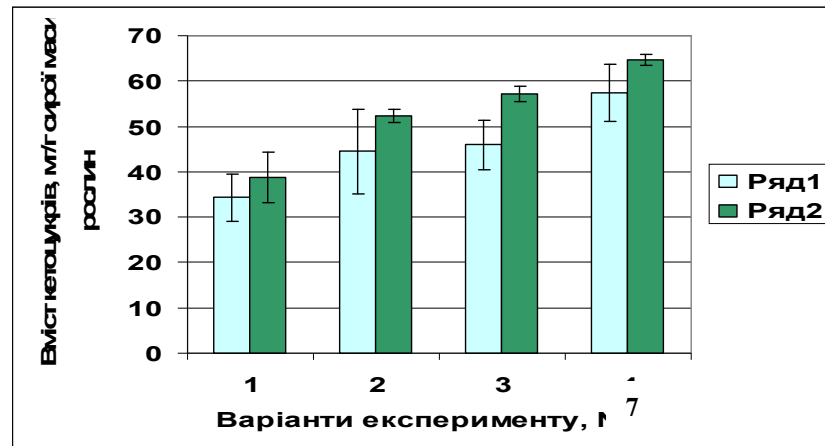


Рис. 5.23 – Вміст кетоцукрів в трансгенних (ряд 1) та контрольних (ряд 2) рослинах ряски при вирощуванні за різних температурних умов: **1** – +24° С; **2** – 2 доби +3° С, потім +24° С; **3** – 15 діб +3° С, потім +24° С; **7** – 4 доби +36° С, потім +24° С

Досить давно відомо, що вміст цукрів, у тому числі фруктанів, у рослинах корелює з їх стійкістю до холодowego стресу та нестачі вологи [742]. Ці сполуки беруть участь у адаптації рослин до дії абіотичних стресових факторів, зокрема, шляхом стабілізації мембран, зменшуючи таким чином зневоднення клітин [743-745]. Ранні експерименти з генетичної трансформації виявили, що перенесення до рослин генів, які відповідають за синтез фруктанів, призводить до підвищення стійкості до

абіотичних стресів [429]. Останнім часом здійснено численні біотехнологічні дослідження, спрямовані на збільшення вмісту фруктанів або синтез невластивих фруктозовмісних цукрів у рослинах шляхом генетичної трансформації [746-751], а також на вивчення ролі цих сполук у адаптації рослин до стресів [430].

Таким чином, визначено та порівняно закономірності реакції трансгенних та контрольних рослин ряски на зміну температурних умов вирощування [752]. Показано, що тенденції щодо зміни швидкості росту рослин (за приростом маси), накопичення фруктозовмісних цукрів та білка у трансгенних та контрольних рослин ряски при змінах температурних умов вирощування не відрізняються. Так, збільшення часу вирощування при зниженій температурі для обох рослин призводило до зменшення приросту маси, підвищення температури також пригнічувало ріст як контрольних, так і трансгенних рослин. Трансформовані та нетрансформовані рослини однаково реагували на зниження та підвищення температури, у них спостерігали збільшення рівня накопичення фруктанів у порівнянні з таким рівнем у рослин за стандартних умов вирощування (+24°C).

Отримані нами дані щодо збільшення вмісту фруктанів у рослинах при дії знижених та підвищених температур узгоджуються з літературними даними щодо активації ферментів синтезу та підвищення рівня накопичення фруктанів у рослинах при дії абіотичних стресових факторів [405, 753-755]. Відсутність відмінностей у реакції трансгенних та контрольних рослин на дію стресового температурного фактору свідчить про те, що перенесення використаних для трансформації генів не вплинуло на особливості метаболізму рослин, пов'язаних з синтезом сполук, які беруть участь у реагуванні досліджуваних рослин на дію температури як стресового фактору.

5.1.4 Вміст фотосинтетичних пігментів. Вміст фотосинтетичних пігментів може розглядатися як характеристика стану рослин після дії генетичної трансформації як біотичного стресу. Ми дослідили, чи відбуваються індуковані шляхом перенесення генів зміни кількості хлорофілів та каротиноїдів у трансформованих рослинах та порівняли вміст фотосинтетичних пігментів при культивуванні трансгенних рослин.

Через 30 діб вміст хлорофілу *a* при вирощуванні на середовищі МС у трансформованих рослинах виявився вищим у 1,7-2,16 рази ніж у контрольних рослинах, що вирощувалися в тих же умовах (рис. 5.24, а). Подібна картина спостерігалася і для хлорофілу *b* – вміст його у трансгенних рослинах був вищий у 2,38-3,76 рази у порівнянні з контрольними (рис. 5.24, б).

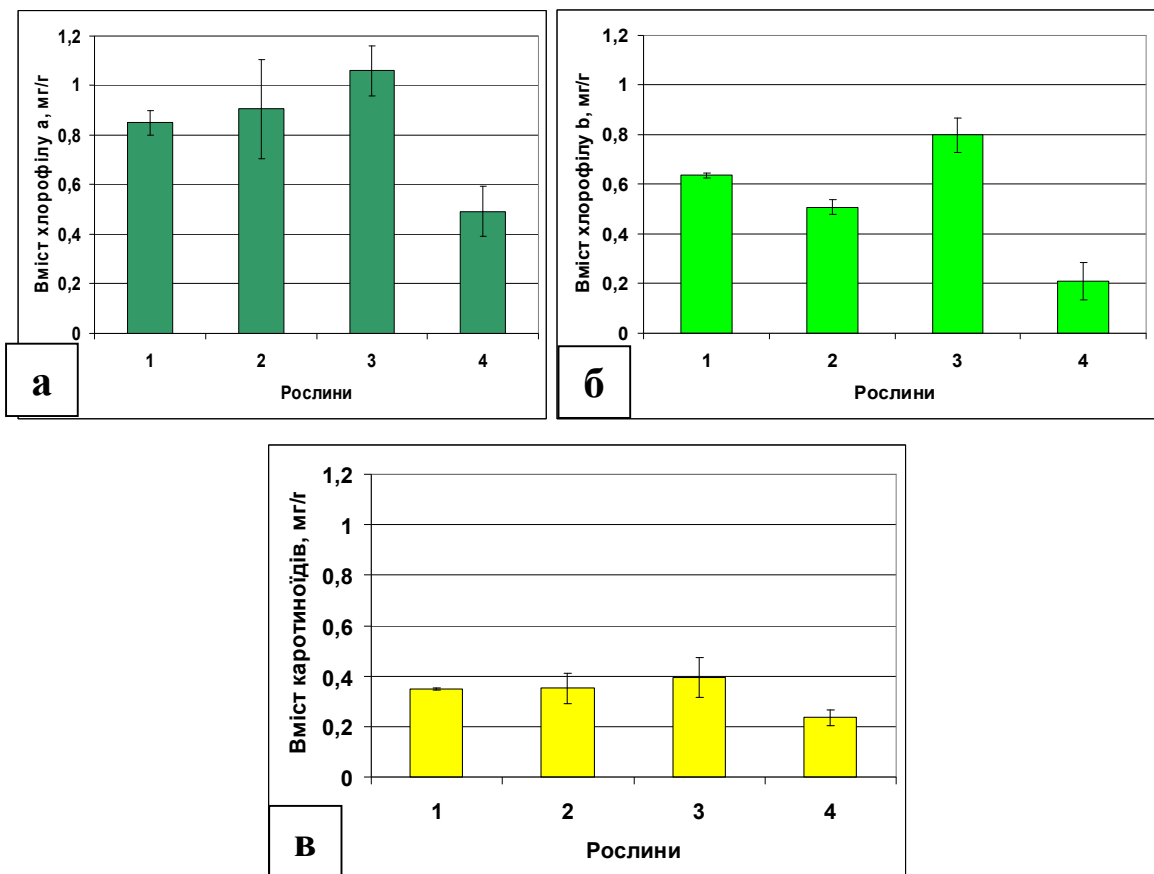


Рис. 5.24 – Вміст хлорофілів *a* (а), *b* (б) і каротиноїдів (в) у трансгенних (1-3) та контрольних (4) рослинах

Різниця у вмісті каротиноїдів між трансгенними та контрольними рослинами виявилася меншою, ніж різниця у вмісті хлорофілів. Так, у трансгенних рослин концентрація каротиноїдів була вищою лише у 1,5 -1,7 рази. Каротиноїди слугують захистом фотосинтетичного апарату від стресових факторів та поліпшують адаптаційні характеристики рослин. Отже, збільшення кількості каротиноїдів у трансформованих рослинах може свідчити про їх можливі більшу адаптаційну здатність у порівнянні з вихідними.

Співвідношення  $a/b$  та  $(a+b)$ /каротиноїди зазвичай в нормі є стабільним, але реагує на вплив екстремальних факторів: співвідношення  $a/b$  зменшується при несприятливих умовах, а відношення вмісту хлорофілів до каротиноїдів збільшується. Відношення  $a/b$  у нормально розвинених рослин зазвичай може становити 2,5–3 [653]. В наших експериментах співвідношення хлорофілів  $a/b$  через 30 діб росту на середовищі MS коливалося у трансформованих рослин від  $1,35 \pm 0,1$  до  $1,78 \pm 0,3$ , в той час як у контрольних дорівнювало  $2,35 \pm 0,1$  (рис 5.25, а). Відношення вмісту хлорофілів до вмісту каротиноїдів у трансформованих рослин становило  $4-4,4 \pm 0,5$ , а у контрольних було нижчим –  $3 \pm 0,2$  (рис. 5.25, б).

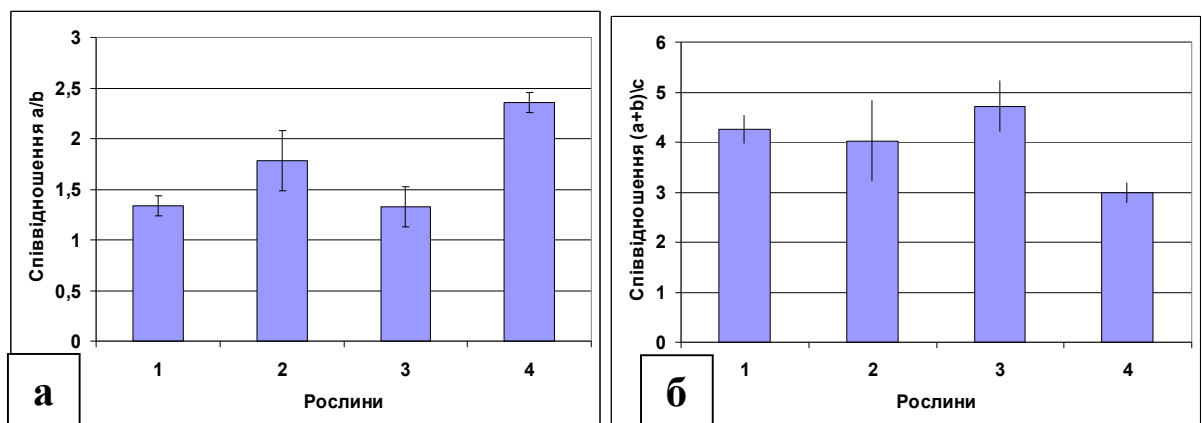


Рис. 5.25 – Відношення вмісту хлорофілів  $a/b$  (а) та суми хлорофілів до каротиноїдів (б) у трансгенних (1-3) та контрольних рослин (4)

Пігменти вищих рослин, хлорофіли та каротиноїди є сполуками, вміст яких лабільний та відбиває вплив факторів середовища, у тому числі

і негативних стресів, на рослини. Вони забезпечують протікання в клітинах світлових реакцій фотосинтезу. За участі пігментів енергія кванту світла трансформується в макроергічні сполуки, які далі використовуються для синтезу в рослині органічних сполук. Вміст фотосинтетичних пігментів, динаміка їх зміни протягом вегетативного періоду є одним з показників фізіологічного стану рослин, характеристикою фотосинтетичної здатності та продуктивного процесу сільськогосподарських культур. Основними фотосинтезуючими пігментами вищих рослин є хлорофіли *a* та *b*, що являють собою Mg-вмісні порфірини. Основна їх частина включена до складу світлозбираючих комплексів, забезпечує поглинання та передачу світлової енергії до реакційних центрів, в яких відбуваються фотосинтетичні реакції. Жовті пігменти – каротиноїди – відіграють роль світлозбирання та виконують функцію захисту фотосинтетичного апарату від фотопошкодження. Найбільша ефективність фотосинтетичного апарату забезпечується за таким співвідношенням пігментів: хлорофілів *a* - близько 50%, *b* – 30%, каротиноїдів – 20 %, оскільки основну функцію у складі світлозбирального комплексу виконує хлорофіл *a*, а хлорофіл *b* та каротиноїди є додатковими та захисними пігментами. Вміст хлорофілів у різних рослин зазвичай коливається в межах 0,7-1,1 г на 1 кг зеленої маси рослин, а співвідношення хлорофілів *a* та *b* зазвичай становить близько 3:1. Вміст хлорофілів та їх співвідношення залежать від ряду факторів – рівня освітленості, температури, наявності добрив, дії токсичних сполук (наприклад, токсичних металів), зараженості патогенами тощо та є одним з показників фізіологічного стану і адаптивних можливостей рослин [756]. Давно відомо, що кількість хлорофілу залежить від освітленості рослин: при темновій обробці рослин вміст хлорофілу зменшується, зелене та синє світло збільшує вміст хлорофілу [757-759].

Відомо, що абіотичні стресові фактори, до яких можна віднести дефіцит вологи, підвищений вміст солей у ґрунтах, наявність антропогенного забруднення токсичними металами, впливають на

кількісний вміст пігментів рослин, як хлорофілів, так і каротиноїдів. Так, експериментально було підтверджено, що наявність токсичних металів, зокрема, таких як кадмій, мідь, нікель, кобальт, цинк, призводить до зменшення вмісту хлорофілів. При нестачі води у ґрунті при посуші спостерігається зменшенням вмісту хлорофілів  $a$  та  $b$ . Доведено також, що збільшення кількості хлорофілів призводить до збільшення здатності рослин утримувати вологу. Вміст хлорофілу також залежить від якісного складу ґрунту, концентрації в ньому деяких хімічних сполук та елементів (наприклад, вмісту магнію) [760-762].

Стресові фактори впливають не тільки на загальний вміст пігментів фотосинтетичного комплексу, але й на їх співвідношення. Співвідношення хлорофілів  $a/b$  та суми хлорофілів  $(a+b)$  до каротиноїдів характеризує здатність рослин пристосовуватися до різних умов (наприклад, до зміни інтенсивності освітлення, зволоження, дії токсичних сполук). Так, при дії нікелю в рослинах кукурудзи співвідношення  $a/b$  зростало на початку обробки металом (до 8 діб) та зменшувалося при тривалій обробці (більше 13 діб) [761]. Дефіцит вологи призводив до зміни вмісту хлорофілу у рослинах [763].

У досліджуваних нами трансгенних рослин цикорію було зменшено співвідношення хлорофілів  $a/b$  [764]. Зменшення співвідношення хлорофілів  $a/b$  та збільшення відношення вмісту хлорофілів до каротиноїдів у трансгенних рослин подібне до реакції рослин на дію абіотичних стресових факторів. В той же час, не можна однозначно стверджувати, що в даному випадку має місце класична реакція рослин на стрес, адже загальний вміст пігментів (хлорофілів та каротиноїдів) у трансгенних рослин виявився вищим, ніж у контрольних, в той час як при дії стресів зазвичай зменшується і загальний вміст пігментів.

Отже, вивчення особливостей вмісту фотосинтетичних пігментів, хлорофілів та каротиноїдів, у трансгенних рослинах цикорію показало достовірні відмінності у кількості хлорофілів  $a$ ,  $b$  та каротиноїдів при

культивуванні на середовищі 1/2MS, причому вміст хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів у трансгенних рослинах був більший відповідно у 1,7–2,16, 2,38–3,76 та 1,5–1,7 рази у порівнянні з контрольними. Співвідношення хлорофілів *a/b* у трансформованих рослин було меншим, ніж у контрольних, а відношення вмісту хлорофілів до вмісту каротиноїдів збільшувалося. Це відбувалося за рахунок збільшення відсотку хлорофілу *b* у трансформантів та зменшення відсотку каротиноїдів. Зміни у вмісті фотосинтетичних пігментів, у тому числі, у співвідношенні хлорофілів *a/b* та суми хлорофілів до каротиноїдів у порівнянні з контролем, збільшення відсотку хлорофілу *b* (з 22% в контролі до 35 % у трансгенних рослин), можливо, є реакцією фотосинтетичного апарату трансгенних рослин до стресового фактору – перенесення чужорідних генів.



**РОЗДІЛ 6**  
**СИНТЕЗ ПРИРОДНИХ ТА РЕКОМБІНАНТНИХ БІОЛОГІЧНО**  
**АКТИВНИХ СПОЛУК У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ І**  
**„БОРОДАТИХ” КОРЕНЯХ**

Метод генетичної трансформації як спосіб перенесення чужорідних генів до геному рослин дозволяє створювати рослини з новими цінними властивостями, у тому числі ті, що синтезують біологічно активні сполуки. Серед них слід виокремити сполуки, синтез яких кодується перенесеними генами та які не є властивими для певного виду рослин [335-338], а також сполуки, які накопичуються у нетрансформованих рослинах у природних умовах [202-206]. Генетична трансформація може призводити до підвищення рівня накопичення останніх. Цей феномен визначено для багатьох видів рослин та для сполук різного хімічної природи. Дослідження трансгенних рослин та «бородатих» коренів дозволяє отримати дані щодо функціонування перенесених генів, їх впливу на метаболізм рослин і синтез біологічно активних сполук, а також мати практичний результат – трансгенні рослини-продуценти БАС, які можуть застосовуватися у медицині та ветеринарії.

Ми використовували створені трансгенні рослини та корені як модель для дослідження впливу генетичної трансформації на синтез природно синтезованих у рослинах досліджуваних видів БАС: фруктозовмісних поліцукрів, які мають лікувальні властивості та є гепатопротекторами, пребіотиками, нормалізують обмін кальцію та ліпідів тощо, на синтез антиоксидантних сполук, вторинних метаболітів на прикладі артемізину (сполуки з антималярійними властивостями). Визначали також особливості накопичення рекомбінантних сполук, зокрема, інтерферону [765-769] та вміст злитого білка AG85B-ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis*. Наявність колекції трансформованих рослин та

коренів дозволила провести порівняння на ряді видів рослин, таких як *A.tilesii*, *A.officinalis*, *L.sativa*, *B.pilosa* та *C.intybus*.

## 6.1 Накопичення рекомбінантних сполук

6.1.1. Накопичення рекомбінантного злитого білка-аналога секреторних білків AG85B та ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis* у трансгенних рослинах ряски. Аналіз присутності білкових продуктів експресії гена, що кодує злитий білок-аналог секреторних антигенів ESAT6 та AG85B *M.tuberculosis*, в рослинному матеріалі проводили методом Western blotting. Було виявлено присутність рекомбінантного протеїну у трансгенних рослинах ряски (рис. 6.1). У екстракті з біомаси контрольних рослин ряски цей білок був відсутній. Орієнтовну кількість досліджуваного білка визначали, використовуючи у якості контролю експресований у *E. coli* та хроматографічно очищений рекомбінантний білок ESAT6::AG85B(dTMD)::6His, нанесений у кількостях 0,04, 0,2 нг та 1 нг на трек. Контрольний білок був нанесений як у чистому вигляді, так і у вигляді препарату, приготовленого як грубий білковий екстракт з *L.minor* дикого типу, із додаванням контрольного рекомбінантного білка у тих самих кінцевих концентраціях у розчин для екстракції безпосередньо перед подрібненням рослинної біомаси. Останнє було зроблено з метою визначити можливі втрати рекомбінантного білка під час пробопідготовки. Співставлення треків №9 та №8 (рис. 6.1), а також треків №7 та №6 демонструє майже ідентичний вміст білка інтересу у треках з очищеним препаратом контрольного білка та у треках з рослинним екстрактом із додаванням контрольного білка у таких самих концентраціях. Отже, процедура пробопідготовки практично не впливала на вміст рекомбінантного білка ESAT6::AG85B(dTMD)::6His у розчині. Співставлення треків №2, №6 та №8 дозволяє визначити орієнтовну

кількість продукту у екстракті та у рослинному матеріалі – 20-25 нг/мл, 0,4-0,5 мкг на 1 г сирої маси відповідно.

Порівняльне дослідження було проведено з використанням ліофілизованого рослинного матеріалу, що зберігався після ліофілізації у закритих пластикових пробірках при кімнатній температурі протягом 1,5 років. Результати детекції рекомбінантного протеїна ESAT6::AG85B(dTMD)::6His у ліофілізованій біомасі *L. minor* представлено на рис. 6.2. Отримані дані свідчать про те, що досліджуваний білок зберігається протягом тривалого часу у біомасі ліофілізованих рослин навіть без використання додаткових заходів для його збереження – при кімнатній температурі та без захисного газового середовища. Разом з тим, ідентифікований вміст білка виявився меншим, ніж у свіжому матеріалі.

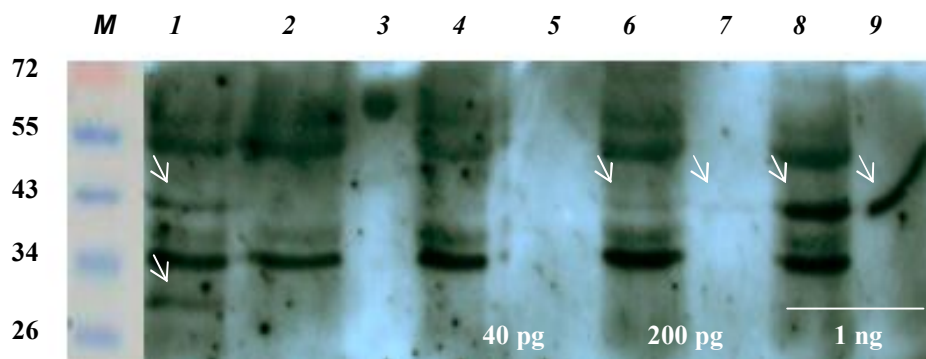


Рис. 6.1 – Аналіз методом Western blotting наявності рекомбінантного білка у екстракті з сирої біомаси рослин *L. minor*, трансформованих вектором pCB158 з послідовністю генів *esxA::fbpB<sup>ΔTMD</sup>*, які кодують злитий білок-аналог секреторних антигенів ESAT6 та *Mycobacterium tuberculosis*: 1 – екстракт з біомаси трансформованих рослин; 2 - екстракт з біомаси рослин дикого типу; 3 – трек маркерів молекулярних мас (представлені праворуч у вигляді відбитків на мембрані, позначений "М"); 4 – екстракт з біомаси рослин дикого типу із додаванням очищеного цільового білка, 40 пкг/трек; 5 – очищений білок, 40 пкг/трек; 6 – екстракт з біомаси рослин дикого типу із додаванням очищеного білка

ESAT6::AG85B(dTMD)::6His, 200 пкг/трек; 7 – очищений білок ESAT6::AG85B(dTMD)::6His, 200 пкг/трек; 8 – екстракт з біомаси рослин дикого типу із додаванням очищеного білка ESAT6::AG85B(dTMD)::6His, 1 нг/трек; 9 – очищений білок ESAT6::AG85B(dTMD)::6His, 1 нг/трек.

У сучасній біотехнології розробляються підходи для отримання рекомбінантних білків, які можуть тривалий час зберігатися у рослинах. Наприклад, стратегія, яка базується на продукуванні та накопиченні рекомбінантних білків у насінні, вважається ефективною та дозволяє підвищити стабільність синтезованих у рослинній системі цільових протеїнів [770-772]. Разом з тим, як показали наші дослідження, тривале, протягом 1.5 року зберігання рослин *L. minor* у ліофілізованій формі навіть без спеціальних заходів для запобігання руйнування білків не призвело до значної втрати цільового рекомбінантного білка, хоча його концентрація і зменшилася. Слід зазначити, що навіть «некомфортний» для білка температурний режим зберігання не призвів до зникнення шуканого продукту у ліофілізованій біомасі рослин.

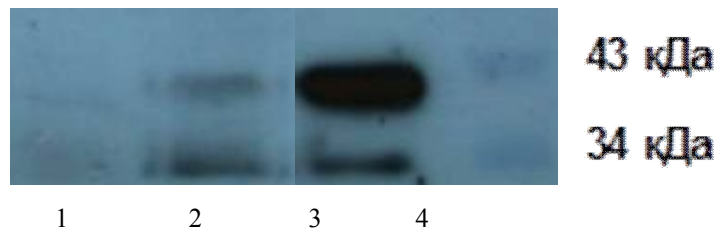


Рис. 6.2 – Порівняльний аналіз методом Western blotting наявності рекомбінантного білка екстракту з ліофілізованої та сирої біомаси трансгенних рослин *Lemna minor* з послідовністю генів *esxA::fbpB<sup>ATMD</sup>*: 1 - екстракт з біомаси рослин дикого типу; 2 – екстракт з ліофілізованої біомаси трансформованих рослин; 3 – екстракт з сирої біомаси трансформованих рослин; 4 – маркери молекулярних мас (відбитки на мембрані, сфотографовані крізь плівку із результатами Western blotting).

Отже, отримані трансгенні рослини ряски *L. minor* мали перенесені гени *esxA::fbpB* мікобактерій та дійсно синтезували рекомбінантний білок-аналог секреторних білків ESAT6 та AG85B *M. tuberculosis* у кількості 0,4-0,5 мкг на 1 грам сирої маси або до 0,036 мкг на 1 мг загального розчинного білка. Зберігання ліофілізованого рослинного матеріалу протягом 1,5 років без охолодження чи заморожування не призводило до повної деградації досліджуваного білка, хоча вміст знижувався порівняно з вмістом у культивованих *in vitro* рослинах. Таким чином, рослини ряски можуть бути запропоновані як модельна система та об'єкт генетичної трансформації з використанням бактерій *A. rhizogenes* для створення рослин-продуцентів антигенів, у тому числі антигенів мікобактерій («істівних» вакцин).

6.1.2 Накопичення інтерферону у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях. Вміст інтерферону визначали у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях, отриманих після агробактеріальної трансформації векторами pCB124 та pCB161 з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини. Проведене дослідження виявило значні відмінності у рівні накопичення інтерферону у біотехнологічних рослинах та коренях (табл. 6.1).

У екстрактах з контрольних рослин не визначено наявності інтерферону, разом з тим сполуку виявлено у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях усіх досліджуваних видів рослин. На основі отриманих даних не можна зробити однозначного висновку щодо видоспецифічності рівня накопичення інтерферону у досліджуваних зразках через значну варіабельність за цим параметром між лініями трансгенних зразків одного виду. Однак, найбільший його вміст визначено у трансгенних коренях *A. officinalis* – до 2766,66 пг/г маси, *C. intybus* – до 2654,89 пг/г маси. Разом з тим, у декількох лініях *L. sativa* інтерферон не детектували незважаючи на позитивний результат ЗТ-ПЛР аналізу. У

листках рослин, регенерованих з «бородатих коренів цикорію або салату, трансформованих бактеріями з вектором рСВ161 (МІІ промотор гена інтерферону- $\alpha 2b$  людини), вміст інтерферону був значно нижчим, ніж у вихідних лініях коренів і становив відповідно 380,10 та 212,78 пг/г маси. Вірогідно, це пов'язано з наявністю саме коренеспецифічного промотора у векторній конструкції рСВ161.

Таблиця 6.1 –

**Вміст інтерферону у трансгенних рослинах та «бородатих»  
коренях**

№ п/п	Вид рослин	Вектор	Частина рослини	Вміст інтерферону, пг/г маси
1	<i>Cichorium intybus</i>	контроль	лист, корінь	0
2	<i>C.intybus</i>	рСВ124	корені	320,27-1988,24
3	<i>C.intybus</i>	рСВ161	корені	849,92-2654,89
4	<i>C.intybus</i>	рСВ161	лист	190,89-380,10
5	<i>Lactuca sativa</i>	контроль	лист	0
6	<i>L. sativa</i>	рСВ161	лист	0-212,78
7	<i>L. sativa</i>	рСВ161	корені	468,37-873,35
8	<i>L.sativa</i>	рСВ124	лист	0-155,85
9	<i>Althaea officinalis</i>	контроль	корені	0
10	<i>A.officinalis</i>	рСВ161	корені	1761,85-2766,66
11	<i>A.officinalis</i>	рСВ124	корені	303,18-1202,34
12	<i>Artemisia tilesii</i>	контроль	корені	0
13	<i>A.tilesii</i>	рСВ161	корені	226,51-1140,09
14	<i>Bidens pilosa</i>	контроль	корені	0
15	<i>B. pilosa</i>	рСВ124	корені	227,43-1140,00

Отже, визначено, що трансгенні рослини та «бородаті» корені рослин *Cichorium intybus*, *Althaea officinalis*, *Tragopogon porrifolius*, *Artemisia tilesii*, *Lactuca sativa*, які були трансформовані векторами з геном *ifn- $\alpha 2b$* , дійсно синтезували інтерфероподібну сполуку. Максимальний вміст її становив до 2766,66 пг/г маси (у «бородатих» коренях *A. officinalis*). Вміст сполуки був органоспецифічним у тих рослин, які було трансформовано геном *ifn-*

*α2b* під контролем коренеспецифічного промотора МІІ. У той же час, рівень накопичення інтерферону очікувано не залежав від того, яку частину рослини брали для визначення інтерферону при використанні зразків, отриманих трансформацією вектором з геном *ifn-α2b* під контролем конститутивного 35S промотора. У трансформованих зразках рівень накопичення інтерферону коливався у достатньо широких межах.

З літературних джерел відомо, що інтерферон може синтезуватися у рослинних клітинах, хоча слід відзначити, що кількісні дані щодо синтезованого у клітинах трансгенних рослинах інтерферону не наведено у більшості публікацій, оскільки основним показником вважають саме активність цього рекомбінантного білка. Разом з тим, є дані, що після трансформації хлоропластної ДНК рослин тютюну було отримано лінії, які продукували інтерферон у великій кількості – до 3 мг/г сирої маси [378]. У експериментах з транз'єнтної експресії гена *ifn-α* у листках салату інтерферон накопичувався у кількості 0,393 мкг/кг маси [773]. Порівняння отриманих нами даних з результатами цих досліджень є не зовсім коректним, оскільки було застосовано різні підходи до генетичної трансформації (трансформація ядерної ДНК з використанням агробактерій, трансформація хлоропластної ДНК та транз'єнтна експресія). Разом з тим, як свідчать наведені нижче дані щодо інтерфероноподібної біологічної активності екстрактів з отриманих нами трансгенних зразків (розділ 6.1.3), створені трансгенні рослини не тільки синтезували інтерферон відповідно до перенесеного гена, але й екстракти з трансформованих зразків виявляли достатньо високу противірусну активність.

6.1.3 Противірусна активність екстрактів з трансгенних коренів, які мали ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини. Методом трансформації з використанням агробактерій було отримано лінії «бородатих» коренів рослин *A.tilesii*, *A.officinalis*, *L.sativa*, *B.pilosa* та *C.intybus* з геном *ifn-α2b*. За умов наявності перенесених генів, їх активності,

синтезу цільового білка, відповідності структури цього білка можна очікувати наявності противірусної активності екстрактів з трансгенних ліній. Наявність та високий рівень такої активності є практичною метою біотехнологічних досліджень та дозволяє використовувати трансгенні рослини як джерело БАС для профілактики та лікування вірусних захворювань.

Для визначення особливостей противірусної активності екстрактів з досліджуваних «бородатих» коренів було оптимізовано методику екстрагування, визначено наявність або відсутність видоспецифічності противірусної активності екстрактів (рівень противірусної активності різних видів рослин – цикорію, салату, причепи, полину, алтеї), порівняно рівень противірусної активності екстрактів з різних частин рослин (корені, листки) та коренів, отриманих при трансформуванні різними векторами (pCB161 та pCB124), а також при тестуванні екстрактів у системі різних клітинних ліній (MDBK, L41 та ПТП).

6.1.3.1 Визначення впливу умов екстрагування на противірусну активність екстрактів з трансгенних коренів. При тестуванні противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин отриманий результат може змінюватися при використанні різних способів екстрагування, оскільки залежить як від ефективності екстракції загального розчинного білка, так і від таких факторів як наявність у екстрагуючому буфері токсичних сполук, збереження структури цільового білка тощо. Велике значення може мати використаний буфер, оскільки його компоненти можуть бути токсичними для клітин, на яких проводиться тестування. Для визначення впливу умов екстрагування ми використовували трансгенні корені салату лінії pCB161/6 як модельного зразка. Використовували фосфатний буфер з рядом модифікацій або Tris буфер (табл. 6.2). Модифікації складу буферу стосувалися наявності таких сполук як інгібітор протеаз PMSF (1мМ), детергент Triton X100 (0,1%),



меркаптоетанол (2,5 мМ), ДСН (1%). З гомогенізованих зразків рослинного матеріалу при використанні буферів отримували первинний екстракт. Проводили також доекстрагування отриманого осаду (вторинний екстракт). Визначали противірусну активність первинних та вторинних екстрактів.

Таблиця 6.2 –

**Варіанти умов екстрагування загального білка для визначення їх впливу на противірусну активність екстрактів з трансгенних коренів салату**

№	Умови екстрагування
1	Фосфатний буфер <u>без NaCl</u> , рН 7,0-7,4 +1мМ PMSF
2	Фосфатний буфер <u>без NaCl</u> , рН 7,0-7,4 +1мМ PMSF+0,1% Triton X100
3	Tris-HCl+сахароза+1мМ PMSF+2,5 мМ меркаптоетанолу
4	Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 +1мМ PMSF, стерильно, центрифугування 15 000g, +4 С
5	Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 +1мМ PMSF, стерильно, центрифугування 3 000g, +4 С
6	До осаду варіанту № 1 + Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 + 1% ДСН+1мМ PMSF. Ресуспендувати, витримати 10 хв на льодяній бані, центрифугувати, відібрати супернатант
7	До осаду варіанту № 2 + Фосфатний буфер, рН 7,0+ 1% ДСН+1мМ PMSF. Ресуспендувати, витримати 10 хв на льодяній бані, центрифугувати, відібрати супернатант
8	До осаду варіанту № 3 + Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 + 1% ДСН+1мМ PMSF. Ресуспендувати, витримати 10 хв на льодяній бані, центрифугувати, відібрати супернатант
9	До осаду варіанту № 4 + Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 + 1% ДСН+1мМ PMSF. Ресуспендувати, витримати 10 хв на льодяній бані, центрифугувати, відібрати супернатант
10	До осаду варіанту № 5 + Фосфатний буфер, рН 7,0-7,4 + 1% ДСН+1мМ PMSF. Ресуспендувати, витримати 10 хв на льодяній бані, центрифугувати, відібрати супернатант

Відсутність активності визначено у первинних екстрактах, які отримано при використанні Tris буферу. Ці екстракти виявляли токсичність, що, вірогідно, і є причиною відсутності противірусної активності. Клітини гинули не через наявність та активність вірусу, а саме

через високу токсичність екстракту, приготовленого з використанням цього буферу.

Дослідження показали, що при доекстрагуванні у осаді виявляється значна кількість ЗРБ. Так, при екстрагуванні буфером №1 вміст білка у екстракті становив 910 мкг/мл, а при доекстрагуванні осаду – 1558 мкг/мл; при первинному екстрагуванні буфером №2 – 1170 мкг/мл, при доекстрагуванні – 1656 мкг/мл (табл. 6.3). Отже, така повторна екстракція осаду дозволяє отримати значно більшу кількість білка з рослинного матеріалу.

Додавання 0,1% Triton X100 до фосфатного буферу практично не впливало на активність екстрактів. Доекстрагування первинного осаду екстрактів №№1 та 2 з використанням фосфатного буферу + 1% ДСН+1мМ PMSF виявило активність у вторинних екстрактах (відповідно 2812 та 4687 МО/г маси, а доекстрагування первинного осаду екстрактів №№ 5 та 6 фосфатним буфером з 1% ДСН та 1мМ PMSF виявило у вторинних екстрактах значно вищу активність – до 14062 МО/г маси. Слід особливо відзначити, що таку саму активність визначено і при до екстрагування осаду №3, хоча первинний екстракт з Трис буфером був токсичним для клітин. Таким чином, додаткове доекстрагування осаду дозволяє підвищити ступінь біологічної активності, вірогідно, за рахунок більш ефективного вилучення цільових біологічно активних сполук з рослинного матеріалу.

Отже, для ефективного екстрагування біологічно активного зразка з досліджуваних трансгенних коренів зі збереженням противірусної активності у отриманих екстрактах можна використовувати фосфатний буфер. При цьому є доцільним наступне доекстрагування отриманого після центрифугування осаду фосфатним буфером з 1% ДСН та 1мМ PMSF. У такому разі можна отримати як біологічно активний первинний екстракт, так і вторинний екстракт з осаду, який також має високу противірусну активність.

**Вплив умов екстрагування загального білка на противірусну активність екстрактів з трансгенних коренів салату**

№ ва р	Наважка, г	Конц білка, мкг/мл	Вміст білка мкг/г	Активність, МО/г маси	Активність, МО/мг ЗРБ
1	0,2	910,962	2732,886	5625	6181,31
2	0,2	1170,146	3510,438	5625	4807,69
3	0,2	1518,425	4555,274	0	0
6	осад	1558,922	4676,766	2812	1805,19
7	осад	1656,116	4968,348	4687,5	2830,62
8	осад	1218,743	3656,229	14062,5	11545,56
9	осад	1542,723	4628,169	14062,5	9119,32
10	осад	1372,634	4117,901	14062,5	10249,63

Отже, дослідженнями визначено вплив умов отримання екстрактів з трансгенних ліній на рівень противірусної активності, який визначали шляхом тестування пригнічення вірусу везикулярного стоматиту. Проведені дослідження дозволяють зробити ряд висновків щодо процедури отримання біологічно активного екстракту з трансгенних коренів, а саме:

- недоцільним є використання для екстрагування лише Трис-буферу через його токсичність;
- фосфатний буфер не є токсичним та може бути використаний для екстрагування білка та інтерферону;
- у осаді залишається велика кількість загального білка (майже стільки ж, скільки екстрагується безпосередньо при первинному екстрагуванні);
- у осаді, вірогідно, залишається також і інтерферон, оскільки активність екстрактів з осаду у ряді випадків значно вища, ніж у первинного супернатанту;
- враховуючи останні висновки, доцільним є доекстрагування осаду з використанням фосфатного буферу з 1% ДСН та 1мМ PMSF, що

дозволяє значно підвищити ступінь екстрагування білка та підвищити рівень противірусної активності екстрактів.

6.1.3.2 Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин та коренів у системі клітин MDBK. В експериментах використовували екстракти рослин та «бородатих» коренів цикорію, салату, алтеї, полину та причепи, які мали ген інтерферону, а також екстракти нетрансформованих рослин у якості контролю. Приготування екстрактів проводили згідно оптимізованого протоколу з використанням доекстрагування фосфатним буфером з 1% ДСН та 1мМ PMSF. Тестування специфічної біологічної активності – пригнічення цитопатичної дії цитопатогенного вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) – проводили у клітинній системі, високоспецифічної для альфа-інтерферону людини, оскільки відомо, що клітини лінії MDBK несуть на своїй поверхні рецептори, які з високою ефективністю взаємодіють саме з інтерфероном-альфа людини (одна одиниця активності відповідає одній міжнародній одиниці). Використовували трансгенні рослини або «бородаті» корені, стосовно яких методами ПЛР та ЗТ-ПЛР було визначено наявність і активність гена *ifn- $\alpha$ 2b* [726, 728, 729] (табл. 6.4, рис. 6.3).

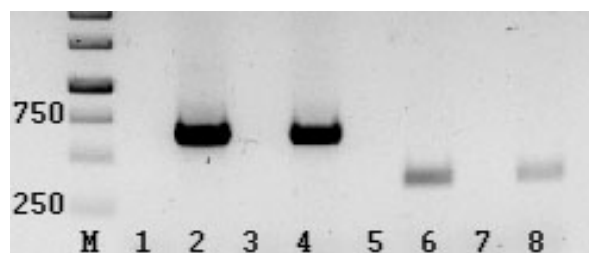


Рис.6.3 – Електрофореграма результатів ЗТ-ПЛР аналізу трансгенних ліній цикорію (1, 2, 5, 6 - корені; 3, 4, 7, 8 - листки), отриманих з використанням вектора pCB161: 1-4 - *nptII*; 5-8 - *ifn- $\alpha$ 2b*; парні треки – синтез зворотних транскриптів у присутності зворотної транскриптази, непарні – без зворотної транскриптази

Рівень противірусної активності екстрактів мав дуже широку варіабельність, як міжвидову, так і між лініями рослин або коренів рослин одного виду (табл. 6.4). Висока противірусна активність при тестуванні на клітинах MDBK виявлена у екстрактах з трансгенних коренів *L.sativa* (до 14062 МО/г маси або 11545 МО/мг ЗРБ), *A.officinalis* (до 40760 МО/г маси або 12453,44 МО/мг ЗРБ). Високу противірусну активність виявлено також у екстрактах з трансгенних коренів полину, отриманих при використанні вектора рСВ161 - до 98437 МО/г маси або 28065,89 МО/мг ЗРБ, що свідчить про високий біотехнологічний потенціал рослин цього виду.

Аналіз показав, що екстракти з трансгенних коренів одного з досліджуваних видів їстівних рослин, цикорію, мали противірусну активність по відношенню до ВВС у межах 270...2250 МО/г сирової маси рослин або 291...1203 МО/мг загального розчинного білка. Разом з тим, у рослин однієї лінії, незважаючи на наявність мРНК за даними ЗТ-ПЛР аналізу, інтерференоподібна активність проти вірусу везикулярного стоматиту була відсутня, що може бути результатом порушення наступної за транскрипцією ланки, процесу трансляції, посттрансляційних змін та ін. Екстракти з коренів аналізованих трансгенних ліній салату виявили активність в межах 595...14062 МО/г сирової маси рослин або 132...11545 МО/мг загального розчинного білка.

Екстракти з трансгенних коренів лікарських рослин також виявили противірусну активність, причому її рівень коливався у широких межах і не корелював з використанням для трансформації вектором.

Загалом противірусна активність екстрактів з трансгенних коренів рослин досліджуваних видів варіювала у таких межах:

- *C. intybus* - 270 – 2250 МО/г маси;
- *L.sativa* - 595 – 14062 МО/г маси;
- *A.officinalis* - 134 – 40760 МО/г маси;
- *A.tilesii* - 0 – 98437 МО/г маси;
- *B.pilosa* - 0 – 19396 МО/г маси.

Таблиця 6.4 –

**Противірусна активність білкових екстрактів та результати  
ЗТ-ПЛР аналізу трансгенних коренів та рослин**

№	Вид	№ лінії	Вектор	Зразок	Максимальна активність		ЗТ-ПЛР аналіз	
					МО/г маси	МО/мг ЗРБ	<i>nptII</i>	<i>ifn-α2b</i>
1	<i>C. intybus</i>	161/6	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	2250	358,34	+	+
				листки	288	262,69	+	+
2	<i>C. intybus</i>	161/13	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	1620	1203,56	+	+
				листки	0	0	+	+
3	<i>C. intybus</i>	161/21	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	270	55,33	+	+
				листки	0	0	+	+
4	<i>C. intybus</i>	161/14	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	2160	587,72	+	+
5	<i>C. intybus</i>	161/6	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	367	74,97	+	+
	<i>C. intybus</i>	161/6	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	листки	288	291,88	+	+
6	<i>C. intybus</i>	к	контроль	листки	0	0	-	-
7	<i>L. sativa</i>	161/1	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	5400	2808	+	+
8	<i>L. sativa</i>	161/1	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	листки	0	0	+	+
9	<i>L. sativa</i>	161/10	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	2250	1259,54	+	+
10	<i>L. sativa</i>	161/17	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	2880	2730,55	+	+
11	<i>L. sativa</i>	161/6	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	14062	1154,55	+	+
12	<i>L. sativa</i>	161/3	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	2500	648,41	+	+
	<i>L. sativa</i>	124/3-1	pCB124(35S::HuINFα-2b)	корені	2777	163,74	+	+
13	<i>L. sativa</i>	124/3-2	pCB124(35S::HuINFα-2b)	корені	595	132,54	+	+
14	<i>L. sativa</i>	к	контроль	корені	0	0	-	-
	<i>A. officinalis</i>	1	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	182	0,446	+	+
15	<i>A. officinalis</i>	2	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	22727	1277,7	+	+
16	<i>A. officinalis</i>	3	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	26086	1602,5	+	+
17	<i>A. officinalis</i>	161бн	pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	1041	1047,85	+	+
18	<i>A. officinalis</i>		pCB161(Mll::HuINFα-2b)	корені	134	118,323	+	+
19	<i>A. officinalis</i>	124/ 5	pCB124(35S::HuINFα-2b)	корені	5276	4064,36 3	+	+

Продовження таблиці 6.4								
20	<i>A.officinalis</i>	124/19/ 1	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	10438	4032,76	+	+
21	<i>A.officinalis</i>	124/ 2	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	2358	1643,79	+	+
22	<i>A.officinalis</i>	124/23/9	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	33112	2547,12	+	+
23	<i>A.officinalis</i>	161/2	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	3551	1025,55	+	+
24	<i>A.officinalis</i>	161/5	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	40760	12453,4 4	+	+
25	<i>A.officinalis</i>	к	контроль	корені	0	0	-	-
26	<i>A.tilesii</i>	161/23/2	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	324	310,7	+	+
27	<i>A.tilesii</i>	161/23/5	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	2272	1080,64 2	+	+
28	<i>A.tilesii</i>	161/1	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	0	0	-	-
29	<i>A.tilesii</i>	161/2	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	0	0	-	-
30	<i>A.tilesii</i>	124/23/5	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	98437	28065,8	+	+
31	<i>A.tilesii</i>	124/23/10	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	4761	1297,46	+	+
32	<i>A.tilesii</i>	124/23/2	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	652	234,28	+	+
33	<i>A.tilesii</i>	к	контроль	корені	0	0	-	-
34	<i>B.pilosa</i>	124/28/3	pCB124(35S::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	19396	3821,60	+	+
35	<i>B.pilosa</i>	161/1	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	0	0	-	-
36	<i>B.pilosa</i>	161/2	pCB161(Mll::HuINF $\alpha$ -2b)	корені	0	0	-	-
37	<i>B.pilosa</i>	к	контроль	корені	1406	177,68	-	-
38	<i>B.pilosa</i>	к	контроль	листки	937	192,43	-	-
+ детектували зворотні транскрипти; - зворотні транскрипти не виявлено								

Проведено порівняння противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів та регенованих з них рослин. Таке дослідження становило інтерес, оскільки при трансформуванні для отримання культури «бородатих» коренів використовували також вектор з геном інтерферону під коренеспецифічним промотором У більшості зразків екстрактів з регенованих рослин противірусна активність була відсутня. Разом з тим, екстракти з трансгенних коренів відповідних ліній виявляли противірусну активність. Наприклад, екстракти з «бородатих» коренів цикорію та салату ліній №№161/13 та 161/1 мали активність проти ВВС 1620 та 5400 МО/г маси відповідно, а екстракти з регенованих з цих ліній коренів рослин

протівірусну активність не мали. Обидві лінії коренів було отримано з використанням вектора pCB161 (Mll::HuINF $\alpha$ -2b), у якому ген *ifn- $\alpha$ 2b* знаходився під контролем коренеспецифічного Mll промотора цукрового буряка. Цей вектор раніше вже було використано для генетичної трансформації рослин моркви [19]. Автори [19] встановили, що екстракти з листків трансгенних рослин мали протівірусну активність, причому така активність екстрактів з листків була навіть вищою, ніж активність екстрактів, отриманих з коренів рослин та становила відповідно у середньому  $26,8 \times 10^3$  МО/г маси та  $8,56 \times 10^3$  МО/г маси, що може бути наслідком особливостей синтезу цільового білка у різних органах рослин. Разом з тим, у наших дослідженнях виявлено протівірусну активність саме у екстрактах з трансгенних коренів, у той же час протівірусна активність екстрактів з листків регенованих рослин була невисокою або відсутня. Таким чином, використання коренеспецифічного промотора Mll, можливо, недоцільно в тому випадку, коли метою роботи є синтез специфічних білків в надземній частині рослин салату і цикорію. Однак, цей промотор може бути успішно використаний у векторах при трансформації рослин цих та інших видів для синтезу цільових продуктів у коренях. Такий висновок підтверджується визначеною протівірусною активністю екстрактів з трансгенних коренів рослин таких видів як *B.pilosa*, *A.officinalis*, *A.tilesii*.

Раніше у ряді робіт [19, 298, 774, 775] було показано, що екстракти з трансгенних рослин, до яких перенесено ген інтерферону людини, мають відповідну біологічну активність. Рівень протівірусної активності екстрактів трансгенних рослин коливається у досить широких межах, що, вірогідно, пов'язано як з видоспецифічністю синтезу, так і з відмінностями у способах екстрагування та тестування на різних культурах клітин. Наприклад, у рослинах салату з геном інтерферону- $\alpha$ 2b людини активність проти вірусу везикулярного стоматиту становила 448 МО/г маси рослин [776], активність екстрактів з рослин картоплі – 560 МО/г маси [379], 923-



3029 МО/г [299], алое – 625 МО/г загального розчинного білка [304], рослин тютюну (транз'єнтна експресія) – до 3200 МО/г маси [777], трансгенного рису - до 30000 – 45000 МО/г маси насіння [18]. Активність залежала від типу досліджуваного матеріалу (корені, листки, насіння [18]), віку матеріалу (наприклад, молоді або зрілі листки [19]). Високий рівень активності рослинних екстрактів виявлено у трансгенних рослинах моркви – до 50000 МЕ/г сирої маси [19] та жень-шеню – 60000 МО/мл [778].

Проведене нами дослідження щодо наявності противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин та коренів видів рослин *B.pilosa*, *A.tilesii*, *A.officinalis*, *L.sativa*, *C. intybus* [728-730, 732, 733] виявило значні відмінності у величині такої активності. Варіювання рівня активності екстрактів з різних ліній, можливо, є наслідком того, що кожна з таких ліній є окремою трансформаційною подією, внаслідок чого може відрізнятися за місцем вбудовування перенесених генів, їх активністю, а також за особливостями активності інших генів через наявність перенесених чужорідних генів та самої трансформації як стресового фактору. Екстракти з отриманих нами ліній трансгенних коренів мали досить високу противірусну активність. Так, екстракт однієї з ліній коренів *A.tilesii* мав противірусну активність до 98437 МО/г маси, що перевищує наявні у літературі дані щодо противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин різних видів, *A.officinalis* – 40760 МО/г маси, *L.sativa* – 14062 МО/г маси, що співставно з найкращими результатами, отриманими при визначенні противірусної активності трансгенних рослин інших видів.

Результати експериментів показали, що досліджувані рослини є достатньо ефективною біотехнологічною системою та можуть бути використані для синтезування біологічно активного рекомбінантного інтерферону. Слід відзначити також результати дослідження інтерфероподібної противірусної активності екстрактів з контрольних рослин причепи. Виявилося, що вони також демонстрували, хоча й невисоку, противірусну активність. Наявність такої робить подальше

дослідження рослин цього виду особливо перспективним як джерело природних сполук рослинного походження з противірусною активністю.

6.1.3.3 Порівняння противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів з використанням різних клітинних ліній. Було порівняно противірусну активність екстрактів з ряду ліній «бородатих» коренів рослин *A. tylesii*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *B. pilosa* та *C. intybus* при використанні для тестування трьох ліній клітин – культури перещеплюваних субстратзалежних клітин тестикул поросят (епітеліальні клітини, ПТП), культури перещеплюваних клітин нирки бика (MDBK) та культури перещеплювальних субстратзалежних клітин кісткового мозку людини, (епітеліоподібні клітини, L41), чутливих до дії інтерферону. Результати аналізів свідчать про те, що при використанні вищеназваних культур клітин активність екстрактів значно відрізнялася. Так, найбільшою противірусною активністю була при тестуванні на клітинах MDBK, найнижчою для більшості зразків – на культурі клітин L41 (табл. 6.5).

Таблиця 6.5 –

**Порівняння активності екстрактів з трансгенних коренів рослин різних видів проти вірусу везикулярного стоматиту при тестуванні на клітинах MDBK, ПТП та L41**

№	Вид	№ лінії	Максимальна противірусна активність					
			клітини MDBK		клітини ПТП		клітини L41	
			МО/г маси	МО/мг ЗРБ	МО/г маси	МО/мг ЗРБ	МО/г маси	МО/мг ЗРБ
1	<i>A. tylesii</i>	124/23/5	98437	28065	6285	1536	0	0
2	<i>A. tylesii</i>	124/28/5	0	0	0	0	0	0
3	<i>A. tylesii</i>	124/23/2	652	234	0	0	0	0
4	<i>A. tylesii</i>	контроль	0	0	0	0	0	0
5	<i>A. officinalis</i>	124/23/9	33112	2547	3548	679	1408	269
6	<i>A. officinalis</i>	124/5	5276	4064	638	175	0	0

Продовження таблиці 6.5								
7	<i>A.officinalis</i>	контроль	0	0	0	0	0	0
8	<i>L.sativa</i>	161/6	14062	11545	2287	916	0	0
9	<i>L.sativa</i>	161/1	5400	2808	785	170	0	0
10	<i>L.sativa</i>	контроль	0	0	0	0	0	0
11	<i>C. intybus</i>	161/13	1620	1337	0	0	0	0
12	<i>C. intybus</i>	161/14	2160	653	0	0	0	0
13	<i>C. intybus</i>	124/11/5	4320	103	1884	389	942	194
14	<i>C. intybus</i>	контроль	0	0	0	0	0	0
15	<i>B.pilosa</i>	124/28/3	19396	3821	0	0	5761	1544
16	<i>B.pilosa</i>	161/16/3	0	0	0	0	0	0
17	<i>B.pilosa</i>	контроль	1406	177	0	0	1215	293

Синтезовані у рослинній системі молекули інтерферону можуть мати особливості структури, що призводить до різного розпізнавання та відповідно різної противірусної активності у системі клітин використаних ліній. Такі особливості противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин з геном інтерферону становлять інтерес, однак цей аспект досі зовсім не досліджували, оскільки в усіх роботах з отримання трансгенних рослин з геном інтерферону та тестування противірусної активності екстрактів дослідники використовували лише якусь одну чутливу до інтерферону культуру клітин. Наприклад, у експериментах з визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин моркви використовували лише культуру клітин ПТП [19], у роботах Ren [778] та Оуа зі співавторами [379] дослідження екстрактів з трансгенних рослин проводили тільки на амніотичних клітинах людини, у дослідженнях [304] використовували альвеолярні базальні епітеліальні клітини карциноми лінії A549. Отже, нині відсутній необхідний масив даних для проведення докладного аналізу особливостей виявлення противірусної активності

екстрактів з трансгенних рослин різних видів на ряді клітинних ліній (тварин чи людини). Разом з тим, виходячи з наших досліджень, екстракти з трансгенних коренів мали різну противірусну активність при використанні трьох клітинних ліній, MDBK, ПТП та L41, хоча усі ці лінії є чутливими до інтерферону-альфа. Такий феномен може свідчити про особливості будови молекули рекомбінантного інтерферону рослинного походження, синтезованого у коренях рослин досліджуваних видів. За результатами тестування було відібрано лінії трансгенних коренів, екстракти з яких виявляли противірусну активність на усіх використаних культурах клітин. Зокрема, екстракти з трансгенних коренів *A.officinalis* 124/23/9 мали противірусну активність проти ВВС на клітинах MDBK, ПТП та L41 відповідно 33112, 3548 та 1408 МО/г маси; *C. intybus* 124/11/5 – відповідно 4320, 1884 та 942 МО/г маси. Екстракти з трансгенних коренів *A.tilesii* 124/23/5, *L.sativa* 161/6 і 161/1 були активними лише на клітинах MDBK та ПТП – відповідно 98437 та 6285 МО/г маси для *A.tilesii* 124/23/5, 14062 та 2287 МО/г маси для *L.sativa* 161/6, 5400 та 785 МО/г маси для *L.sativa* 161/1. Екстракти з трансгенних коренів *B.pilosa* лінії 124/28/3 демонстрували противірусну активність на клітинах MDBK та L41 - 19396 та 5761МО/г маси.

Слід відмітити, що екстракти з контрольних рослин цикорію, салату, полину та алтеї не містили сполук з противірусною активністю, а також сполук, що стимулювали би або пригнічували дію рекомбінантного інтерферону. Такий ефект не залежав від культури клітин, на яких проводити тестування. Разом з тим, виявлено противірусну активність до 1406 та 1215 МО/г маси у екстрактах з коренів контрольних рослин причепи при тестуванні на клітинах MDBK та L41 відповідно. Отже, нетрансформовані рослини причепи синтезували сполуки з противірусною активністю, що робить ці рослини, досі практично не використовувані у біотехнологічних дослідженнях, особливо перспективними. Слід зазначити, що противірусний ефект екстрактів з рослин череди волосистої,

зібраної у природі, було досліджено раніше. Так, встановлено, що водний екстракт рослин інгібував реплікацію вірусу герпесу [581]. За результатами наших досліджень, культивовані *in vitro* рослини та корені причепи також синтезували сполуки з противірусною активністю, що може бути використано для розроблення лікарських противірусних засобів.

Таким чином, було оптимізовано протокол екстрагування загального розчинного білка, який дозволяв значно підвищити рівень противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів. Для цього доцільним є первинне екстрагування з використанням фосфатного буферу та доекстрагування осаду з використанням фосфатного буферу з 1% ДСН та 1мМ PMSF, що дозволяє значно підвищити ступінь екстрагування білка та збільшити рівень противірусної активності екстрактів.

Проведено дослідження противірусної активності екстрактів з отриманих нами «бородатих» коренів рослин *A. tilesii*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *B. pilosa*, *C. intybus* та регенерованих рослин. Визначено варіабельність противірусної активності екстрактів, як отриманих з рослин різних видів, так і з різних ліній коренів рослин одного виду. Активність проти вірусу везикулярного стоматиту у системі клітин MDBK становила для трансгенних коренів *C. intybus* – 270 - 2250 МО/г маси; *L. sativa* – 595 - 14062 МО/г маси; *A. officinalis* – 134 - 40760 МО/г маси; *A. tilesii* – 0 - 98437 МО/г маси; *B. pilosa* – 0 - 19396 МО/г маси. Найвища противірусна активність детектована у екстрактах з однієї лінії «бородатих» коренів *A. tilesii* до – 98437 МО/г маси. Слід відзначити, що екстракти з регенерованих з трансгенних коренів рослин мали дуже низьку активність проти ВВС або не мали її зовсім.

Було визначено варіабельність ефективності антивірусної дії досліджуваних екстрактів у системі трьох ліній клітин, чутливих до інтерферону – MDBK, ПТП та L41. Екстракти з трансгенних коренів *A. officinalis* 124/23/9 мали противірусну активність проти ВВС на усіх лініях клітин: до 33112, 3548 та 1408 МО/г маси відповідно на MDBK, ПТП та

L41. Екстракти з трансгенних коренів *A. tylesii* 124/23/5, *L. sativa* 161/6 і 161/1 були активними лише на клітинах MDBK та ПТП - відповідно до 98437 та 6285 МО/г маси для *A. tylesii* 124/23/5, до 14062 та 2287 МО/г маси для *L. sativa* 161/6, до 5400 та 785 МО/г маси для *L. sativa* 161/1. Екстракти з чотирьох ліній коренів мали противірусну активність на клітинах MDBK та ПТП, двох ліній – лише на клітинах MDBK.

Екстракти з контрольних рослин *A. tylesii*, *A. officinalis*, *L. sativa* та *C. intybus* не виявляли противірусну активність при тестуванні на усіх використаних клітинних лініях, однак екстракти з контрольних рослин *B. pilosa* були активними проти вірусу везикулярного стоматиту, що свідчить про перспективу їх використання для розроблення лікарських противірусних засобів.

## 6.2 Накопичення природних БАС у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях

### 6.2.1. Накопичення поліфруктанів.

Відомо, що рослини є джерелом цілої низки хімічних сполук, які становлять значний інтерес з точки зору використання у фармакології та харчовій промисловості. У них синтезуються вторинні метаболіти, запасні сполуки, ефірні олії, барвники тощо. Зазвичай отримання цінних речовин здійснюють шляхом екстрагування з рослин, які вирощуються у природних умовах. Разом з тим, такий спосіб пов'язаний з необхідністю або масового збору дикоростучих рослин, або їх вирощуванням. При вирощуванні рослин у природних умовах вміст цільових сполук залежить від цілого ряду неконтрольованих факторів, таких як перезволоження або нестача вологи ґрунту, зміни температури при вегетації або при зимуванні (для багаторічних культур). Разом з тим, є можливість отримання цінних сполук з рослинного матеріалу у суворо контрольованих умовах, використовуючи при цьому саме ті рослини, що є найкращими

продуцентами. Відомий спосіб отримання біологічно активних сполук з культивованих *in vitro* клітин. Дійсно, клітинна суспензійна культура є альтернативою рослинній сировині для продукування запасних сполук та вторинних метаболітів. Цей спосіб розроблявся ще у 80-і роки минулого сторіччя [779, 780].

Разом з тим, існує ще одно джерело біологічно активних сполук рослинного походження – культивовані *in vitro* «бородаті» корені. Такі корені, що ростуть на живильному середовищі без регуляторів росту, отримують шляхом трансформування рослин з використанням бактерій *Agrobacterium rhizogenes*. Ці ґрунтові бактерії мають природну здатність до перенесення частини власного геному до клітин рослин, що відбувається після контакту бактерій з пораненими частинами рослин, у яких синтезуються сигнальні сполуки [27, 687, 781, 782]. За допомогою агробактерій отримано трансгенні корені різних видів рослин [780-783]. Трансгенні корені відрізняються особливим фенотипом, швидким ростом, значним галуженням. У трансгенних коренях, так само як і в коренях нетрансформованих рослин, синтезуються біологічно активні сполуки [196, 690, 711, 784].

Використання «бородатих» коренів для продукування біологічно активних сполук має ряд переваг. Так, для трансгенних коренів характерний швидкий приріст маси, навіть більший, ніж у культивованих в стерильних умовах культур клітин. Крім того, для вирощування «бородатих коренів не потрібні особливі умови – наявність регуляторів росту, освітлення, підтримання підвищеної температури. До переваг використання «бородатих» коренів як продуцентів біологічно активних сполук слід також віднести технічну простоту їх отримання шляхом опосередкованої агробактеріями трансформації. Саме це робить культуру трансгенних коренів перспективною для біотехнологій синтезування та отримання цінних сполук.

До запасних сполук, що синтезуються у рослинах та їх коренях, належать фруктани. Вони є полісахаридами з різною кількістю залишків фруктози. Фруктани виявляють біологічну активність та використовуються у медицині та харчовій промисловості. Ці сполуки синтезуються багатьма рослинами, зокрема, показано наявність фруктанів у широко культивованих рослинах артишоку, брокколі, цикорію, ендівію, цибулі, салату та ін. [785]. Трансгенні корені рослин-продуцентів фруктанів можуть бути джерелом для отримання цих сполук.

6.2.1.1 Оптимізування умов екстрагування фруктозовмісних цукрів. Досліджено залежність ефективності екстрагування фруктанів з трансгенних коренів цикорію від тривалості попереднього замочування, температури і тривалості високотемпературної екстракції. Для дослідження використовували висушені і подрібнені «бородаті» корені цикорію, одержані шляхом трансформації з використанням *A. rhizogenes*. Застосовували низько- та високотемпературну екстракцію: відповідно екстрагування без нагрівання за +22° С протягом 0.5; 1 та 24 год та екстрагування за +70° С, 80° С і 90° С протягом 10, 20 і 30 хв. У ході експериментів були отримані дані щодо залежності кількості екстрагованих фруктанів від тривалості попередньої екстракції при температурі +22° С ( $T_1$ ), температури теплової екстракції ( $t^\circ$ ) і її тривалості ( $T_2$ ) (рис. 6.4).

Тривалість попереднього замочування рослинного матеріалу при температурі +22 ° С практично не впливала на вихід фруктанів при подальшій високотемпературній екстракції при +90° С протягом 30 хв. За екстрагування при температурі 70 ° С (попереднє замочування коренів протягом 24 год) вихід фруктанів був найменшим та становив відповідно при екстракції протягом 10, 20 та 30 хвилин  $74 \pm 1,69$ ,  $77 \pm 1,61$  та  $86 \pm 5,82$  мг/г маси відповідно. Підвищення температури екстракції до +90 ° С призводило до підвищення концентрації фруктанів у екстрактах у 1,7 рази



у порівнянні з екстрагуванням при  $+70^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Подальше підвищення температури екстрагування (до  $+95^{\circ}\text{C}$ ) не призводило до достовірного збільшення концентрації екстрагованих фруктанів. Збільшення тривалості температурної екстракції з 10 до 30 хвилин при  $+70^{\circ}\text{C}$  та  $+80^{\circ}\text{C}$  призводило до збільшення концентрації фруктанів у екстрактах відповідно у 1,16 та 1,53 рази. Разом з тим, збільшення тривалості температурної екстракції при  $+90^{\circ}\text{C}$  достовірно не підвищувало вихід екстрагованих фруктанів. Максимальна кількість екстрагованих фруктанів за температури  $+90^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв становила  $146 \pm 8,77$  мг/г сухої маси коренів.

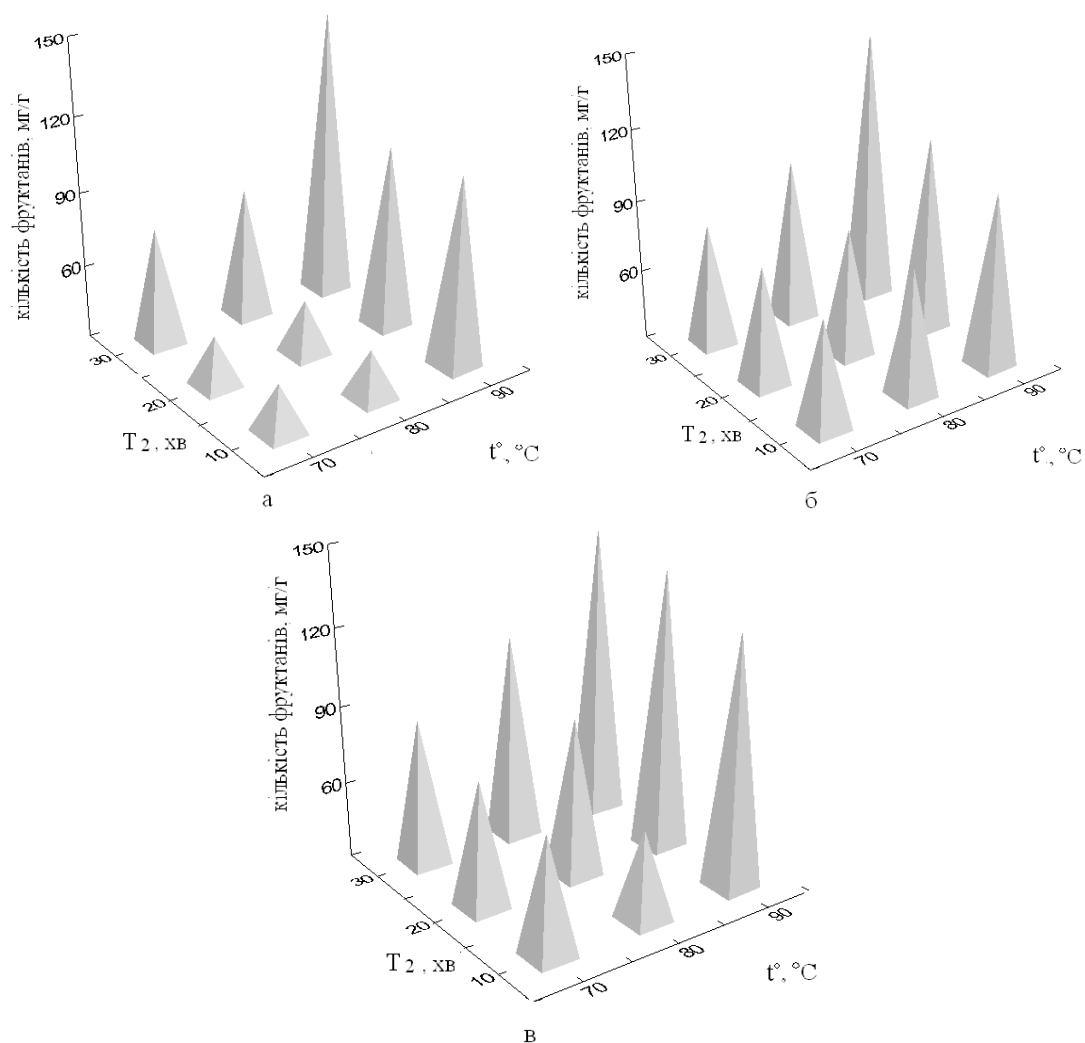


Рис. 6.4 – Залежність ефективності екстракції фруктанів з «бородатих» коренів цикорію від тривалості ( $T_2$ ) та температури ( $t^{\circ}$ ) екстрагування;

тривалість попередньої екстракції ( $T_1$ ) при температурі  $+4^\circ\text{C}$ : а – 0,5 год; б – 1 год; в – 24 год (рівень надійної імовірності  $P_{0,95}$ )

Таким чином, розроблено просту та ефективну методику екстрагування фруктанів з трансгенних коренів цикорію. Визначено умови, за яких екстрагується більша кількість фруктозовмісних цукрів. Оптимальним режимом виділення фруктанів з культури «бородатих» коренів цикорію є екстракція при температурі  $+90^\circ\text{C}$  протягом 30 хв.; час попереднього замочування не впливав на ефективність такої екстракції. Отриманий за даним способом екстракт (рис. 6.5), що містив фруктани, використовували у подальшому для дослідження УФ-протекторної активності.



Рис. 6.5 – Ліофілізований фруктановмісний екстракт з трансгенних коренів цикорію

6.2.1.2 Вміст поліфруктанів у трансгенних коренях. За використання оптимізованої методики нами було визначено та порівняно особливості накопичення фруктанів у трансгенних коренях рослин різних видів. Для цього використовували культивовані *in vitro* «бородаті» корені рослин *A. officinalis*, *T. porrifolius*, *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *B. pilosa*. При визначенні вмісту фруктанів у трансгенних коренях рослин різних видів виявлено значні коливання за цим параметром. У декількох лініях вміст ПФ був вищим, ніж у контролі (корені нетрансформованих рослин). У той же час, у ряді ліній вміст фруктанів був нижчим, ніж у контролі або

достовірно не відрізнявся від вмісту сполук у контрольних коренях. Так, у 30-денній культурі «бородатих» коренів салату вміст ПФ коливався у межах  $18.45 \pm 3.3$  –  $122.35 \pm 1.9$  мг/г сухої маси. У трансгенних коренях козельців, причепи, полину, цикорію вміст ПФ становив відповідно  $55.85 \pm 14.12$  –  $144.11 \pm 14.12$ ,  $32.29 \pm 5.34$  –  $152.73 \pm 29.11$ ,  $70.59 \pm 15.56$  –  $136.99 \pm 28.12$ ,  $41.75 \pm 5.6$  –  $193.31 \pm 34.47$  мг/г сухої маси. Як видно з наведених діаграм, серед ліній трансгенних коренів кожного з досліджуваних видів рослин були такі, вміст фруктанів у яких значно перевищував вміст сполук у контролі. Зокрема, спостерігалось збільшення у 3,8 рази концентрації ПФ у коренях цикорію, у 2,4 рази у трансгенних коренях салату, у 1,6 рази у «бородатих» коренях причепи, у 4,2 рази у «бородатих» коренях козельців.

Найбільший вміст фруктанів виявлено у одній з ліній «бородатих» корені цикорію,  $193.31 \pm 34.47$  мг/г сухої маси, що є логічним, оскільки рослини цього виду відомі як такі, що синтезують фруктами у значній кількості. Досить високий вміст фруктанів був і у одній з ліній трансгенних коренів причепи волосистої –  $152.73 \pm 29.11$ . Взагалі рослини родини Складноцвітих відносять до продуцентів фруктозовмісних цукрів, у яких вони акумулюються як запасні сполуки. Рівень фруктанів у цих рослинах у природних умовах змінюється впродовж вегетації, а також може значно підвищуватися при дії стресових факторів як адаптивна реакція. Разом з тим, аналогічні зміни спостерігали і у «бородатих» коренях рослин алтеї, які належить до іншої родини (Мальвові). Хоча загалом вміст фруктанів у коренях алтеї був нижчим за наведені вище цифри у коренях рослин родини складноцвітих, спостерігали як збільшення, концентрації ПФ, так і відсутність достовірних відмінностей у порівнянні з контролем (рис. 6.6).

Отримані дані щодо змін у рівні накопичення фруктанів у різних лініях трансгенних коренів незалежно від виду досліджуваних рослин, вірогідно, є результатом неспецифічного впливу генетичної трансформації

та перенесення чужорідних генів, наявність яких може некеровано змінювати природну експресію тих чи інших генів рослин, впливаючи таким чином на клітинний метаболізм. Такий феномен дії трансформації може бути використаний для підвищення вмісту цінних сполук у трансгенних коренях, зокрема, для збільшення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів.

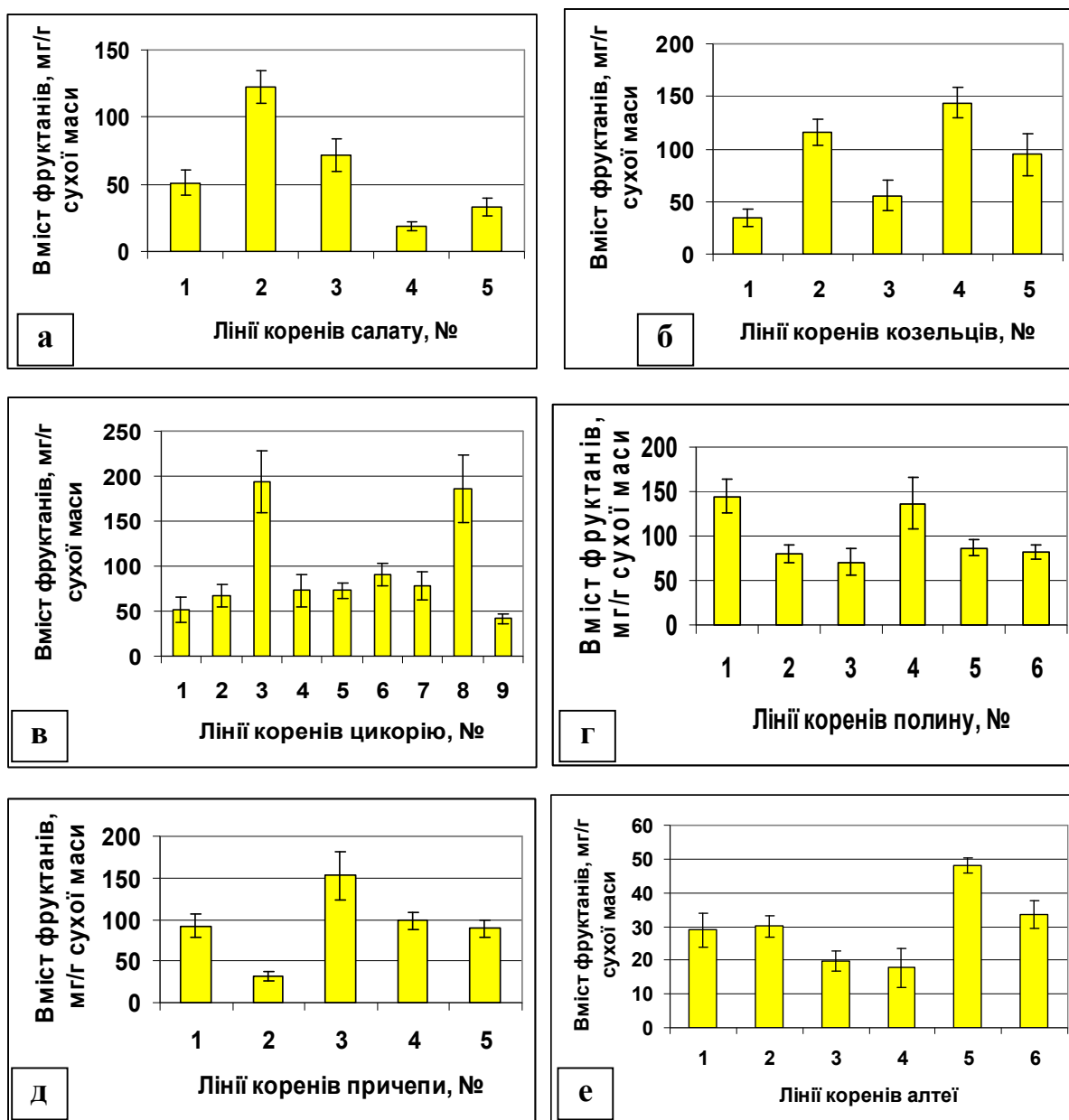


Рис. 6.6 – Відмінності у вмісту фруктанів у культурах «бородатих» коренів рослин *L. sativa* (а), *T. porrifolius* (б), *C. intybus* (в), *A. tilesii* (г), *B. pilosa* (д), *A. officinalis*(е), 1 – контроль, далі – лінії трансгенних коренів.

Як зазначалося, корені, отримані після трансформації рослин за допомогою агробактерій, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, які властиві для тої чи іншої рослини [195-200], причому в трансформованих коренях вміст таких сполук може бути вищий за вміст в коренях рослин дикого типу. Так, концентрація полісахаридів в трансгенних коренях *Echinacea purpurea* була вищою, ніж у вихідних рослин [200]. Концентрація вітаноліда в трансгенних коренях *Withania somnifera* була більш ніж у 2 рази вищою, ніж у нетрансформованих [200]. Шляхом *A. rhizogenes*–опосередкованої трансформації отримано корені *Glycyrrhiza uralensis* з підвищеним синтезом флавоноїдів [201].

У результаті генетичної трансформації можуть змінюватись фізіологічні та біохімічні характеристики рослин. Такі зміни можуть бути як прогнозовані (у випадку перенесення гена, що відповідає за ознаку, яка змінюється), так і непрогнозовані (у випадку перенесення гена, що відповідає за іншу ознаку). Так, у трансгенних рослин тютюну із геном хлоропластної Cu/Zn-СОД спостерігали прогнозоване підвищення активності цього ферменту і, як наслідок, збільшення стійкості до оксидативного стресу, спричиненого впливом низьких температур [786]. Рослини тютюну, що мали ген *VTE1* (токоферолциклази – ферменту, що бере участь у біосинтезі токоферолу) з *Arabidopsis* та культивувались в умовах посухи, відрізнялись більш високим вмістом токоферолу та низьким рівнем перекисного окислення ліпідів, а також меншим вмістом пероксиду водню у порівнянні з рослинами дикого типу в умовах посухи [787]. Трансгенні рослини, які мали гени, що кодують ферменти синтезу того чи іншого осмоліту, наприклад, гліцинбетаїну або проліну [788, 789], мали підвищений вміст цих сполук у порівнянні з рослинами дикого типу та були більш стійкими до дії абіотичних стресів. Після перенесення в геном рослин генів фруктозилтрансферази (*6-SFT*) з ячменю відбувалось значне підвищення синтезу інуліну (запасного фруктану цикорію) [438].

Разом з тим, можуть відбуватися не прогнозовані (неочікувані) фізіолого-біохімічні зміни у рослин після генетичної трансформації. Так, у рослин із геном фітоенсинтетази спостерігали підвищений вміст  $\alpha$ - та  $\beta$ -каротину [790]; кукурудза із геном Vt-токсину містила у стеблі підвищену кількість лігніну у порівнянні із контролем [791], рослини рису із геном синтезу гліцину сої відрізнялись підвищеним вмістом білка та вітаміну B<sub>6</sub> [792]. Показано пришвидшення росту (зменшення часу проростання насіння з 6-8 діб до 3-4 діб) та накопичення сухої маси (на 80-100 %) рослинами тютюну з геном гемоглобіну (*VHb*) [793]. У рослин тютюну з геном леггемоглобіну A сої спостерігали зниження рівня накопичення сухої маси (50 %) та зниження рівня перекисного окислення ліпідів (на 19%), і відповідно підвищенням антиоксидантної активності у порівнянні з контролем [794].

Отримані нами дані свідчать про те, що здатність до накопичення фруктозовмісних сполук є видоспецифічною ознакою, а також змінюється у трансгенних лініях коренів одного виду. Оскільки кожна трансгенна лінія є незалежною трансформаційною подією, на синтез та накопичення певних сполук може впливати як наявність, так і положення перенесених генів. У даному дослідженні у генетичних конструкціях, використаних при генетичній трансформації, були відсутні гени, які можуть безпосередньо впливати на синтез фруктанів. Отже, варіабельність концентрацій фруктанів у трансгенних коренях одного виду рослин можна пояснити змінами експресії генів синтезу фруктанів у результаті вбудовування у геном та активності чужорідних генів. Наші дослідження показали, що генетична трансформація рослин різних видів з генами, які теоретично не повинні впливати на фізіолого-біохімічні особливості, призводила до змін у накопиченні запасних цукрів. Загалом, у 33% досліджуваних трансгенних лініях коренів вміст фруктанів перевищував вміст цих сполук у контролі, у 37% був на рівні вмісту у контролі, у 30% був меншим, ніж у коренях контрольних рослин. У 100% ліній коренів *T. porrifolius*, 37.5%

ліній *C. intybus*, 50% ліній *L. sativa* вміст фруктанів підвищувався у порівнянні з контролем. У трансгенних коренях *T. porrifolius* вміст фруктанів був вищим до 4.2 разів, *L. sativa* – до 2.4 разів, *C. intybus* до 2.8 рази у порівнянні з вмістом у коренях контрольних рослин.

Таким чином, визначено видові відмінності у накопиченні фруктанів у «бородатих» коренях рослин *C. intybus*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *B. pilosa*, отриманих після генетичної трансформації. Трансгенні корені рослин усіх досліджуваних видів, отримані з використанням як дикого штаму *A. rhizogenes* A4, так і *A. rhizogenes*, що несли вектори, у 33 % випадків накопичували у 2.8-4.2 рази (залежно від лінії та виду) більше фруктанів у порівнянні з контролем. Найбільша кількість фруктанів накопичувалася у трансгенних коренях *T. porrifolius*, отриманих після трансформації диким штамом агробактерій A4 та *C. intybus*, трансформованих агробактеріями з вектором, що ніс ген *ifn- $\alpha$ 2b*. Створені трансгенні корені цих лікарських рослин можуть бути джерелом для отримання біологічно активних фруктозовмісних цукрів.

6.2.1.3 Підвищення швидкості росту та рівня накопичення ПФ у «бородатих» коренях за використання регуляторів росту. Відомо, що використання регуляторів росту дозволяє пришвидшувати накопичення біомаси, що може підвищити біотехнологічний потенціал цінних ліній. Ми порівнювали ефективність застосування синтетичних регуляторів росту ІМК та  $\alpha$ -НОК, а також стимулятора росту природного походження Біолан та Чаркор («Агробіотех») для збільшення швидкості росту та підвищення синтезу ПФ у культурі «бородатих коренів» цикорія (*C. intybus* L.) сорту Пала росса, трансформованих *A. rhizogenes*.

Визначено можливість використання хімічних регуляторів –  $\alpha$ -нафтилоцтової та індолілмасляної кислот для збільшення продуктивності (маси та вмісту ПФ) біотехнологічних коренів. Додавання цих сполук до

живильного середовища у концентрації 0.5 мг/л призводило до пришвидшення росту «бородатих» коренів, збільшення їх маси за контрольований період часу (рис. 6.6 в), однак достовірних відмінностей у питомому вмісті ПФ не спостерігали. Разом з тим за рахунок збільшення маси коренів загальний вміст ПФ (на загальну масу, отриману протягом 30 діб) збільшувався як при використанні НОК та ІМК, так і при використанні регуляторів природного походження (рис. 6.7, в, г).

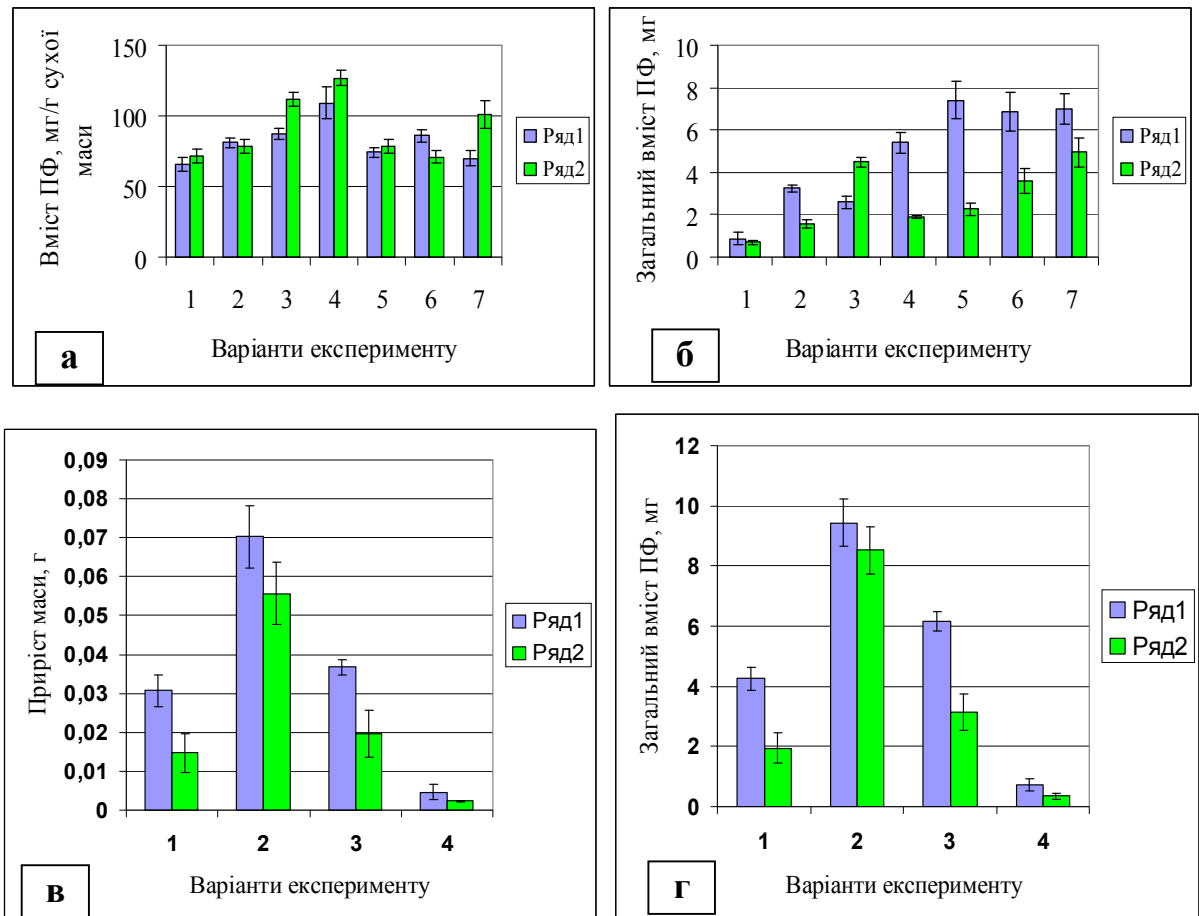


Рис. 6.7 – Порівняння впливу природних (а, б) та синтетичних регуляторів росту (в, г) на питомий (а) та загальний (б, г) вміст ПФ і приріст маси (в) у «бородатих» коренях цикорію (30 діб культивування): ряд 1 та 2 – лінії «бородатих» коренів; а, б: 1 – вирощування на середовищі 1/2МС; 2 - 4 – додавання до середовища 1/2МС Біолану у концентрації 2.5, 5.0 та 10.0 мкл/л; 5 – 7 - додавання до середовища 1/2МС Чаркору у концентрації 2.5, 5.0 та 10.0 мкл/л; в, г: 1 – 0.5 мг/л НОК; 2 – 0.5 мг/л ІМК; 3 – 5 мкл/л Чаркору; 4 – контроль (без регуляторів)



Стимулюючий ефект додавання Чаркору був подібний до ефекту, спричиненого НОК, однак додавання до живильного середовища ІМК призводило до більшого накопичення маси коренів. Ефективність регулятору Чаркор була вищою, ніж Біолану. Його додавання до живильного середовища 1/2МС призводило до активізації росту коренів, збільшення маси до 11,5 разів у порівнянні з контролем (за 30 діб).

Отже, виявлено можливість прискорення росту «бородатих» коренів та підвищення вмісту ПФ за використання як синтетичних, так регуляторів росту природного походження. Визначено також різну чутливість до регуляторів росту ліній трансгенних коренів. Оскільки кожна лінія трансгенних коренів є унікальною (окрема трансформаційна подія), тому, можливо, що така специфічна чутливість пов'язана з особливостями синтезу ендогенних фітогормонів після перенесення чужорідних генів до геному рослин та вбудовування цих трансгенів у різні локуси. Разом з тим, виявлений ефект стимулювання росту та різної чутливості ліній трансгенних коренів до застосованих регуляторів може бути використаний у біотехнологіях вирощування «бородатих» коренів з метою отримання більшої біомаси та цільового продукту.

6.2.2. Вміст артемізиніну. Одним з об'єктів досліджень були рослини *A. tilesii*, шляхом трансформації яких отримано культуру «бородатих» коренів. Метою нашої роботи було дослідження особливостей отриманих трансгенних коренів практично недослідженого виду роду *Artemisia*, алеутського полину стосовно накопичення артемізиніну у порівнянні з коренями контрольних рослин.

Отримані трансгенні корені накопичували у процесі культивування *in vitro* артемізинін, сполуку з антималярійними властивостями, у кількості до 0,03% сухої маси (рис. 6.8). У коренях контрольних рослин за таких самих умов вирощування вміст артемізиніну становив 0,039 % сухої маси, вміст артемізиніну у листках рослин – 0,03% сухої маси. При цьому корені

вирощували за простих умов на середовищі 1/2МС (не використовували елісатори, спеціальні умови вирощування).

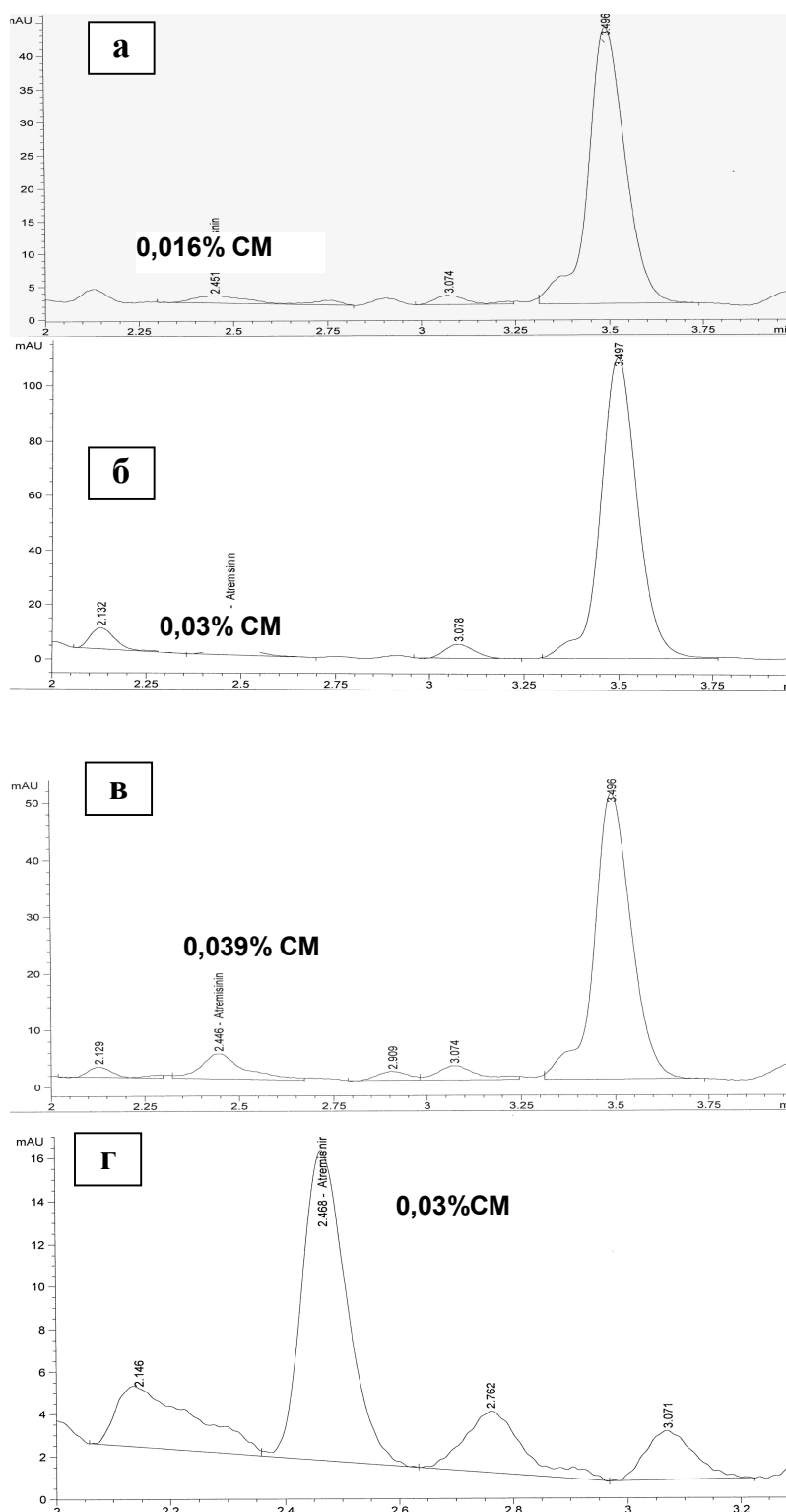


Рис. 6.8 – Хроматографічне визначення вмісту артемізиніну у трансгенних коренях (а, б), коренях (в) та листках (г) культивованих *in vitro* контрольних рослин *A. tlesii*

Відомо, що рослини роду *Artemisia* різних видів синтезують артемізинін, сполуку з протималарійними властивостями. Підвищений інтерес до артемізиніну пов'язаний з його високою ефективністю при лікуванні малярії [795]. Для *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації з метою можливого подальшого отримання ліній з високим вмістом артемізиніну використовували рослини *A. dubia*, *A. indica*, *A. vulgaris*, *A. absinthium*, *A. annua* [461, 556, 562-564]. За літературними даними вміст артемізиніну у коренях *in vivo* культивованих рослин полину різних видів становив: для *A. annua* – близько 0,025, *A. vulgaris* - 0,015, *A. indica*, *A. dracuncululus* та *A. dubia* – 0,01% сухої маси [462]. Разом з тим, вміст артемізиніну у рослинах алеутського полину досі не визначали, оскільки цей вид рослин практично не досліджений. Отримані дані свідчать про те, що у рослинах цього виду також синтезується артемізинін, причому у досить великій кількості, до 0,03% сухої маси. Раніше нами було показано, що отримані лінії трансгенних коренів відрізняються фенотипово, а також за швидкістю росту. Ці лінії також відрізняються і за рівнем накопичення артемізиніну. «Бородаті» корені *A. tilesii* однієї з ліній синтезували артемізинін у кількості, яка не відрізнялася від рівня накопичення сполуки у коренях контрольних рослин.

Нині хімічний синтез артемізиніну є комерційно не вигідним, тому дослідження щодо розроблення системи синтезу спрямовано на отримання з рослин, вирощених у природних умовах, або з біотехнологічних рослин, або з трансгенних мікроорганізмів [796-799, 800-802]. Артемізинін можна отримувати з вирощуваних у польових умовах рослин *A. annua* у кількості 25-74 кг/га [797]. Разом з тим, фактори середовища (склад ґрунту, температура, зволоження тощо) впливають на ріст рослин у польових умовах [798]. Щодо використання мікроорганізмів для продукування антималярійної сполуки, розроблено біотехнологію отримання трансгенних мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* та *Escherichia coli*, які продукують попередників артемізиніну аморфа-4,11-дієн та артемізинову кислоту. Рівень продукування

цільових сполук є достатньо високим. Наприклад, у модифікованих дріжджах *S. cerevisiae* накопичувався аморфа-4,11-дієн у кількості до 40 г/л або до 1,6 г артемізинової кислоти [800, 801]. Разом з тим, за мікробного синтезу не можна отримати кінцевий продукт артемізинін, отже, необхідним є додаткових хімічний досинтез. Тому, незважаючи на значно менший рівень накопичення артемізиніну у трансгенних коренях, використання «бородатих» коренів, за умови отримання ліній, які відрізняються швидким приростом біомаси та високим рівнем накопичення сполуки, може бути ефективним.

### 6.3 Біологічна активність екстрактів з трансгенних коренів лікарських рослин різних видів

6.3.1. Протимікробна активність. Рослини рути духмяної відомі як такі, що синтезують сполуки з протимікробною активністю. Тому саме ці рослини було обрано для визначення впливу генетичної трансформації на наявність/відсутність протимікробної активності у екстрактах з трансгенних коренів. Порівнювали протимікробну активність етанольних та ДМСО екстрактів з трансгенних коренів та контрольних рослин рути. Тестування проводили диск-дифузним методом. У якості тестових використовували бактерії, ізольовані з різних природних біотопів: *Micrococcus luteus* 3201, *Sporosarcina aquimarina* 188n2, *Microbacterium trichothecenolyticum* 3208 (о. Галіндез, Антарктика), *Bacillus simplex* 3s2, *Bacillus mojavensis* 2s1 (Крим, Україна, гіперсолале озеро), *Kocuria carniphila* H7 та *Micrococcus luteus* H8 (пустеля Негев, Ізраїль), *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* 1т3, *Bacillus licheniformis* 7т1 (Мертве море, Ізраїль), *Chryseobacterium shigense* 15A1, *Kocuria* sp. 3A (літоральна зона оз. Байкал, Росія), *Citrobacter freundii* (Сумська обл., Україна), *Arthrobacter oryzae*, *Rhodococcus erythropolis* (Карстова порожнина Мушкарова яма, Україна) [804-808], а також патогенні та умовно патогенні бактерії *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B918 з колекції

Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. Отримані дані свідчать про наявність антимікробної активності як у екстрактів з вихідних рослин рути, культивованих *in vitro*, так і у отриманих «бородатих» коренів (табл. 6.6, рис. 6.9).

Таблиця 6.6-

**Протимікробна активність екстрактів з трансгенних коренів  
рути**

№	Вид	Екстракти або антибіотики*							
		1	2	3	4	Окс	Тет	Гм	Цф
Зона затримки росту, мм									
Ізраїль, Мертве море (гіперсолоні зразки)									
1т3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	15	19	13	15	11	25	17	29
7т1	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	17	17	15	17	0	27	19	27
Україна, Крим (гіперсолоні озера)									
2s1	<i>Bacillus mojavensis</i>	17	17	15	15	0	27	17	27
3s2	<i>Bacillus simplex</i>	19	23	13	13	0	31	27	21
Антарктика, о. Galindez (грунти)									
3201	<i>Micrococcus luteus</i>	29	27	27	23	0	31	21	19
3208	<i>Microbacterium</i> <i>trichothecenolyticum</i>	0	0	0	0	0	19	17	31
Антарктика, о. Galindez (кліф, лишайник)									
188n2	<i>Sporosarcina</i> <i>aquimarina</i>	19	21	19	15	11	35	29	29
Літоральна зона озера Байкал									
3А	<i>Kocuria</i> sp.	17	19	19	15	15	29	27	25
15А1	<i>Chryseobacterium</i> <i>shigense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Грунт пустелі Негев, Ізраїль									
Н7	<i>Kocuria carniphila</i>	27	29	25	29	0	0	0	0
Н8	<i>Micrococcus luteus</i>	37	45	27	35	0	25	17	18
Сумська обл., річка Грунь (болото)									
	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	17	29
Карстова порожнина Мушкарова яма, (глина)									
	<i>Arthrobacter oryzae</i>	37	39	35	35	0	35	13	17
	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i>	15	17	17	15	0	13	25	37

Продовження таблиці 6.6									
		Патогенні							
B918	<i>Staphylococcus aureus</i>	13	15	9	13	32	14	18	26
B906	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	28	11	20	18
* 1, 2 – спиртовий та ДМСО екстракт з трансгенних коренів; 3, 4 – відповідні екстракти з рослин рути; Окс – оксацилін; Тет – тетрациклін; Гм- гентаміцин; Цф - ципрфлоксацин									

Бактерії *Escherichia coli* були нечутливими до усіх досліджуваних екстрактів. Екстракти з «бородатих» коренів і з контрольних рослин пригнічували ріст бактерій *Staphylococcus aureus* (зона відсутності росту до 15мм). Стійкими до дії усіх екстрактів виявилися лише бактерії *Chryseobacterium shigense* і *Citrobacter freundii*. Разом з тим, як екстракти з асептично вирощуваних рослин, так і з трансгенних коренів, виявили активність проти *Micrococcus luteus*, *Sporosarcina aquimarina*, *Bacillus simplex*, *Kocuria carniphila*, *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, причому в деяких випадках активність екстрактів з трансгенних коренів була вищою, ніж активність екстрактів з вихідних рослин.

Наприклад, діаметр зони відсутності росту *Micrococcus luteus* (Негев) при використанні екстракту з трансгенних коренів склав 37 і 45 мм, а при використанні екстрактів з рослин - 26 і 35 мм (відповідно етанольний і ДМСО екстракти). Дуже чутливими до екстрактів були також бактерії *Arthrobacter oryzae*, ізолювані з ґрунту карстової печери Мушкарова яма, діаметр зони відсутності росту становив 37-39 мм та 35 мм відповідно при тестуванні екстрактів з трансгенних коренів та контрольних рослин. Для *Bacillus simplex* ці показники склали відповідно 19 і 23 мм (екстракти з коренів), 13 і 13 мм (екстракти з рослин). Слід відзначити, що для приготування екстрактів з коренів і рослин використовували однакове співвідношення маса зразка / обсяг екстрагента (0,4 г / 1,5 мл).

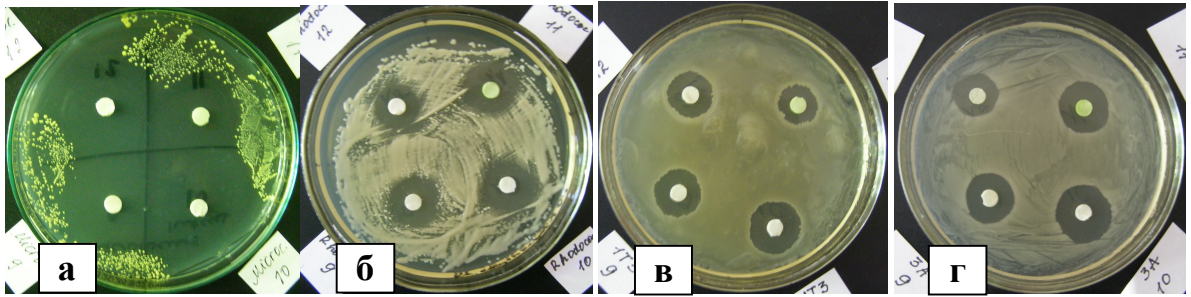


Рис. 6.9 – Визначення протимікробної активності екстрактів з рослин та «бородатих» коренів рути духмяної диск-дифузним методом: **а** – *Micrococcus luteus*, **б** – *Rhodococcus erythropolis*, **в** – *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*, **г** – *Kocuria* sp.

Отже, «бородаті» корені рути духмяної зберігали здатність синтезувати сполуки з антимікробними властивостями, які притаманні рослинам цього виду, причому у ряді випадків (наприклад, при тестуванні на *Micrococcus luteus*) антимікробна активність екстрактів з трансгенних коренів виявилася навіть вищою, ніж у контролі. Отримані дані становлять інтерес, оскільки екстракти з трансгенних коренів рути пригнічували ріст ряду мікроорганізмів, ізольованих з різних біотопів, а також патогенних бактерій *Staphylococcus aureus*. Рослини *R. graveolens* L., багаторічної трав'янистої рослини сімейства Rutaceae, давно відомі наявністю алкалоїдів (0,2-1,4%) і ефірних олій (до 0,7% сухої маси) [626]. Є дані щодо того, що екстракт із рути може бути використаний як антисептичний, інсектицидний засіб [624, 625, 632]. Оскільки екстракти з отриманих методом *Agrobacterium*- опосередкованої трансформації коренів рути духмяної проявили протимікробну активність, «бородаті» корені *R. graveolens* можуть бути джерелом для отримання сполук з антимікробними властивостями.

6.3.2. Антиоксидантна активність екстрактів. Першим етапом було визначення активності рослин, культивованих *in vitro* (табл. 6.8). DPPH-активність варіювала у екстрактах з рослин *A. tilesii*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *B. pilosa*, *C. intybus* у межах 61- 92%.

Екстракти, отримані з трансгенних коренів різної видової приналежності, відрізнялися за здатністю відновлювати DPPH радикал. Рівень активності досліджуваних екстрактів трансгенних клонів коренів одного виду також значно варіював. Так, антиоксидантна активність екстрактів з трансгенних коренів салату коливалася в межах  $28 \pm 2.56$  –  $88 \pm 1.60\%$  і у чотирьох ліній з шести досліджуваних перевищувала АОА екстракту з коренів контрольних рослин. Протирадикальна активність екстрактів з «бородатих» коренів цикорію була досить високою та становила  $42 \pm 12.16$  –  $95 \pm 3.94\%$  у залежності від лінії коренів (рис. 6.10). Активність екстрактів з трьох ліній достовірно не відрізнялася від активності у контролі, у чотирьох лініях – менша за контрольні показники активності.

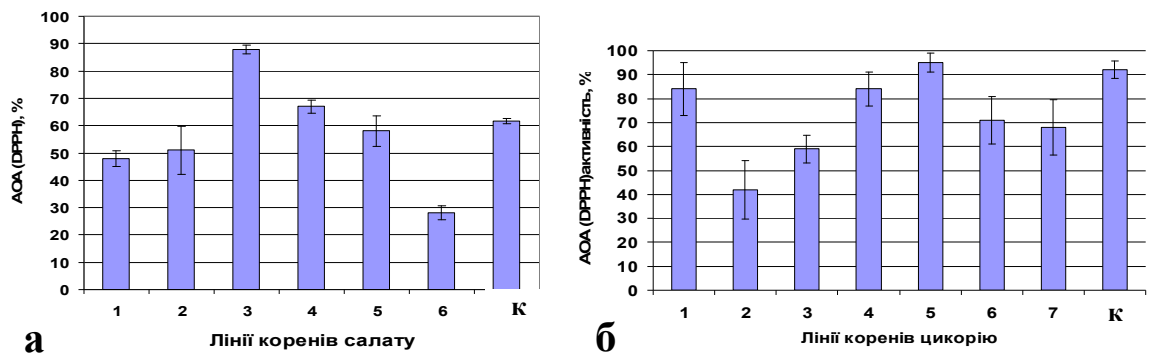


Рисунок 6.10 - Активність екстрактів з трансгенних коренів салату (а) та цикорію (б); К – АОА екстрактів з коренів контрольних рослин

Досліджувана активність екстрактів з трансгенних коренів лікарських рослин не перевищувала DPPH активність екстрактів з контрольних коренів. Так, DPPH активність екстрактів з «бородатих» коренів козельців не відрізнялася від активності екстрактів з коренів контрольних рослин (у трьох лініях), або була меншою за АОА у контролі (у двох лініях) та становила  $37 \pm 5.34$  –  $82 \pm 12.09\%$  (рис. 6.10, а). У екстрактах з трансгенних коренів полину та причепи рівень антиоксидантної активності достовірно не відрізнявся від АОА екстрактів з контрольних коренів та становив відповідно  $68 \pm 10.96$  –  $94 \pm 6.96\%$  і



49±16.00 - 72±10.40%, а у контролі – 82±6.11 та 65±5.60% (рис. 6.10, б, в). Водні екстракти з трансгенних коренів алтеї проявляли DPPH активність у границях 28±4.2 – 81±13.8% . (рис. 6.11, г).

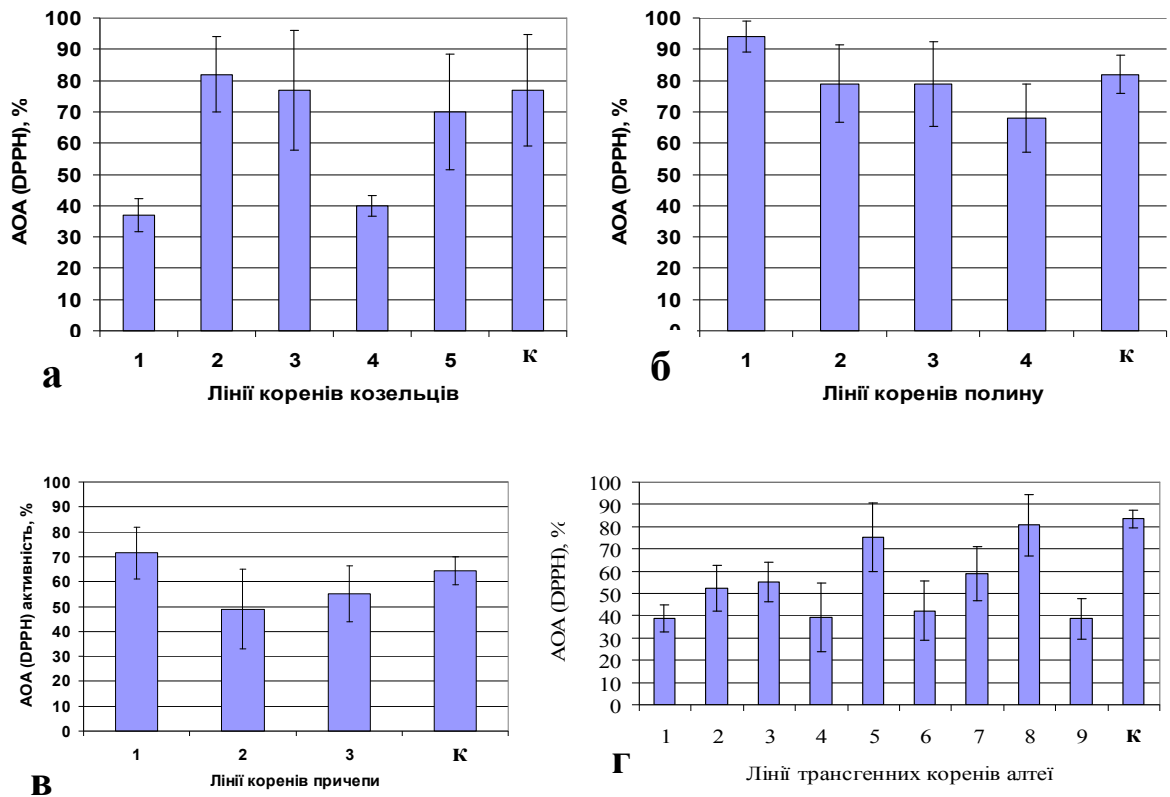


Рисунок 6.11 - Антиоксидантна активність екстрактів з трансгенних коренів козельців (а), полину (б), причепи (в), алтеї (г); К – АOA екстрактів з коренів контрольних рослин

Біологічна роль антиоксидантної системи в організмі пов'язана із захистом геному, мембран та ферментів від активних форм кисню [809]. Система антиоксидантного захисту включає ряд сполук різної хімічної будови, у тому числі низькомолекулярні, які блокують вільні радикали (вітаміни Е та С), а також ферменти (наприклад, супероксиддисмутаза, каталаза) та інші сполуки (у тому числі глутатіон, флавоноїди), які здатні знижувати рівні активних форм кисню [810-812]. Вільні радикали, які містять кисень, у тому числі супероксид радикал, пероксид водню  $H_2O_2$ , гідроксильні радикали є реактивними молекулами, які окислюють сполуки-компоненти клітин, зокрема, ліпіди, білки та ДНК [811-812].

Вони, як правило, знаходяться у балансі зі сполуками з антиоксидантними властивостями, які є системою захисту організму від окисного ушкодження. Дисбаланс між наявними вільними радикалами та активність системи антиоксидантного захисту призводить до виникнення оксидативного стресу, який, у свою чергу, може викликати пошкодження ДНК та провокувати розвиток захворювань, в тому числі онкологічних [812]. Антиоксиданти допомагають підтримувати більш низькі рівні наявності вільних радикалів і, таким чином, відіграють захисну роль у клітинах [813]. Сполуки з антиоксидантними властивостями використовуються у лікарських формах для захисту організму від оксидативного стресу та для нейтралізації вільних радикалів. Є синтетичні сполуки з антиоксидантними властивостями, але їх використання не завжди безпечне – вони є токсичними для клітин печінки та можуть виявляти мутагенний ефект. Тому на часі стає пошук більш безпечних природних антиоксидантів рослинного походження, тобто сполук, які природно синтезуються у рослинах. Рослини є природним джерелом біологічно активних сполук, у тому числі з антиоксидантною властивістю, що дозволяє використовувати їх для профілактики захворювань, які викликаються збоями у системі антиоксидантного захисту організму [814, 815]. Існують рослини, як їстівні, так і лікарські, які мають підвищений вміст сполук з антиоксидантними властивостями [817-821]. Разом з тим, використання біотехнологічних методів дозволяє у ряді випадків підвищити рівень накопичення у клітинах рослин сполук з цінними лікувальними властивостями, зокрема, антиоксидантів. Це відбувається як наслідок генетичної трансформації, яку рослинний організм сприймає як стресовий фактор та реагує зміною біохімічних та фізіологічних реакцій. Рівень антиоксидантної активності може бути показником ступеню дії стресових факторів на рослини, за яким можна оцінити інтенсивність дії таких факторів, у тому числі, генетичної трансформації як стресового фактору.

Отримано дані стосовно того, що перенесення чужорідного гена (трансгенез) до геному рослин є біотичним стресовим фактором [822]. Відповідь рослин на дію стресорів проявляється у зміні фізіологічних та біохімічних параметрів, зокрема, кількості білка, запасних речовин, вмісті фотосинтетичних пігментів та їх співвідношенні, активності антиоксидантної системи, в тому числі ферментів – супероксиддисмутази, пероксидази та ін. [402, 823- 825].

У рослин після дії стресових факторів, може підвищуватися рівень накопичення цінних сполук [825, 826]. Аналогічний ефект справляє і генетична трансформація як біотичний стрес. Так, раніше нами було показано відмінності у активності пероксидази та супероксиддисмутази у трансгенних рослинах цикорію, отриманих шляхом трансформування з використанням *Agrobacterium tumefaciens* [827]. Підвищення рівня накопичення сполук з антиоксидантною протирадикальною активністю у трансгенних рослинах є позитивним моментом для практичного використання цих рослин як джерело антиоксидантів.

У наших дослідження використовували їстівні та лікарські рослини, які відомі як джерело сполук з антиоксидантними властивостями. Так, екстракти з рослин *B.pilosa* містять антиоксиданти – флавоноїди та поліфеноли [828, 829], зокрема, екстракти з рослин цього виду захищали еритроцити від оксидативного пошкодження [830]. Рослини козельців також синтезують сполуки з антиоксидантними властивостями [831-833].

Широко використовувані як салатні культури рослини *Lactuca sativa* та *Cichorium intybus* також мають антиоксидантні властивості [834-839]. Наприклад, було визначено наявність антиоксидантів в рослинах *L. sativa*, а також можливість підвищення антиоксидантних властивостей шляхом термічної обробки при 80°C і, таким чином, температурного інгібування поліфенолоксидази [837]. Цикорій салатних сортів, особливо забарвлених, визнано як джерело антиоксидантів - антоціанів та поліфенолів [838]. У моделі *in vivo* при використанні екстрактів цикорію виявлено дозозалежне

підвищення активності каталази, супероксиддисмутази та глутатіон-S-трансферази [839].

Рослини алтеї накопичують сполуки з антиоксидантними властивостями, оскільки вони містять поліцукри, альфа-токоферол, флавоноїди з протекторними властивостями [540, 841]. Так, водний екстракт з алтеї виявляв протирадикальну активність, демонстрував до 96.4% інгібування перокислення лінолевої кислоти [841]. Рослини *A. tilesii* досі практично не досліджені. Разом з тим відомо, що у рослин роду *Artemisia* синтезуються біологічно активні сполук, зокрема, алкалоїди, флавоноїди та поліфеноли, а екстракти з цих рослин мають антиоксидантні властивості [842-845].

У проведених нами дослідженнях визначено, що генетична трансформація тільки у декількох випадках призводила до підвищення рівня антиоксидантної DPPH активності екстрактів з трансгенних коренів. Наприклад, у двох ліній «бородатих» коренів *L. sativa* DPPH активність була вищою за активність екстрактів з коренів контрольних рослин. Активність екстрактів з трансгенних коренів цикорію і козельців також залежала від лінії досліджуваних коренів. Вона або не відрізнялася від активності у контролі, або була нижчою за активність екстрактів з коренів контрольних рослин. Екстракти з трансгенних коренів *A. tilesii* та *B. pilosa* за рівнем DPPH активності не відрізнялися від контролю. Отже, генетична трансформація у ряді випадків призвела до зміни (підвищення або зниження) рівня антиоксидантної протирадикальної активності, що є свідченням впливу трансформування та перенесення чужорідних генів до рослин. Слід відзначити, що такі зміни не є детерміновані перенесеними генами, оскільки не виявлено залежності від того, які агробактерії (дикого типу або такі, що несли вектори з генами *ifn- $\alpha$ 2b* або *esxA*), було використано для трансформування, а також від використаного для трансформації вектора (відрізнялися, зокрема, промоторами гена *ifn- $\alpha$ 2b*). Отже, отримані дані щодо відмінностей у рівні антиоксидантної

протирадикальної активності є результатом саме процесу трансформації та наявності чужорідних генів, а відмінності у рівні АОА екстрактів з різних ліній коренів, очевидно, є наслідком неконтрольованості місця вбудовування трансгенів. Отримання ліній «бородатих» коренів салату та алтеї з підвищеним рівнем протирадикальної активності свідчить про можливість підвищення природного рівня АОА у рослин після генетичної трансформації, а такі рослини/корені є джерелом природних антиоксидантів рослинного походження.

6.3.3. УФ-протекторна активність. Вивчаючи УФ-протекторну активність екстрактів з трансгенних рослин та коренів цикорію, мотивувалися наявними даними щодо УФ-протекторної активності екстрактів з рослин *Cichorium endivia*. Зокрема, Enk зі співавторами [846] було визначено, що екстракти з рослин цього виду попереджували УФ-індуковану появу піримідинових димерів та експресію мРНК IL-6 у культивованих кератиноцитах людини. Метою наших досліджень було визначення наявності УФ-протекторної активності у екстрактів з рослин цикорію, близького до *C. endivia* виду, та порівняння з відповідною активністю екстрактів з трансгенних рослин та «бородатих» коренів з метою визначення впливу генетичної трансформації на відповідну активність.

При визначенні можливої протекторної активності екстрактів з трансгенних коренів використовували у якості моделі «бородаті» корені та трансгенні рослини цикорію (рис. 6.12). Тестування на ізольованих лімфоцитах людини проводили методом кометного електрофорезу, який дозволяє аналізувати рівень пошкоджень молекул ДНК на рівні окремих клітин [847]. Дію стресового фактору моделювали, опромінюючи клітини УФ променями, 40 Дж/м<sup>2</sup> (довжина хвилі 280 нм). При дії УФ на молекулу ДНК відбувається утворення тимінових димерів та можлива одночасна активація фотоліази, яка повинна забезпечувати репарацію. Тимінові

димери виникають унаслідок взаємодії між собою в одному ланцюгу ДНК сусідніх тимінових залишків з утворенням ковалентної зшивки.

Було визначено, що у позитивному контролі (без опромінення клітин, без обробки їх екстрактом) відсоток ДНК у хвості комети становив 6,0-9,8%. У негативному контролі без додавання екстрактів та з УФ-опроміненням відсоток ДНК становив 13,7 – 16%, що свідчить про наявність індукції розривів, тобто про ефективний вплив УФ-опромінення (табл. 6.7, рис. 6.13, 6.14).



Рисунок 6.12– «Бородаті» корені цикорію, які були використані для приготування екстрактів для тестування ДНК-протекторної активності

В оброблених екстрактом і опромінених клітинах відсоток ДНК у хвості комети становив 3,4-4,0% при додаванні 200 мкл екстракту до живильного середовища. Отримані результати вказують на те, що використані екстракти виявляли захисні властивості, знижуючи ступінь пошкодження ДНК в опромінених ультрафіолетом клітинах у 3,6-4 рази. Слід відзначити, що не було достовірних відмінностей при використанні екстрактів з трансгенних та контрольних коренів. Попереднє інкубування екстрактів при температурі +60°C не призводило до достовірних відмінностей у отриманих результатах щодо відсотку ДНК у хвості комет. Таким чином, можна визначити, що у захисті клітин від пошкоджуючої дії ультрафіолетового опромінення беруть участь сполуки небілкової природи.

Можливо, такий ефект обробки рослинним екстрактом пов'язаний з антиоксидантними властивостями фруктозовмісних цукрів, виявлених раніше [848], а також з участю фруктанів у регуляції генів, що активуються

у відповідь на оксидативний стрес [478]. Оскільки екстракт, підданий температурній обробці, не мав містити фізіологічно активних білків, можна припустити, що небілкові сполуки, флавоноїди або фруктани, виконували роль УФ-протектора. Такі припущення узгоджуються із даними ізраїльських дослідників [846], які визначили наявність УФ-протекторних властивостей у екстракту з рослин *C. endivia*, рослини, які у природних умовах, так само як і *C. intybus*, накопичують значну кількість фруктанів.

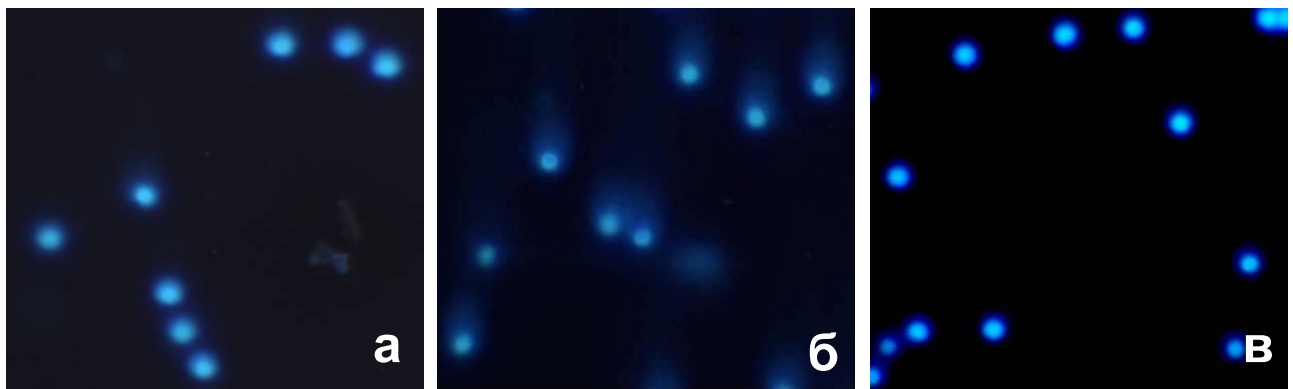


Рисунок 6.13 – Результати кометного електрофорезу: **а** – контроль без УФ-опромінення; **б** – УФ-опромінення, без обробки екстрактом; **в** – УФ-опромінення, обробка екстрактом

Табл. 6.7–

### Відсоток ДНК у хвості комет при дослідженні дії екстрактів

#### *Cichorium intybus*

№	Варіант експерименту	% ДНК у хвості комет при використанні екстрактів зі зразків*		
		1	2	3
1	Без опромінення	7,6±2,3%	9,8±2,6%	6,0±2,1%,
2	УФ опромінення	16±3%	13,7±3,2%	13,9±4,1%
3	УФ опромінення + 100 екстракт	10,0±2%,	7,1±2,5%	5,2±1,0%
4	УФ опромінення + 200 екстракт	4,0±1,0%.	3,4±0,8%.	3,8±1,0%.

\* 1 – корені контрольних рослин, 2, 3 – «бородаті» корені

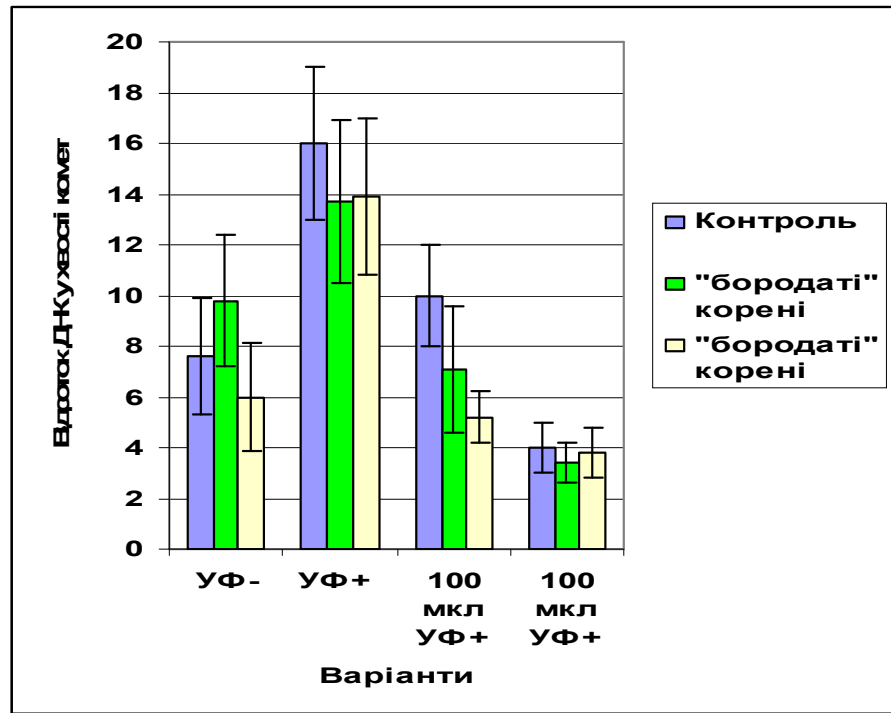


Рис. 6.14 – Порівняння частки ДНК у хвостах комет, детектовані при кометному електрофорезі лімфоцитів, підданих УФ-опроміненню та оброблених екстрактом з коренів цикорію

Отже, короткочасне, протягом 30 хв, інкубування лімфоцитів периферійної крові з екстрактами рослин *C. intybus* призводило до значного зниження пошкоджуючої клітини дії УФ опромінення, що визначалося в зменшенні відсотка ДНК, детектованого у хвості комет при кометному електрофорезі.

Не виявлено достовірних відмінностей у відсотку ДНК у хвості комет при використанні контрольних та трансгенних рослин. Отже, у рослинах цикорію є сполуки, які здатні захищати клітини від пошкоджувальної дії ультрафіолетових променів, а у трансгенних коренях зберігається ця природна здатність.

Отримані нами дані щодо наявності УФ-протекторної активності екстрактів з трансгенних та контрольних зразків цикорію узгоджуються з даними Enk зі співавторами [846], які проводили експерименті на рослинах іншого виду роду *Cichorium*. Виявлення такої активності свідчить про те,



що екстракти рослин цикорію, зокрема, з культури «бородатих» коренів, можуть бути використані як УФ-протектори в косметології та медицині.

Отже, було досліджено можливість накопичення у трансгенних коренях біологічно активних сполук, властивих для певного виду рослин, а також можливість синтезування рекомбінантних білків та наявність біологічної активності у екстрактів з трансформованих ліній. Підсумовуючи отримані результати, можна визначити, що створені трансгенні корені або рослини синтезували як природні для рослин сполуки, зокрема, фруктани та артемізинін [654, 850, 851], так і рекомбінантні білки відповідно до перенесених генів (інтерферон або антигени мікобактерій [668, 849, 854]).

Вміст природних біологічно активних сполук коливався у значних межах у різних трансгенних лініях та міг бути як вищим, так і дещо меншим, ніж у контролі. Визначено, що екстракти з трансгенних ліній виявляли біологічну активність, порівняну з активністю екстрактів з контрольних рослин, або навіть вищу, ніж у контролі [668, 827, 852]. Такий феномен підвищення рівня біологічної активності (наприклад, антимікробної активності екстрактів з трансгенних коренів рути духмяної [853]) може бути використаних для відбору зразків з підвищеною продукцією біологічно активних сполук. Трансгенні корені або рослини також накопичували рекомбінантний інтерферон, причому активність екстрактів (визначена як інтерфероноподібна активність проти вірусу везикулярного стоматиту) мала значну варіабельність як міжвидову, так і між окремими лініями коренів одного виду [668, 729, 768, 849]. Рівень такої активності у обраних лініях був достатньо високим та сягав 98000 МО/г маси.

Таким чином, доведено, що отримані трансгенні лінії здатні синтезувати рекомбінантні білки, при цьому не втрачаючи здатність

накопичувати природні для того чи іншого виду біологічно активні сполуки.

Особливий інтерес становить створення культури «бородатих» коренів, оскільки такі корені можуть вирощуватися у біореакторах. При цьому контрольованими є параметри культивування (температура, склад живильного середовища) та вихід синтезованих у коренях сполук.

Прикладом практичного використання біотехнологічних коренів є практика компанії «Rootec», яка пропонує як джерело біологічно активних сполук (атропін, антиоксиданти, анабазин, УФ-протекторні сполуки, камфотецин, кумарини, алкалоїди та ін.) культивовані *in vitro* корені таких видів рослин як *Atropa belladonna*, *Carlina acaulis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Ophiorrhiza mungos*, *Pelargonium reniforme*, *Solanum dulcamara* та ін. (<http://www.rootec.com/en/products/health>).

Отримані нами культури «бородатих» коренів рослин різних видів, у тому числі лікарських, які відрізняються підвищеним рівнем синтезу біологічно активних сполук, можуть також бути використані при їх вирощуванні у біореакторах як джерело цінних БАС з широким спектром активності (протівірусна, антимікробна, антиоксидантна тощо).

**РОЗДІЛ 7**  
**СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЇ ТРАНСФОРМОВАНИХ РОСЛИН І**  
**КОРЕНІВ ЛІКАРСЬКИХ ТА ЇСТИВНИХ КУЛЬТУР**

Результатом проведеної роботи з генетичної трансформації рослин стало створення колекції трансформованих рослин та «бородатих» коренів. У колекції є трансгенні рослини п'яти видів, *Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Tragopogon porrifolius*, *Ruta graveolens*, *Lemna minor*, а також також «бородаті» корені рослин семи видів – *Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Tragopogon porrifolius*, *Artemisia tilesii*, *Bidens pilosa*, *Althaea officinalis*, *Ruta graveolens* (табл. 7.1).

Таблиця 7.1 –

**Видовий та кількісний склад колекційних зразків трансгенних**  
**рослин та наявність перенесених генів**

№ п/п	Вид рослин	Трансформація	Перенесені гени	Зразок	Кількість зразків
1	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	2
2	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>nptII</i> , <i>esxA</i>	«Бородаті» корені	2
3	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>ifn-α2b</i> , <i>nptII</i>	«Бородаті» корені	10
4	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	Рослини	2
5	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>nptII</i> , <i>esxA</i>	Рослини	2
6	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>ifn-α2b</i> , <i>nptII</i>	Рослини	10
7	<i>Cichorium intybus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i> , <i>esxA</i>	Рослини	4
8	<i>Lactuca sativa</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	2
9	<i>Lactuca sativa</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>ifn-α2b</i> , <i>nptII</i>	«Бородаті» корені	10
10	<i>Lactuca sativa</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i> , <i>ifn-α2b</i> , <i>nptII</i>	Рослини	2

Продовження таблиці 7.1					
11	<i>Lactuca sativa</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ifn-α2b</i>	Рослини	2
12	<i>Tragopogon porrifolius</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB, ifn-α2b nptII</i>	Рослини	2
13	<i>Tragopogon porrifolius</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB, ifn-α2b nptII</i>	«Бородаті» корені	2
14	<i>Tragopogon porrifolius</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	5
15	<i>Artemisia tilesii</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB, ifn-α2b nptII</i>	«Бородаті» корені	8
16	<i>Bidens pilosa</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB, ifn-α2b nptII</i>	«Бородаті» корені	6
	<i>Bidens pilosa</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	2
17	<i>Althaea officinalis</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB, ifn-α2b nptII</i>	«Бородаті» корені	13
18	<i>Althaea officinalis</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	5
19	<i>Ruta graveolens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	«Бородаті» корені	2
20	<i>Ruta graveolens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	Рослини	2
21	<i>Lemna minor</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>nptII, esxA</i>	Рослини	1

Колекція нараховує 96 зразків, у тому числі 27 ліній трансгенних рослин та 69 ліній «бородатих» коренів.

Визначено, що екстракти з колекційних зразків виявляють:

- УФ-протекторну (*C. intybus*),
- антимікробну (*R. graveolens*),
- противірусну (*C. intybus*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *L. sativa*, *A. tilesii*) біологічну активність.

Наявність такої активності дає підстави вважати отримані колекційні зразки потенційним джерелом цінних біологічно активних сполук, що можуть бути використані у медицині, ветеринарії та косметології.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Важливим етапом біотехнологій отримання трансгенних рослин та культури «бородатих» коренів є створення ефективної системи генетичної трансформації. Наявність ефективної методики дозволяє скорочувати час, необхідний для створення трансгенних ліній, а також отримувати більшу кількість рослин або кореневих ліній.

У результаті досліджень нами було оптимізовано методику генетичної трансформації рослин, яка може бути застосована для трансформування з використанням як *A. rhizogenes*, так і *A. tumefaciens* рослин різних видів. Доведено, що оптимальними умовами трансформації, які дають можливість ефективно отримати трансформовані рослини або «бородаті» корені, є такі: культивування протягом трьох діб на живильному середовищі без антибіотиків; на четверту добу додавання до середовища цефотаксиму; ще через добу – додавання селективного антибіотика. Використання такої оптимізованої схеми трансформації дозволило отримати зелені у селективних умовах рослини з частотою до 100% (за виключенням трансформування рослин рути та ряски). За використання оптимізованої методики з високою частотою було створено трансгенні рослини та «бородаті» корені цикорію та салату, причому не спостерігали утворення нетрансформованих (білих, чутливих до канаміцину) рослин, що свідчить про ефективність відбору трансформованих ліній [663, 666, 667, 726].

Низька частота генетичної трансформації рути та ряски пов'язана з фізіологічними особливостями рослин цих видів – наявністю протимікробної активності у рослин рути духмяної та невразливості рослин ряски, що належить до класу однодольних, до ураження агробактеріями. Разом з тим, доведено принципову можливість отримання трансгенних рослин цих видів за використання запропонованої методики.

Отже, проведеними дослідженнями щодо генетичної трансформації ряду їстівних та лікарських видів рослин визначено, що метод

*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації може бути успішно застосований для отримання трансгенних рослин та культури «бородатих» коренів. Так, отримано трансгенні рослини *C. intybus* з селективним геном *nptII* та цільовим геном антигена *Mycobacterium tuberculosis*, а також культури трансгенних коренів з використанням бактерій *A. rhizogenes* A4 з генами *esxA*, *ifn-a2b* та з використанням дикого агропінового штаму *A. rhizogenes* A4. Створено трансгенні рослини (трансформація *A. tumefaciens*) та «бородаті» корені (трансформація *A. rhizogenes*) *Lactuca sativa* з цільовим геном *ifn-a2b* з частотою трансформації до 83%; культури трансгенних коренів *A. officinalis*, *B. pilosa*, *A. tilesii* з геном *ifn-a2b* з частотою трансформації відповідно до 100%, 84% та 100% [729, 730, 733].

Підтверджено, що усі аналізовані рослини мали перенесені гени. Отже, оптимізована методика дозволяє в умовах селекції отримати саме такі рослини або корені, які дійсно мають перенесені гени. Однак, у ряді біотехнологічних ліній спостерігали явище «мовчання» цільового гена, зокрема, у 37,5% аналізованих ліній цикорію. Разом з тим, у біотехнологічних лініях *L. sativa* «мовчання» цільового гена не виявлено. Незважаючи на наявність у декількох ліній «мовчання» цільового гена (що зустрічається досить часто при трансформуванні ядерної ДНК), застосування запропонованої методики є достатньо ефективним, оскільки дозволило отримати рослини/корені, які мають цільовий ген, що транскрибується.

Запропонована оптимізована методика трансформації була застосована також для трансформації рослин класу однодольних, які раніше не трансформували з використанням *A. rhizogenes* через невразливість рослин цього виду. Методом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* уперше створено трансгенні рослини ряски *L. minor*, причому формування трансгенних рослин відбувалося шляхом прямої регенерації з пазушних меристем без стадій утворення «бородатих коренів» та калюсу [702]. Запропонований спосіб трансформації рослин

ряски та пряме отримання рослин при трансформуванні *A. rhizogenes* дозволяє значно скоротити час отримання трансгенних рослин та створювати трансформовані рослини ряски з генами, що становлять практичний інтерес.

Метод *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації нами вперше використано для отримання культури трансгенних коренів лікарських рослин *A. tilesii*, *T. porrifolius*, *B. pilosa* [730, 733], причому частота коренеутворення була високою та становила відповідно до 100%, 59.4% та 84%. Методом ПЛР загальної ДНК було підтверджено наявність селективного та цільового генів. Отримані дані свідчать про те, що бактерії *A. rhizogenes* можуть бути використані з високою ефективністю для перенесення до рослин названих видів генів інтересу.

Незважаючи на те, що екстракти з рути духмяної пригнічували ріст агробактерій, шляхом подовження терміну кокультивування експлантів з суспензією агробактерій до 6-8 діб було отримано «бородаті» корені. Таким чином, запропонована методика трансформування, модифікована зміною терміну кокультивування з агробактеріями, може бути застосована і для трансформації рослин, що мають протимікробну активність.

Дослідженнями визначено можливість та особливості регенерації пагонів з «бородатих» коренів рослин салату, цикорію, козельців та рути. Формування пагонів на біотехнологічних коренях цикорію, козельців та рути відбувалося спонтанно в умовах освітлення та не вимагало наявності регуляторів росту у живильному середовищі. У той же час, регенерація пагонів салату з культури біотехнологічних коренів виявилася гормонозалежною та вимагала додавання до живильного середовища регуляторів росту кінетину та НОК. Дослідженнями регенованих пагонів визначено наявність у аналізованих зразках перенесених генів, так само як і у вихідних коренях. Отже, метод *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації може бути використаний не тільки для отримання культури

«бородатих» коренів рослин *L. sativa*, *C. intybus*, *R. graveolens* та *T. porrifolius*, але також і для створення трансгенних рослин цих видів.

Отже, метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації був ефективно використаний для отримання біотехнологічних рослин та культури «бородатих» рослин ряду лікарських та їстівних культур – *L. minor*, *C. intybus*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*. Оптимізація методики трансформації дозволила отримати трансформовані лінії кожного з досліджуваних видів рослин з високою ефективністю (наприклад, для рослин цикорію, салату, алтеї, причепи, полину) або визначити умови для отримання трансгенних коренів рослин, які мають антимікробні властивості (рута). Також уперше показано можливість прямого отримання трансгенних рослин *L. minor* з використанням бактерій *A. rhizogenes*. Уперше здійснено трансформацію рослин *B. pilosa*, *A. tilesii* та отримано ряд ліній «бородатих» коренів. Продемонстровано, що при використанні оптимізованої методики можна не тільки з високою частотою отримати трансгенні корені з бактеріальними *rol* генами, але й перенести до рослин різних видів гени, які кодують синтез білків медичного призначення. Так, ген *ifn- $\alpha$ 2b* людини було вперше перенесено до рослин цикорію, салату, козельців, полину, алтеї, причепи, гени антигенів мікобактерій – до рослин цикорію та ряски. Результатом роботи є колекція досі відсутніх трансгенних рослин та коренів їстівних та лікарських рослин, які мають гени інтерферону- $\alpha$ 2b людини або гени *esxA* та *fbpB* антигенів *M. tuberculosis* та які є джерелом біологічно активних сполук.

Визначено ряд особливостей впливу генетичної трансформації на фенотипові та фізіологічні ознаки трансгенних коренів рослин, які належать до різних видів трьох родин (Compositae, Rutaceae, Malvaceae). Вони виражалися у лінієспецифічних особливостях росту «бородатих» коренів (швидкість росту, ступінь галуження, довжина кореневих волосків), появі неспецифічного забарвлення, регенерації пагонів,



індукованій регуляторами росту або спонтанній. Такі особливості були характерні для усіх досліджуваних рослин незалежно від виду. Використання різних векторних конструкцій та перенесення різних генів (цільових, селективних та генів агробактерій) для трансформування призвело до однакового впливу на рослини та процес формування «бородатих» коренів рослин досліджуваних видів. Отже, виявлені фенотипові та фізіологічні особливості у першу чергу залежали від наявності саме генів агробактерій та не залежали від того, які гени додатково були перенесені при трансформації до рослин. Разом з тим, виявлено і видоспецифічність фенотипових особливостей отриманих «бородатих» коренів, що, вірогідно, пов'язано з характерними рисами рослин того чи іншого видів. Наприклад, значне потовщення трансгенних коренів рослин козельців співвідноситься з характерними рисами, які притаманні кореням рослин цього виду, а дуже швидка регенерація пагонів з трансгенних коренів цикорію пов'язана з особливістю цього виду формувати нові рослини з кореневища.

Отримані «бородаті» корені усіх видів рослин мали характерні риси –галуження, негативний геотропізм, гормонезалежний ріст. Однак, виявлено і фенотипові особливості, зокрема, ступінь галуження, опушеність та товщина коренів, їх забарвлення, фізіологічні особливості – різна швидкість росту, здатність до спонтанної або індукованої регенерації. Відмінності між лініями отриманих коренів виявлялися у швидкості росту (для усіх видів рослин); товщині коренів (особливо для козельців, алтеї); значної опушеності (у полину); ступені галуження (невисокий у козельців); наявності специфічного забарвлення коренів (причепа); позеленінні при вирощуванні в умовах освітлення (алтея); неявно вираженому негативному геотропізмі (козельці); спонтанній (цикорій, козельці, рута) або індукованій (салат) регенерації пагонів; відсутності регенерації при вирощуванні на живильних середовищах з додаванням регуляторів росту для алтеї, причепи, полину. Трансгенні

корені усіх досліджуваних видів рослин та усіх ліній зберігали свій характерний фенотип та мали перенесені гени при тривалому (до п'яти років) культивування *in vitro*.

Важливим завданням, яке ставилося, було дослідження можливості одночасного синтезування у трансгенних лікарських рослинах ряду видів рекомбінантних та природних сполук, можливість підвищення рівня накопичення останніх у трансгенних рослинах, а також дослідження того, чи є видові особливості у накопиченні та біологічні активності рекомбінантних білків. Створення трансгенних рослин/коренів, які одночасно здатні синтезувати декілька біологічно активних сполук, у тому числі рекомбінантних, дає можливість отримувати ці сполуки, синтезовані у рослинних клітинах, а відбір найбільш продуктивних ліній – підвищувати ефективність та технологічність отримання БАС.

Ми використовували створені трансгенні корені як модель для дослідження впливу перенесених генів на синтез природно синтезованих у рослинах досліджуваних видів БАС: фруктозовмісних поліцукрів з широким спектром лікувальних властивостей; рівень антиоксидантної активності; на синтез вторинних метаболітів на прикладі артемізиніну. Визначено особливості накопичення рекомбінантного інтерферону у лініях різних видів, отриманих після трансформування, рівень противірусної активності екстрактів з трансгенних ліній рослин досліджуваних видів [778-782], а також можливість накопичення у біотехнологічних рослинах антигенів мікобактерій. Створені трансгенні рослини *L. minor*, що несли гени *esxA::fbpB* мікобактерій, дійсно синтезували рекомбінантний білок-аналог секреторних білків ESAT6 та AG85B *Mycobacterium tuberculosis* у кількості 0,4-0,5 мкг на 1 грам сирової маси. Зберігання ліофілізованих рослин протягом 1,5 років не призводило до повної деградації досліджуваних білків, хоча вміст цих білків знижувався порівняно з вмістом у культивованих *in vitro* рослинах. Таким чином, рослини *L. minor*

можуть бути запропоновані як об'єкт генетичної інженерії для створення рослин-продуцентів антигенів, у тому числі антигенів мікобактерій.

Доведено, що рослини *C. intybus*, *A. officinalis*, *T. porrifolius*, *A. tilesii*, *L. sativa*, які мають перенесений ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини, можуть синтезувати рекомбінантний інтерферон (до 2766,66 пг/г маси, «бородаті» корені *A. officinalis*), причому виявлено видо- та лінієспецифічні відмінності у рівні накопичення сполуки [668, 729, 850]. Вміст інтерферону був органоспецифічним у тих рослин, які було трансформовано геном *ifn- $\alpha 2b$*  під контролем коренеспецифічного промотору МII, оскільки сполуку детектовано у екстрактах з біотехнологічних коренів та вона була майже відсутня у екстрактах з регенерованих пагонів. Необхідно відзначити також, що рівень накопичення інтерферону не мав органоспецифічності у зразках, отриманих трансформацією вектором з геном *ifn- $\alpha 2b$*  під контролем конститутивного 35S промотора.

Раніше [298, 299, 304, 377-379] було показано, що інтерферон- $\alpha 2b$  людини не тільки може синтезуватися в рослинних клітинах, але й має відповідну біологічну активність. Детектована у отриманих нами біотехнологічних коренях кількість інтерферону є невеликою порівняно з рівнем накопичення сполуки після транз'єнтної експресії або після трансформування хлоропластної ДНК. Разом з тим, експериментальні дані підтверджують біологічну (протівірусну) активність інтерферону, синтезованого у рослинній системі, а саме у використаних в експериментах лікарських та їстівних рослинах. Наприклад, екстракти з трансгенних коренів салату при тестуванні на клітинах MDBK виявили активність в межах 595...14062 МО/г сирової маси рослин або 132...11545 МО/мг загального розчинного білка. Висока протівірусна активність виявлена у екстрактах з трансгенних коренів *A. tilesii* (до 98437 МО/г маси або 28065,89 МО/мг ЗРБ), *A. officinalis* (до 40760 МО/г маси або 12453,44 МО/мг ЗРБ). Виявлені відмінності рівня активності екстрактів з різних

ліній одного виду рослин, вірогідно, є наслідком вбудовування перенесених генів до різних локусів, що може призводити до зміни їх активності, а також активності інших генів через наявність перенесених чужорідних генів та самої трансформації як стресового фактору. Отримані результати [849] дали можливість відібрати лінії, що відрізнялися високою противірусною активністю, зокрема, «бородаті» корені *A.tilesii* з активністю до 98437 МО/г маси, що перевищує наявні у літературі дані щодо противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин різних видів, *A.officinalis* з активністю 40760 МО/г маси, *L.sativa* – 14062 МО/г маси, що є співставним з найкращими результатами, отриманими при визначенні противірусної активності трансгенних рослин інших видів. Результати експериментів дають підстави стверджувати, що досліджувані рослини є ефективною біотехнологічною системою та можуть бути використані для синтезування біологічно активного рекомбінантного інтерферону.

Результатами досліджень підтверджено припущення щодо того, що створені трансформовані рослини/корені здатні синтезувати не тільки рекомбінантні білки, але й сполуки, притаманні досліджуваним видам. Зокрема, визначено, що у трансгенних лініях накопичуються фруктозовмісні цукри [765-767, 850, 851], запасна сполука артемізинін [769], антиоксиданти [768, 852], сполуки з антимикробними властивостями [853]. Відмічено варіабельність вмісту цукрів у біотехнологічних лініях. Так, у 33% досліджуваних трансгенних лініях коренів вміст фруктанів перевищував вміст цих сполук у контролі, у 37% був на рівні вмісту у контролі, у 30% був меншим, ніж у коренях контрольних рослин. У 100% ліній коренів *T. porrifolius*, 37.5% ліній *C. intybus*, 50% ліній *L. sativa* вміст фруктанів підвищувався у порівнянні з контролем. У трансгенних коренях *T. porrifolius* вміст фруктанів був вищим до 4.2 разів, *L. sativa* – до 2.4 разів, *C. intybus* до 2.8 рази у порівнянні з вмістом у коренях контрольних рослин. Оскільки у експериментах з трансформації не

використовували гени, які можуть безпосередньо впливати на синтез фруктанів, відмінності у концентрацій цих сполук у лініях «бородатих» коренів одного виду рослин можна пояснити змінами експресії генів синтезу у результаті вбудовування у геном чужерідних генів.

Визначено, що використання у якості стимуляторів росту препаратів природного походження «Чаркор» та «Біолан», розроблених ДП МНТЦ «Агробіотех» дозволяє прискорити ріст «бородатих» коренів та збільшити загальний вміст фруктанів [766]. Аналогічний ефект щодо росту біотехнологічних коренів спричинювали НОК та ІМК. Отже, ці сполуки також можуть бути використані для інтенсифікації росту отриманих культур «бородатих» коренів.

Рівень АОА екстрактів з трансгенних коренів варіював у різних лініях трансгенних коренів. Так, АОА салату коливалася у межах  $28 \pm 2,56$  –  $88 \pm 1,60\%$  і у чотирьох лінії з шести досліджуваних перевищувала АОА екстракту з коренів контрольних рослин. У трансгенних коренях відбувався також синтез сполук з протимікробною активністю. Тестування проводили з використанням рослин рути, яка відома за наявністю такої активності. Доведено, що антимікробна активність етанольних та ДМСО екстрактів з трансгенних коренів *R. graveolens* була навіть вищою, ніж у екстрактах з контрольних рослин [853].

Отже, отримані трансгенні корені лікарських та їстівних рослин – причепи, полину, рути, алтеї, козельців, салату та цикорію – зберігали свої природні властивості, зокрема, синтезували запасні цукри, вторинні метаболіти, сполуки з антиоксидантними та протимікробними властивостями. Одночасно у клітинах «бородатих» коренів синтезувалися і рекомбінантні сполуки, кодовані наявністю перенесених при генетичній трансформації генів. Таким чином, створені трансгенні рослини та корені можуть бути використані одночасно як джерело природних та рекомбінантних біологічно активних сполук.

Базуючись на отриманих даних, можна стверджувати, що біотехнологічні підходи за використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є ефективним шляхом для створення їстівних та лікарських рослин, які є продуцентами природних для рослин та рекомбінантних біологічно активних сполук. Визначено, що рослини різних видів (*B.pilosa*, *A.tilesii*, *A.officinalis*, *L.sativa*, *C. intybus*) здатні синтезувати інтерферон людини, який є біологічно активним та виявляє протівірусну активність. Наявність перенесених генів та синтез рекомбінантного білка не призводять до припинення синтезу природних для даних видів біологічно активних сполук, зокрема, фруктозовмісних цукрів, артемізиніну, сполук з антиоксидантною та антимикробною активністю. Раніше не досліджена можливість накопичення у біотехнологічних рослинах та коренях одночасно декількох сполук з різною біологічною активністю, як природних, так і рекомбінантних, є новим знанням у фундаментальному вивченні активності перенесених при генетичній трансформації, їх впливу на природний метаболізм трансгенних рослин, а також підвищує технологічність та перспективність використання створених колекційних ліній їстівних та лікарських рослин, особливо «бородатих» коренів, для продукування цінних сполук медичного призначення у рослинній системі.

Новизна отриманих результатів полягає у тому що уперше:

- запропоновано підходи для оптимізації методики генетичної трансформації та їх застосування при отриманні біотехнологічних лікарських рослин різних видів;
- методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні рослини *C. intybus* та *L. sativa* з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини або генами антигенів *Mycobacterium tuberculosis*;
- застосовано *A.rhizogenes* для трансформування рослин *Lemna minor* та створено напряду без отримання культури «бородатих» коренів трансгенні рослини *Lemna minor*, які несуть гени *esxA* та

*fbpB* антигенів ESAT6 та AG85B *M. tuberculosis* і синтезують цільовий білок;

- визначено можливість генетичної трансформації лікарських та їстівних рослин *L. sativa*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* з використанням *A. rhizogenes* та створено культури «бородатих» коренів, у тому числі такі, що мають ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини;
- кількісно визначено, що у культурі трансгенних коренів одночасно накопичуються як природні для рослин сполуки (фруктозовмісні цукри, артемізинін), так і рекомбінантні білки (інтерферон- $\alpha 2b$  людини, антигени *M. tuberculosis*).

Результати проведених досліджень дають можливість розв'язати важливу наукову проблему, яка стосується розроблення високоефективної біотехнології генетичної трансформації та синтезу біологічно активних сполук у рослинних клітинах, що може бути застосована для створення біотехнологічних рослин різних видів, у тому числі лікарських та їстівних. Було отримано трансгенні лінії та створено колекцію «бородатих» коренів і трансгенних рослин лікарських та їстівних культур видів *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor*, які є одночасно продуцентами природних для цих видів та рекомбінантних біологічно активних сполук.

## ВИСНОВКИ

Розроблено ефективні біотехнологічні підходи з використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (*Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*) для отримання «бородатих» коренів або трансгенних ліній рослин класу Дводольних (*Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Ruta graveolens*, *Artemisia tilesii*, *Althaea officinalis*, *Bidens pilosa*, *Tragopogon porrifolius*) та Однодольних (*Lemna minor*) з генами, що кодують синтез інтерферону- $\alpha 2b$  людини або антигенів ESAT6-Ag85B мікобактерій. У отриманих біотехнологічних рослин та «бородатих» коренів зберігається здатність до синтезу природних біологічно активних сполук, а також одночасно синтезуються рекомбінантні білки. Створені колекційні рослини і «бородаті» корені лікарських та їстівних видів є джерелом сполук з антиоксидантною, протимікробною, УФ-протекторною, противірусною активностями.

1. Вперше шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано культури «бородатих» коренів рослин *L. sativa*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *T.porrifolius*.
2. Оптимізований метод *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації дозволяє отримати «бородаті» корені або трансгенні рослини шести видів класу Дводольних (*C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A.officinalis*, *B.pilosa*, *T. porrifolius*) з частотою трансформації до 100%. Найбільш важливими факторами, які збільшують частоту трансформації, визначено час культивування на середовищі без цефотаксиму, тривалість росту без селективного тиску. Встановлено, що для трансформації рослин, які виявляють протимікробну активність, необхідно подовжити термін кокультивування експлантів з суспензією агробактерій.
3. Продемонстровано можливість перенесення генів інтерферону- $\alpha 2b$  людини або генів антигенів ESAT6-Ag85B мікобактерій до їстівних та



лікарських рослин *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* шляхом агробактеріальної трансформації.

4. Встановлено, що трансгенні рослини *L. minor* (клас Однодольні) можна отримати шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, уникаючи етапу отримання культури «бородатих» коренів.
5. Доведено, що трансгенні рослини та «бородаті» корені *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor* здатні синтезувати рекомбінантний інтерферон або антигени мікобактерій. Зокрема, «бородаті» корені рослин *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, до яких було перенесено ген *ifn- $\alpha$ 2b*, здатні накопичувати інтерферон- $\alpha$ 2b людини у кількості до 2766,66 пг/г маси, а трансгенні рослини з геном *esxA::fbpB* здатні синтезувати відповідний рекомбінантний антиген ESAT6-Ag85B мікобактерій у кількості 0,5 мкг/г сирої маси (ряска).
6. Екстракти з трансгенних рослин досліджуваних видів та «бородатих» коренів з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини виявляють противірусну активність. Рівень такої активності є видо-, тканино- та лінієспецифічним і становить, зокрема, у *A. tilesii* до 98437 МО/г маси, *A. officinalis* – до 40760 МО/г маси, *L. sativa* – до 14062 МО/г маси, *C. intybus* – до 2250 МО/г маси.
7. Встановлено, що у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* синтезуються не тільки рекомбінантні білки, але й одночасно сполуки, які накопичуються у цих рослинах у природних умовах, зокрема, запасні фруктозовмісні цукри – до 190 мг/г маси (у трансгенних коренях *T. porrifolius*) та вторинний метаболіт артемізинін – до 0,03% сухої маси (у «бородатих» коренях *A. tilesii*).
8. Виявлено як видові, так і лінієспецифічні відмінності у накопиченні фруктанів у «бородатих» коренях рослин *C. intybus*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *B. pilosa* незалежно від використаного для трансформації вектора. Продемонстровано, що трансгенні корені усіх

досліджуваних видів рослин, отримані з використанням як дикого штаму *A. rhizogenes* A4, так і *A. rhizogenes*, що несли вектори з цільовими генами, у 33 % випадків накопичують у 2.8-4.2 рази (залежно від лінії) більше флавонолів порівняно з контролем.

9. Продемонстрована УФ-протекторна (*C. intybus*), протимікробна (*R. graveolens*) та антиоксидантна (*C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*) активність екстрактів з трансгенних ліній або культури «бородатих» коренів досліджуваних видів.
10. Встановлено, що генетична трансформація може призводити до підвищення рівня протимікробної активності екстрактів з досліджуваних біотехнологічних зразків. Рівень такої активності екстрактів з трансгенних коренів *R. graveolens* був вищим, ніж у контролі, при тестуванні на культурах бактерій *Staphylococcus aureus* B918, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 1т3, *Bacillus simplex* 3s2, *Micrococcus luteus* 3201, *Sporosarcina aquimarina* 188n2.
11. Показано, що лінії трансгенних коренів усіх досліджуваних видів рослин *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *R. graveolens* відрізняються за фізіологічними параметрами, зокрема за швидкістю росту, наявністю специфічного забарвлення, ступенем галуження, що дозволяє використовувати цю особливість для відбору найбільш продуктивних зразків.
12. За використання розроблених підходів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації створено колекцію продуцентів спектру природних та рекомбінантних біологічно активних сполук, яка нараховує 96 колекційних зразків, з них 27 ліній трансгенних рослин та 69 ліній «бородатих» коренів восьми видів рослин. Екстракти з цих рослин є біологічно активними, що може бути використано у косметології (як УФ-протектори, антиоксиданти), медицині, ветеринарії (екстракти з антимікробними та противірусними властивостями).

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Watson J. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid / J. Watson, F. Crick // *Nature*. – 1953. Vol. 171, № 4356. – P. 737–738.
2. Cocking E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles / E. C. Cocking // *Nature*. – 1960. – Vol. 187, № 4741. – P. 962–963.
3. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. Executive Summary / C. James // ISAAA Brief. ISAAA: Ithaca, NY. – 2014. – № 49. – P. 1-24.
4. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. Executive Summary, ISAAA Brief № 49. ISAAA. – Режим доступу: <http://isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp>
5. Cornelissen B.J.C. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants / B.J.C. Cornelissen, L. S. Melchers // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101, № 3. – P. 709–712.
6. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants / M. Prins, M. Laimer, E. Noris [et al.] // *Mol. Plant Pathol.* – 2008. – Vol.9, № 1. – P. 73-83.
7. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato / M.L. Chye, K.J. Zhao, Z.M. He [et al.] // *Planta*. – 2005. – Vol.220, №5. – P. 717-730.
8. Overexpression of 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase gene from *Gossypium hirsutum* enhances *Arabidopsis* resistance to *Verticillium* wilt / J. Yang, L. Ji, X. Wang [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2015. - Vol. 4, №8. – P. 1429-1441.
9. Molecular and physiological changes in response to salt stress in *Citrus macrophylla* W plants overexpressing *Arabidopsis* CBF3/DREB1A / X. Alvarez-Gerding, C. Espinoza, C. Inostroza-Blancheteau, P Arce-Johnson // *Plant Physiol Biochem.* – 2015. - Vol. 92. – P. 71-80.
10. Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants / J. Zhang, N. Y. Klueva, Z. Wang // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* - 2000. – Vol. 36, №2. – P. 108–114.
11. Bhatnagar-Mathur P. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects / P. Bhatnagar-Mathur, V. Vadez, K.K. Sharma // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27, №3. – P. 411-424.

12. Левенко Б. Трансгенні культури у світі та Україні / Б. Левенко // Вісн. НАН України. – 2011. – № 9. – С.31-40.
13. Schillberg S. 'Molecular farming' of antibodies in plants / S. Schillberg, R. Fischer, N. Emans // *Naturwissenschaften*. – 2003. – Vol. 90, №4. – P. 145-155.
14. Shaaltiel Y. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system / Y. Shaaltiel, D. Bartfeld, S Hashmueli. [et al.] // *Plant Biotechnol J*. – 2007. - Vol. 5, № 5. – P. 579-590.
15. Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture / T.G. Kim, M.Y. Baek, E.K. Lee [et al.] // *Plant Cell Rep*. 2008. – Vol. 27, №5. – P. 885-891.
16. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine / H.S. Mason, H. Warzecha, T. Mor [et al.] // *Trends Mol. Med*. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 324 – 329.
17. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce / *Jing Lia, Min Chena, Xian-Wei Liua* [et al.] // *Sci. Horticult*. – 2007. – Vol. 112, № 3. – P. 258-265.
18. Production of biologically active human interferon- $\alpha$  in transgenic rice / T. Masumura, S. Morita, Y. Miki [et al.] // *Plant Biotechnol*. – 2006. – Vol. 23, №.1. – P. 91-97.
- 19., High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants / Y. Luchakivskaya, O. Kishchenko, I. Gerasymenko [et al.] // *Plant Cell Rep*. – 2011. – Vol. 30, № 3. – P.407-415.
20. Novel controlled-release *Lemna*-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial / De Leede L.G., Humphries J.E., Bechet A.C. [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res*. – 2008. – Vol. 28, № 2. – P.113-122.
21. *Sievert W*. Management issues in chronic viral hepatitis: hepatitis C / W. Sievert // *J. Gastroenterol. Hepatol*. – 2002. – Vol. 17, № 4. – P. 415-422.
22. Apisarnthanarax N. Treatment of cutaneous T cell lymphoma: current status and future directions / N. Apisarnthanarax, R. Talpur, M. Duvic // *Am. J. Clin. Dermatol*. – 2002. – Vol. 3, № 3. – P.193-215.

23. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis / M.D. Chilton, M.H. Drummond, D.J. Merlo [et al.] // Proc.Nat. Acad. Sci. – 1977. – Vol. 11, № 2. – P. 263 – 271.
24. Tzfira T. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology / T.Tzfira, V.Citovsky // Curr Opinion in Biotechnol. – Vol. 17, № 2. – P. 147–154.
25. Liu Y.-C. Efficient Polyethylene Glycol (PEG) Mediated Transformation of the Moss *Physcomitrella patens* / Y.-C. Liu, L. Vidali // J Vis Exp. – 2011. – Vol. 50. – P. 2560.
26. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells / T.M. Klein, E.D. Wolf, R.Wu, J.C. Sanford // Nature. – 1987. – Vol. 327, № 6117. – P. 70 – 73.
27. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus / G. Ishigaki, T. Gondo, K. Suenaga, R. Akashi // J. Plant Physiol. – 2012. – Vol. 169, № 5. – P. 546-549.
28. Chiyoda S. Plastid transformation of sporelings and suspension-cultured cells from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. / S. Chiyoda, K.T. Yamato, T. Kohchi // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1132. – P. 439-447.
29. Transfer and expression of *npt II* and *bar* genes in cucumber (*Cucumis satavus* L.) / G. Vengadesan, R. P. Anand, N. Selvaraj // In Vitro Cell Development Biol. Plant. – 2005. – Vol. 41, №1. – P. 17-21.
30. Doherty T. M. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress / T. M. Doherty, P. Andersen // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 18, № 4. – P. 687-702.
31. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves / Y.L.Dorokhov, A.A.Sheveleva, O.Y. Frolova [et al.] // Tuberculosis (Edinb.). – 2007. – Vol. 87, № 3. – P. 218-224.
32. Transgenic carrot expressing fusion protein comprising m. tuberculosis antigens induces immune response in mice / N.V. Permyakova, A.A. Zagorskaya, P.A. Belavin [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. –Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/417565;2015:417565>.
33. Brower V. Back to nature: extinction of medicinal plants threatens drug discovery / V. Brower // J. Natl. Cancer Inst. – 2008. – Vol. 100. – P. 838–839.

34. Leng R. A. Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish / R A Leng, J. H. Stambolie, R. Bell // *Livestock Res. for Rural Devel.* – 1995. – Vol. 7. – Режим доступа: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/lrrd/lrrd7/1/3.htm>
35. Rojas O.J. Concentration of metabolizable energy and digestibility of energy, phosphorus, and amino acids in lemna protein concentrate fed to growing pigs / O.J. Rojas, Y. Liu, H.H. Stein // *J. Anim. Sci.* – 2014. – Vol. 92, № 11. – P. 5222-5229.
36. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb / J.S. Chang, L.C. Chiang, C.C. Chen [et al.] // *Am. J. Chin. Med.* – 2001. – Vol. 29, № 2. – P.303-312.
37. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация *Nicotiana tabacum* L. / Ю. Ю. Глеба, Р. Г. Бутенко, К. М. Сытник // *Докл. АН СССР.* – 1975. – Т. 221. – С. 1196 – 1198.
38. Melchers G. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. Selection of light-resistant hybrids of “haploid” sensitive varieties of tobacco / G. Melchers, G. Labib // *Mol. Gen. Genet.* – 1974. – Vol. 135, № 4. – P. 277-294.
39. Glimelius K. Potentials of protoplast fusion in plant breeding programmes / K. Glimelius // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1988. – Vol. 12, № 2. – P. 163 – 172.
40. Глеба Ю.Ю. Клеточная инженерия растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. - Киев: Наукова думка, 1984. – 159 с.
41. Potrykus I. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration / I. Potrykus, R.D. Shillito // *Meth. in Enzymol.* – 1986. – Vol. 118. – P. 549 – 578.
42. Gamborg O.L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // *Exp. Cell Res.* – 1968 – Vol. 50, № 1. – P. 148 – 151.
43. Shepard F.J. Abscisic acid- enhanced shoot initiation in protoplast- derived calli of potato / F.J. Shepard // *Plant Sci. Lett.* – 1980. – Vol. 18, № 4. – P. 327 – 333.
44. Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion / D. Dudits, J. Fejr, G. Hadlaczký [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1980. – Vol. 179, № 2. – P. 283 – 288.
45. Gleddie S. Plant regeneration from tissue, cell and protoplast cultures of several wild *Solanum* species / S. Gleddie, W. A. Keller, G. Setterfield // *J. Plant Physiol.* – 1985. – Vol. 119, № 5. – P. 405 – 418.

46. Glimelius K. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae / K. Glimelius / *Physiol. Plant.* – 1984. – Vol. 61, № 1. – P. 38 – 44.
47. Nishio T. Simple and efficient protoplast culture procedure for lettuce, *Lactuca sativa* L. / T. Nishio, T. Sato, K. Mori, K. Takayanagi // *Japan J. Breed.* – 1987. – Vol. 38, № 2. – P. 165 – 171.
48. Vasil V. Isolation and culture of cereal protoplasts. II Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum* / V. Vasil, I.K. Vasil // *Theor. Appl. Genet.* – 1980. – Vol. 56, № 3. – P. 97 – 99.
49. Hayat S. Isolation and fusion of protoplasts from the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) / S. Hayat, C. Christias // *Braz. J. Microbiol.* - 2010. – Vol. 41. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100035>
50. Zhang Z. B. Biological control agent for rice weeds from protoplast fusion between *Curvularia Lunata* and *Helminthosporium Gramineum* / Z. B. Zhang, N. R. Burgos, J. P. Zhang, L.Q. Yu // *Weed Sci.* – 2007. – Vol. 55, № 6. – P. 599-605.
51. Besoain X. A. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici* / X. A. Besoain // *Electronic J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 10, №4. – Режим доступа: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v10n4-16/107>.
52. Shen Q. Y. Breed of phenol-degrading microorganism with protoplast fusion / Q. Y. Shen, L. Liu, Q. Y. Shen, J. L. Kong // in: *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control.* – 2003. – Vol. 4. – P. 39–42.
53. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus* / P. Geerts, P. Druart, S. Ochatt, J.-P. Baudoin // *BASE.* – 2008. – Vol. 12. – P. 41-46, – Режим доступа: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=2039>.
54. Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools / Q. Chen, H. Y. Li, Y. Z. Shi [et al.] // *Can J Plant Sci.* – 2008. – Vol. 88, № 4. – P. 611-619.
55. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA / E.A. Krens, L. Molendijk, G.I. Wullems, R. A. Schilperoort // *Nature.* – 1982. – Vol. 296, № 5852. – P. 72 – 74.

56. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms / Li G., Li R., Liu Q. [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2006. - Vol. 256. – P. 203–208.
57. Gietz R. D. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method / R. D. Gietz, R. H. Schiestl // Nat. Protocols. – 2007. – Vol. 2. – P. 31 – 34.
58. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA Microinjection / M.Y.A. Masani, G.A. Noll, G.K.A. Parveez [et al.] // PLoS ONE. – 2014. - Vol. 9, №5. – e96831.
59. Fromm M.E. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation / M.E. Fromm, L.P. Taylor, V. Walbot // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1985. – Vol. 82, № 17. – P. 5824 – 5825.
60. Wu S. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol / S. Wu, G. J. Letchworth // BioTechniques. – 2004. – Vol. 36, № 1. – P.152-154.
61. Zhang C. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by electroporation / C. Zhang, H. Hu // Marine Genom. – 2014. – Vol. 16. – P. 63–66.
62. Nermin Adel El Semyr Optimized electroporation-induced transformation in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 / Nermin Adel El Semyr // BASE. – 2010. – Vol. 14. – P. 149-152.
63. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process / J.C. Sanford, T.M. Klein, E.D. Wolf [et al.] // Part. Sci. Technol. – 1987. – Vol. 5, № 1. – P. 27 – 37.
64. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells / J.J. Finer, P. Vain, M. Jones [at al.] // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11, № 7. – P. 323 – 328 .
65. Kikkert J. R. Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment / J. R. Kikkert, J. R. Vidal, B. I. Reisch // Biolistics Transgenic Plants: Methods and Protocols Methods in Mol. Biol. – 2004. – Vol. 286. – P. 61–78.
66. Sailaja M, Tarakeswari M., Sujatha M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds// Plant Cell Rep. – 2008. - Vol. 27, № 9. – P. 1509– 1519.



67. Taylor N. J. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology / N. J. Taylor, C. M. Fauquet // DNA Cell Biol. – 2002. – Vol. 21. – P. 963–977.
68. Hunold R. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location / R. Hunold, R. Bronner, G. Hahne // The Plant J. – 1994. – Vol. 5, № 4. - P. 593 –604.
69. Patnaik D. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli / D. Patnaik, P. Khurana // BMC Plant Biol. – 2003. – Vol. 3, – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/5>
70. Ma N.L. Comparison of Particle Bombardment-transformation Parameters Between Stem and Calli Explants of *Aglaonema simplex* / N.L. Ma, T. S. Cha, M. Maziah, A. Aziz // J. of Fisheries and Aquatic Sci. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. 544–552.
71. Plackett A.R.G. Protocol: genetic transformation of the fern *Ceratopteris richardii* through microparticle bombardment / A.R.G. Plackett, E. H Rabbinowitsch, J.A. Langdale // Plant Meth. – 2015. – Vol. 11, – Режим доступа: <http://www.plantmethods.com/content/11/1/37>
72. Christou P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment / P. Christou // Euphytica. – 1995. – Vol. 85, № 1. - P. 13 – 27.
73. Sparks C.A. Genetic transformation of wheat via particle bombardment / C.A. Sparks, H.D. Jones // Methods Mol Biol. 2014. – Vol. 1099. – P. 201– 218.
74. Expression of a cystatin transgene can confer resistance to root lesion nematodes in *Lilium longiflorum* cv. 'Nellie White' / P. Vieira, S. Wantoch, C.J. Lilley [et al.] // Transgen. Res. – 2015. – Vol. 24, № 3. – 421–432.
75. Lerche K. Stable nuclear transformation of *Pandorina morum* / Lerche K., Hallmann A. // BMC Biotechnol. – 2014. Vol. 14, – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/14/65>.
76. Bhatnagar S. Evaluation of parameters for high efficiency gene transfer via particle bombardment in Indian mulberry / S. Bhatnagar, A. Kapur, P. Khurana // Indian J. Exp Biol. – 2002. – Vol. 40, № 12. – P. 1387–1392.

77. Particle-inflow-gun-mediated genetic transformation of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters / V. Bhat, S.J. Dalton, S. Kumar [et al.] // *J. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 42, № 4. – P. 405–412.
78. Chiyoda S. Plastid transformation of sporelings and suspension-cultured cells from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. / S. Chiyoda, K.T. Yamato, T. Kohchi // *Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1132. – P. 439–447.
79. Maliga P. Plastid transformation in higher plants / Maliga P. // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – 55. – P. 289–313.
80. Tseng M.J. Plastid transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by the biolistic process / M.J. Tseng, M.T. Yang, W.R. Chu, C.W. Liu // *Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol.1132. – P. 355–366.
81. Kirienko D.R. Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study / D.R. Kirienko, A. Luo, A.W. Sylvester // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 159, № 4. – P. 1309–1318.
82. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines / C. Pereira Petrillo, N. Portilho Carneiro, A. Á. Corsetti Purcino [et al.] // *Pesq. agropec. bras.* – 2008. – Vol. 43, № 3, – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000300012>.
83. Chen Z.Y. PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production / Z.Y. Chen, R.L Brown, K.E. Damann, T.E. Cleveland // *Mol Plant Pathol.* – 2010. – Vol. 11, № 1. – 69-81.
84. Finer J.J. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment / J.J. Finer, M.D. McMullen // *Plant Cell Rep.* - 1990. – Vol. 8, № 10. – P. 586–589.
85. Rajasekaran K. Biolistic transformation of cotton embryogenic cell suspension cultures / K. Rajasekaran // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 958. – 59-70.
86. Stable chloroplast transformation of immature scutella and inflorescences in wheat (*Triticum aestivum* L.) / C. Cui, F. Song, Y. Tan [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2011. – Vol. 43, № 4. – P. 284–291.
87. Vasil I.K. Transformation of wheat via particle bombardment / I.K. Vasil, V. Vasil // *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 318. – P. 273-283.

88. Qin J.B. Biolistic transformation of wheat using the HMW-GS 1Dx5 gene without selectable markers / J.B. Qin, Y. Wang, C.Q. Zhu // *Genet. Mol. Res.* – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 4361–4371.
89. Liu G. Highly efficient sorghum transformation / G. Liu, I.D. Godwin // *Plant Cell Rep.* 201. – Vol. 31, № 6. – P. 999–1007.
90. Liu G. Sorghum genetic transformation by particle bombardment / G. Liu, B.C. Campbell, I.D. Godwin // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1099. – 219–234.
91. Prathibha B. Devi *In vitro* culture and genetic transformation of sorghum by microprojectile bombardment / Prathibha B. Devi, B. Mariam // *Plant Biosyst.* – 2003. – Vol. 137, № 3. – P. 249–254.
92. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration / L. M. Houllou-Kido, E. A. Kido, M.C. Falco // *Pesq. agropec. bras.* – 2005. – Vol. 40, № 11, – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100005>.
93. Dengue virus E glycoprotein production in transgenic rice callus / T.G. Kim, M.Y. Kim, N.Q. Tien [et al.] // *Mol Biotechnol.* – 2014. – Vol. 56, № 12. – P. 1069–1078.
94. Development of transgenic rice pure lines by particle bombardment-mediated transformation and genetic analysis-based selection / K. Tang, A. Wu, J. Yao, [et al.] // *Acta Biotechnol.* – 2000. – Vol. 20, № 2. – P. 175–183.
95. A maize  $\alpha$ -zein promoter drives an endosperm-specific expression of transgene in rice / J.B. Joshi, S. Geetha, B. Singh [et al.] // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 35–42.
96. Miyamoto T. Quantitative analysis of transiently expressed mRNA in particle-bombarded tobacco seedlings / T. Miyamoto, T. Nakamura, I. Nagao, J. Obokata // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2010. – Vol. 18, № 2. – P. 101–107.
97. Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco / M. Shimizu, M. Goto, M. Hanai [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 147, № 4. – P. 1976–1983.
98. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration / D.E. McCabe, W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou // *Bio/Technol.* – 1988. – Vol. 6, № 8. – P. 923 – 992.

99. Homrich M.S. Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants / M.S. Homrich, B. Wiebke-Strohm, R.L. Weber, M.H. Bodanese-Zanettini // *Genet Mol Biol.* – 2012. – Vol. 35, № 4. – P. 998–1010.
100. Sequence variants of the *Phytophthora sojae* RXLR effector Avr3a/5 are differentially recognized by Rps3a and Rps5 in soybean / S. Dong, D. Yu, L. Cui [et al.] // *PLoS One.* 2011. - Vol. 6, № 7, – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779316e20172>.
101. Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons / L. Cheng, H.P. Li, B. Qu [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2010. – Vol. 29, № 4. – 371–381.
102. Chen J.L. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.) / J.L. Chen, W.D. Beversdorf // *Theor. Appl. Genet.* - 1994. – Vol. 88, № 1. – P. 187 – 192.
103. Scotti N. Improvement of plastid transformation efficiency in potato by using vectors with homologous flanking sequences / N. Scotti, V.T. Valkov, T. Cardi // *GM Crops.* – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 89–91.
104. Valkov V.T. Plastid transformation in potato: *Solanum tuberosum* / V.T. Valkov, D. Gargano, N. Scotti, T. Cardi // *Meth. Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1132. – P. 295–303.
105. Romano A. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment / A. Romano, K. Raemakers, R. Visser // *Plant Cell Rep.* - 2001. – Vol. 20, № 3. – P. 198 – 204.
106. Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts / W. Craig, D. Gargano, N. Scotti [et al.] // *Plant Cell Rep.* - 2005. – Vol. 24, № 10. - P. 603 – 611.
107. Tuan V. D. Gene transformation in Brassica sp. using particle bombardment technique / V. D. Tuan, G.K. Garg // *Omonrice.* – 2001. – Vol. 9. – P. 36–40.
108. Optimization and transformation of *Arundo donax* L. using particle bombardment / S. Dhir, K. Knowles, C.L. Pagan [et al.] // *African J. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 9, № 39. – P. 6460-6469.

109. Genetic Transformation of Garlic (*Allium sativum* L.) by particle bombardment / A. Robledo-Paz, J. L. Cabrera-Ponce, V. M. Villalobos-Arámbula [et al.] // Hort. Sci. – 2004. – Vol. 39, № 6. – P.1208–1211.
110. Bansal K.C. Plastid transformation in eggplant / K.C Bansal, A.K. Singh // Meth. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1132. – P. 305-316.
111. Sunagawa M. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment / M. Sunagawa, Y. Magae // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – Vol. 211. – P. 143–146.
112. Progress in genetic engineering of peanut (*Arachis hypogaea* L. / G. Krishna, B.K. Singh, E.K. Kim [et al.] // Plant Biotechnol J. – 2015. – Vol.13, № 2. – P. 147–162.
113. Ibrahim E.R., Genetic transformation of *Metroxylon sagu* (Rottb.) cultures via *Agrobacterium*-mediated and particle bombardment / E.R. Ibrahim, M.A Hossain, H.A. Roslan // Biomed Res Int. – 2014. – Vol. 2014, – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/348140/>.
114. Mousavi M. Genetic transformation of date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. 'Estamaran') via particle bombardment / M. Mousavi, A. Mousavi, A.A. Habashi, B. Dehsara // Mol. Biol. Rep. – 2014. – Vol. 41, №12. – P. 8185–8194.
115. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment / S. Men, X. Ming, Y. Wang [et al.] // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21, №6. – P. 592–528.
116. Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment / Y. Wakita, M. Otani, K. Iba [et al.] // Genes Genet. Syst. – 1998. – Vol. 73, № 4. – P. 219 – 226.
117. Kikkert J. R. Stable Transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics / J. R. Kikkert, J. R. Vidal, B. I. Reisch // Transgenic Plants: Methods and Protocols: Meth Mol Biol. – 2004. –Vol. 286. – P. 61–78.
118. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures / K. Rajasekaran, R.L. Hudspeth, J.W. Cary [et al.] // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – 539–545.

119. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment / Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M. [et al.] // J. Exp Bot. – 2001. – Vol.52, № 357. – P. 865–874.
120. DNA from Ti-plasmid is present in the nucleus and absent from the plastids of crown gall plant cells / L. Willmitzer, M. Beuckeleer, M. Lemmers [et al.] // Nature. – 1980. - Vol. 287, № 5780. – P. 359 – 361.
121. Bevan M. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA / M. Bevan, W.M. Barnes, M.D. Chilton // Nucleic Acids Res. – 1983. – Vol. 11, № 2. – P. 369 – 385.
122. Location and stability of *Agrobacterium* mediated T-DNA insertion in the lycopersicon genome / Y.-S. Chyi, R.A Jorgensen, D. Goldstein [et al.] // Mol. and Gen. Genet. - 1986. – Vol. 204, № 1. – P. 64 – 69.
123. Tzfira T. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models / T. Tzfira, J. Li, B. Lacroix, V. Citovsky // Trends in Genet. – 2004. – Vol. 20, № 8. – P. 375–383.
124. Castle L. A. Agricultural input traits: past, present and future / L. A. Castle, G. Wu, D. McElroy // Curr Opin in Biotechnol. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 105–112.
125. Werner A. Regulation of the *NPT* gene by a naturally occurring antisense transcript / A. Werner, K. Preston-Fayers, L. Dehmelt, P. Nalbant // Cell Biochem. Biophys. – 2002. – Vol. 36, № 2-3. – P. 241–252.
126. Transfer and expression of *npt II* and *bar* genes in cucumber (*Cucumis satavus* L.) / G. Vengadesan, R. P. Anand, N. Selvara [et al.] // In Vitro Cell Devel. Biol. Plant. – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 17–21.
127. Suratman A. Detection of *nptII* Gene and 35SCaMV Promoter in Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) / A. Suratman, J. O. Ughude, Sismindari // J. Food Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 1. – P. 10–13.
128. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker / Lohar D. P., Schuller K., Buzas D. M. [et al.] // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, № 361. – P. 1697–1702.
129. Rathore K.S. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts / K.S. Rathore, V.K. Chowdhury, T.K. Hodges // Plant Mol. Biol. – 1993. – Vol. 21, № 5. – P. 871–884.

130. Zhao Y. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment / Y. Zhao, Q. Qian, H. Wang, D. Huang // J. Genet. Genomics. – 2007. – Vol. 34, № 9. – P. 824–835.
131. Kawahigashi H. Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1 / H. Kawahigashi, S. Hirose, H. Ohkawa, Y. Ohkawa // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25, № 1. – P. 75–84.
132. Jefferson R. A. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants / R. A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M. W. Bevan // EMBO J. – 1987. – Vol. 6, № 13. – P. 3901–3907.
133. Henry K. F. A *cis*-regulatory module activating transcription in the suspensor contains five *cis*-regulatory elements / K. F. Henry, T. Kawashima, R. B. Goldberg // Plant Mol. Biol. – 2015. – Vol. 88, № 3. – P. 207–217.
134. RNAi-mediated down-regulation of *SHATTERPROOF* gene in transgenic oilseed rape / H. Kord, A. M. Shakib, M. H. Daneshvar [et al.] // J. Biotech. – 2015. – Vol. 5, № 3. – P. 271–277.
135. Efficient transformation and expression of *gfp* gene in the edible mushroom *Pleurotus nebrodensis* / J. Lin, M. Zheng, J. Wang [et al.] // Progress in Nat. Sci. – 2008. – Vol.18, № 7. – P. 819–824.
136. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns / C. Burns, K.E. Gregory, M. Kirby [et al.] // Fungal Genet. Biol. – 2005. – Vol. 42, № 3. – P. 191–199.
137. Green fluorescent protein as a marker for gene expression / M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen [et al.] // Science. – 1994. – Vol. 263, № 5148. – P. 802–805.
138. McDowell J.M. Plant disease resistance gene: recent insights and potential applications / J. M. McDowell, B. J. Woffenden // Trends Biotechnol. – 2003. – Vol. 21. – P. 178–183.
139. Efficient production of transgenic plants using the bar gene for herbicide resistance in sweetpotato / N. Zang, H. Zhai, S. Gao [et al.] // Sci. Hortic. – 2009. – Vol. 122, № 4. – P. 649–653.
140. Transgenic Herbicide-Resistant Turfgrasses / I.-J. Song, T.-W. Bae, M. Ganesan [et al.] // in: "Herbicides - Current Research and Case Studies in Use" ed. Andrew J.

- Price and Jessica A. Kelton, 2013. – Режим доступа: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/transgenic-herbicide-resistant-turfgrasses>.
141. Comparison and evaluation of two diagnostic methods for detection of npt II and GUS genes in *Nicotiana tabacum* / M.A. Almasi, M. Aghapour-Ojaghkandi, K. Bagheri [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 175, № 8. – P. 3599–3616.
142. Du L. An Efficient Protocol for plantlet regeneration via direct organogenesis by using nodal segments from embryo-cultured seedlings of *Cinnamomum camphora* L. / L. Du, Y. Li, Y. Yao, L. Zhang // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 5,–Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4427331/>.
143. Zhang H.J. An efficient regeneration protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of melon (*Cucumis melo* L.) / H.J. Zhang, P. Gao, X.Z. Wang, F.S. Luan // Genet. Mol. Res. – 2014. – Vol. 13, №1. – P. 54–63.
144. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using cotyledons in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) / I. Nakajima, Y. Sato, T. Saito [et al.] // Breed. Sci. – 2013. – Vol. 63, № 3. – P. 275–283.
145. Kumar P. High frequency organogenesis in hypocotyl, cotyledon, leaf and petiole explants of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop/P. Kumar, D.K. Srivastava/ Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2015. – Vol. 21, №2. – P. 279–285.
146. Bezirganoglu I. Efficient production of transgenic melon via *Agrobacterium*-mediated transformation / I. Bezirganoglu, S.Y. Hwang, J.F. Shaw, T.J. Fang // Genet. Mol. Res. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 3218–3227.
147. Chowdhury S. A new high-frequency *Agrobacterium*-mediated transformation technique for *Sesamum indicum* L. using de-embryonated cotyledon as explant / S. Chowdhury, A. Basu, S. Kundu // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251, № 5. – P. 1175–1190.
148. *Agrobacterium*-mediated transient MaFT expression in mulberry (*Morus alba* L.) leaves / S.L. Wu, X.B. Yang, L.Q. Liu [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2015. – Vol. 29. – P. 1–6.



149. Efficient shoots regeneration and genetic transformation of *Bacopa monniera*. / U. Kumari, R.K. Vishwakarma, N. Gupta [et al.] // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 261–267.
150. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry cv. Camarosa by a dual plasmid system / F. Haddadi, M.A. Aziz, S.N. Abdullah [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 3. – P. 3647–3666.
151. *Agrobacterium*-mediated transformation of five wild *Solanum* species using in vitro microtubers / A. Kumar, M. Miller, P. Whitty [et al.] // *Plant Cell Rep.* - 1995. - Vol. 14, № 5. – P. 324 – 328.
152. Medvecká E. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos / E. Medvecká, W.A. Harwood // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1223. – P. 199–209.
153. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication / S. Weber, W. Friedt, N. Landes [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 475–482.
154. Effect of *Agrobacterium* strain and plasmid copy number on transformation frequency, event quality and usable event quality in an elite maize cultivar / L. Zhi, S. TeRonde, S. Meyer [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2015. – Vol. 34, № 5. – P. 745–754.
155. Transformation and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Solanum tuberosum* L. cv. ‘Shepody’ / V. Gustafson, S. Mallubhotla, J. MacDonnell [et al.] // *Plant Cell Tiss. and Organ Culture*. – 2006. – Vol. 85, № 3. – P. 361 – 366.
156. Ahmed M.B. An Efficient *Agrobacterium-mediated* genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin) / M.B. Ahmed, M.S. Akhter, M. Hossain // *Middle-East J. of Scientific Res.* – 2007. – Vol. 2, № 2. – 155–160.
157. Huy N.X. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) / N.X. Huy, M.S. Yang, T.G. Kim // *Mol Biotechnol.* – 2011. – Vol. 48, № 3. – 201–209.
158. Ravanfar S.A. Optimization of in vitro regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with heat-resistant cDNA in *Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel / S.A. Ravanfar, M.A. Aziz, H.M. Saud, J.O. Abdullah // *Curr. Genet.* – 2015. – Vol.61, №4. – P. 653-663.

159. Koul B. Comparative performance of modified full-length and truncated *Bacillus thuringiensis-cry1Ac* genes in transgenic tomato / B. Koul, R. Yadav, I. Sanyal, D.V. Amla // Springerplus. – 2015. – Vol. 4, – Режим доступа: <http://www.springerplus.com/content/pdf/s40064-015-0991-x.pdf>.
160. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato orange gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance / Z. Wang, Q. Ke, M.D. Kim [et al.] // PLoS One. 2015. – Vol. 10, № 5. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422619/>.
161. Overexpression of a *gmcx1* gene enhanced activity of nitrate reductase and aldehyde oxidase, and boosted mosaic virus resistance in soybean / Z. Zhou, H. He, L. Ma // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 4. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4401665/>.
162. Regeneration ability and genetic transformation of root type chicory (*Cichorium intybus* var. sativum) / A. Maroufi, M. Karimi, Khosro Mehdi Khanlou // African J. of Biotechnol. – 2012. – Vol. 11, № 56. – P. 11874–11886.
163. Cheng L. M. Establishment of a highly efficient genetic transformation system in *Cichorium intybus* / L. M. Cheng, Cao Qiu Fen, Huang Jing // Acta Pratacult. Sin. – 2004. – Vol. 13, № 6. – P. 112–116.
164. Transformation of *Cichorium intybus* with the *AtNHX1* gene and salinity tolerance of the transformants / Y. W. Zhao, Y. J. Wang, H. Y. Bu [et al.] // Acta Pratacult. Sin. – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 103–109.
165. Mohamed S. Agrobacterium-mediated transformation of two high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes: assessment and optimization of important parameters / S. Mohamed, R. Boehm, P.C. Binsfeld, H. Schnabl // Helia. – 2004. – Vol. 27, № 40. – P. 25–40.
166. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using *Lba4404* strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene / Tishchenko O. M., Komisarenko A. G., Mykhalska S. [et al.] // Cytol. and Gen. – 2014. – Vol. 48, № 4. – P. 218–226.
167. Lucas O. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with

- Agrobacterium tumefaciens* / O. Lucas, J. Kallerhoff, G. Alibert // Mol. Breed. – 2000. – Vol. 6, № 5. – P. 476–487.
168. Sonication, Vacuum Infiltration and Thiol Compounds Enhance the *Agrobacterium*-Mediated Transformation Frequency of *Withania somnifera* (L.) Dunal. / G. Sivanandhan, G. Kapil Dev, J. Theboral // PLoS One. 2015. – Vol. 10, № 4, – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124693>.
169. Zeng X. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in asakura-sanshoo (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC. F. inermis Makino) an important medicinal plant / X. Zeng, D. Zhao // Pharmacogn. Mag. – 2015. – Vol. 11, № 42. – P. 374–380.
170. Pathway engineering for phenolic acid accumulations in *Salvia miltiorrhiza* by combinational genetic manipulation / Y. Zhang, Y.P. Yan, Y.C. Wu [et al.] // Metab Eng. – 2014. – Vol. 21. – P. 71–80.
171. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Ruta graveolens* L. / K. Lièvre, T.L. Tran, S. Doerper [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2009. – Vol. 547. – P. 235–248.
172. Promotion of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* by overexpressing *ADS*, *CYP71AV1* and *CPR* genes / X. Lu, Q. Shen, L. Zhang [et al.] // Ind. Crop Prod. – 2013. – Vol. 49. – P. 380–385.
173. Chen D. H. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation / D. H. Chen, H. C. Ye, G. F. Li // Plant Sci. – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 179–185.
174. Hiei Y. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Hiei, Y. Ishida, T. Komari // Front. Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 628–635.
175. Sparks C.A.. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery / C.A. Sparks, A. Doherty, H.D. Jones // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1099. – P. 235–250.
176. Wu H. *Agrobacterium*-mediated transformation of bread and durum wheat using freshly isolated immature embryos / H. Wu, A. Doherty, H.D. Jones // Methods Mol. Biol. – 2009. – Vol. 478. – P. 93–103.

177. Wu H. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) using additional virulence genes / H. Wu, A. Doherty, H.D. Jones // *Transgenic Res.* – 2008. – Vol. 17, № 3. – P. 425–436.
178. Sivparsad B.J. Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA) / B.J. Sivparsad, A. Gubba // *Transgenic Res.* – 2014. – Vol. 23, № 2. – P. 377–388.
179. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with rolB gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens / W. Arshad, I.U. Haq, M.T. Waheed [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 5, –Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096979>.
180. Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants expressing IbMYB1, a sweet potato transcription factor / Y.J. Cheng, M.D. Kim, X.P. Deng [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 23, № 12. – P.1737–1746.
181. A Cu/Zn superoxide dismutase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* / Z.B. Liu, W.J. Zhang, X.D. Gong [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 2086–2098.
182. Masahiro Nishihara Genetic Engineering of Novel Flower Colors in Floricultural Plants: Recent Advances via Transgenic Approaches / Masahiro Nishihara, Takashi Nakatsuka // *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants Methods in Molecular Biology.* – 2010. – Vol. 589. – P. 325–347.
183. Bais H.P. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory—in vitro shoot regeneration and induction of flowering / H.P. Bais, R.T. Venkatesh, A. Chandrashekar, G.A. Ravishankar // *Curr Sci.* – 2001. – Vol. 80, № 1. – P. 83–87.
184. Earlier flowering induced by over-expression of CO gene does not accompany increase of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*/ H.Wang, Y. Liu, K. Chong [et al.] // *Plant biol.* – 2007. – Vol. 9, № 3. – P. 442–446.
185. Current approaches toward production of secondary plant metabolites / Md. Sarfaraj Hussain, Sheeba Fareed, Saba Ansari [et al.] // *J. Pharm. Bioallied. Sci.* – 2012. – Vol. 4, №1. – P. 10–20.

186. Bourgaud F. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 61. – P. 839 – 851.
187. Watson J. Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop / J. Watson, V. Koya, S.H. Leppla, H. Daniell // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22. – P. 4374–4384.
188. Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin. / A. Tavizi, M.J. Javaran, A. Moieni [et al.] // *Mol Biol Rep.* – 2015. – Vol. 42, № 5. – P. 1013–1023.
189. Alvarez M.A. Is The Time Coming for Plant-Made Vaccines? / M.A. Alvarez // *J. Immunol. Tech. Infect. Dis.* – 2012. – Режим доступа: <http://www.scitechnol.com/time-coming-for-plantmade-vaccines-63c5.php?article>
190. Howard J. A. Commercial Plant-Produced Recombinant Protein Products: Case Studies / J. A. Howard, E. E. Hood // Режим доступа: <http://www.springer.com/us/book/9783662438350>.
191. Taylor C.G. Generation of composite plants using *Agrobacterium rhizogenes* / C.G. Taylor, B. Fuchs, R. Collier, W.K. Lutke // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 343. – P. 155–167.
192. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization / E. Alpizar, E. Dechamp, F. Lapeyre-Montes [et al.] // *Ann. Bot.* – 2008. – Vol. 101, № 7. – P. 929-940.
193. A simple and general method for transferring genes into plants / R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffmann [et al.] // *Science.* – 1985. – Vol. 227, № 4691. – P. 1229–1231.
194. Christey M. C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants / M. C. Christey // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2001. – Vol.37, № 6. – P. 687–700.
195. Giri A. Transgenic hairy roots: recent trends and applications / A. Giri, M. Narasu // *Biotechnol. Adv.* – 2000. – Vol.18, № 1. –P. 1–22.
196. Chashmi N.A. Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and *in vitro* cultured two accessions of *Atropa belladonna* L. under nitrate treatments / N.A.

- Chashmi, M. Sharifi, F. Karimi, H. Rahnama // *Z. Naturforsch.* – 2010. – Vol. 65, № 5-6. – P. 373–379.
197. Bulgakov V.P. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with *rol* genes / V.P. Bulgakov, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik // *Meth. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 643, №1. – P. 229–242.
198. Wang C.T. Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production / C.T. Wang, H. Liu, X.S. Gao, H.X. Zhang // *Plant Cell Rep.* – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 887-894.
199. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures / B. Wang, G. Zhang, L. Zhu [et al.] // *Colloids Surf. Biointerfaces.* – 2006. – Vol. 53, № 1. – P.101–104.
200. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A / H.N. Murthy, C. Dijkstra, P. Anthony [et al.] // *J. Integr. Plant Biol.* – 2008. – Vol.50, № 8. – P. 975–981.
201. Zhang H.C. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment / H.C. Zhang, J.M. Liu, H.Y. Lu, S.L. Gao // *Plant Cell Rep.* – 2009. - Vol. 28, № 8. – P. 1205–1213.
202. Nopo-Olazabal C. Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) / C. Nopo-Olazabal, J. Hubstenberger, L. Nopo-Olazabal, F. Medina-Bolivar // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. — Vol. 4, № 48. – P. 11744–11758.
203. N. Sevón. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids / N. Sevón, K.M. Oksman-Caldentey // *Planta Med.* – 2002. – Vol. 68, № 10. – P. 859–868.
204. Hairy root cultures for secondary metabolites production / L. Pistelli, A. Giovannini, B. Ruffoni [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2010. – Vol. 698. – P. 167-184.
205. Georgiev M.I. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances / M.I. Georgiev, A.I. Pavlov, T. Bley // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 74, № 6. – P. 1175–1185.

206. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: a step towards oral vaccination for rabies / Singh A., Srivastava S., Chouksey A. [et al.] // Mol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 57, № 4. – P. 359–370.
207. Nedelkoska T. V. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens* / T. V. Nedelkoska, P. M Doran. // Biotechnol. Bioengineer. – 2000. – Vol. 67, № 5. – P. 607–615.
208. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. For the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities / Q.Y. Gai, J. Jiao, M. Luo [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 3 – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4364778/>.
209. High-performance liquid chromatographic quantification of plumbagin from transformed rhizoclones of *Plumbago zeylanica* L.: inter-clonal variation in biomass growth and plumbagin production / P. Nayak, M. Sharma, S.N. Behera [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 175, № 3. – P. 1745–1770.
210. Déchamp E. Coffee (*Coffea arabica* L.) / E. Déchamp, J.C. Breitler, T. Leroy, H. Etienne // Methods Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1224. – P. 275–291.
211. Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue-plasminogen activator in hairy roots of Oriental melon (*Cucumis melo*) / S.R. Kim, J.S. Sim, H. Ajjappala [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – Vol. 113, № 1. – P. 106–111.
212. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures / R.K. Tiwari, M. Trivedi, Z.C. Guang [et al.] // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 199–210.
213. Zhao D. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production / D. Zhao, C. Fu, Y. Chen, F. Ma // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 23, № 7. – P. 468–474.
214. A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma* / Valimehr S., Sanjarian F., Sohi H.H. [et al.] // Physio. Mol. Biol. Plant. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 351–356.

215. Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase / Y.K. Kim, Y.B. Kim, M.R. Uddin [et al.] // *ACS Synth. Biol.* – 2014. – Vol. 3, № 10. – P. 773–779.
216. Elfahmi. Optimization of genetic transformation of *Artemisia annua* L. Using *Agrobacterium* for Artemisinin production / Elfahmi, S. Suhandono, A. Chahyadi // *Pharmacogn. Mag.* – 2014. – Vol. 10, №1. – P. 176–180.
217. Sharafi A. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi* / A. Sharafi, H.H. Sohi, P. Azadi, A.A. Sharafi // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 257–262.
218. Klimek-Chodacka M. A protocol for sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of haploid and diploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) explants / M. Klimek-Chodacka, R. Baranski // *Acta Biochim. Pol.* – 2014. – Vol. 61, № 1. – P. 13–17.
219. The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and  $\beta$ -carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L. / S. Sharifi, T.N. Sattari, A. Zebarjadi [et al.] // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 69–80.
220. Długosz M. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. / M. Długosz, E. Wiktorowska, A. Wiśniewska, C. Pączkowski // *Acta Biochim. Pol.* – 2013. – Vol. 60, № 3. – P. 467–473.
221. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation / A. Sharafi, H. Hashemi Sohi, A. Mousavi [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 29, № 11. – P. 2125–2131.
222. Ionkova I. *Linum narbonense*: A new valuable tool for biotechnological production of a potent anticancer lignan Justicidine B / I. Ionkova, P. Sasheva, T. Ionkov, G. Momekov // *Pharmacogn. Mag.* – 2013. – Vol. 9, № 33. – P. 39–44.
223. Swain S.S. Production of triterpenoid anti-cancer compound taraxerol in *Agrobacterium*-transformed root cultures of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) / S.S. Swain, K.K. Rout, P.K. Chand // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 168, № 3. – P. 487–503.



224. Rao K. *Agrobacterium*-mediated transformation in *Alpinia galanga* (Linn.) Willd. for enhanced acetoxychavicol acetate production / K. Rao, B. Chodiseti, L.N. Mangamoori, A. Giri // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 168, № 2. – P. 339–347.
225. Wang J.P. Kirenol production in hairy root culture of *Siegesbeckia orientalis* and its antimicrobial activity / J.P. Wang, Y.M. Zhou, Y.H. Zhang // *Pharmacogn. Mag.* – 2012. – Vol. 30. – P. 149–155.
226. An protocol for genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes* A4 / M.L. Zhou, X.M. Zhu, J.R. Shao [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 166, № 7. – P. 1674–1684.
227. Kuźma Ł. Genetic transformation of *Salvia austriaca* by *Agrobacterium rhizogenes* and diterpenoid isolation / Ł. Kuźma, W. Kisiel, A. Królicka, H. Wysokińska // *Pharmazie.* – 2011. – Vol. 66, № 11. – P. 904–907.
228. Bandaranayake P.C. Trans-specific gene silencing of acetyl-CoA carboxylase in a root-parasitic plant / P.C. Bandaranayake, J.I. Yoder // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2013. – Vol. 26, № 5. – P. 575–584.
229. Composite potato plants with transgenic roots on non-transgenic shoots: a model system for studying gene silencing in roots / P. Horn, J. Santala, S.L. Nielsen [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2014. – Vol. 33, № 12. – P. 1977–1992.
230. Mellor K.E. Use of *ex vitro* composite plants to study the interaction of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* / K.E. Mellor, A.M. Hoffman, M.P. Timko // *Plant Methods.* – 2012. – Vol. 8, № 1. – Режим доступа: <http://plantmethods.com/content/8/1/22>.
231. *Striga* parasitizes transgenic hairy roots of *Zea mays* and provides a tool for studying plant-plant interactions / Runo S., Macharia S., Alakonya A. [et al.] // *Plant Methods.* – 2012. – Vol. 8, № 1. – Режим доступа: <http://www.plantmethods.com/content/8/1/20>.
232. Dolatabadian A. *Agrobacterium rhizogenes* transformed soybean roots differ in their nodulation and nitrogen fixation response to genistein and salt stress / A. Dolatabadian, S.A. Modarres Sanavy, F. Ghanati, P.M. Gresshoff // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 29, № 7. – P. 1327–1339.

233. Ooi C.T. Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum* / C.T. Ooi, A. Syahida, J. Stanslas, M. Maziah // World J. Microbiol. Biotechnol. –2013. – Vol. 29, № 3. – P. 421–430.
234. Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation / A. Wilczańska-Barska, A. Królicka, D. Głód [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2012. – Vol. 34, № 9. – P. 1757–1763.
235. MALDI-TOF characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* grown in an airlift with mesh bioreactor / E.G. López, E.G. Ramírez, O.G. Gúzman [et al.] // Biotechnol Prog. – 2014. – Vol. 30, № 1. – P. 161–171.
236. Srivastava S. Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor / S. Srivastava, A.K. Srivastava // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2012. – Vol. 35, № 9. – P. 1549–1553.
237. Drake P.M. Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N / P.M. Drake, L. de Moraes Madeira, T.H. Szeto, J.K. Ma // Transgenic Res. – 2013. – Vol. 22, № 6. – P. 1225–1229.
238. Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b / Iu.S. Luchakivskaia, Z.M. Olevinskaia, E.M. Kishchenko [et al.] // Citol. Genet. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 15–20.
239. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor / Shakti Mehrotra, Arun Kumar Kukreja, Suman Preet Singh Khanuja [et al.] // Plant Biotechnol. – 2008. – Vol. 11, № 2, Режим доступа: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v11n2-6/39>
240. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor / C. Liu, M.J. Towler, G. Medrano [et al.] // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – Vol. 102, № 4. – P. 1074–1086.
241. Huang T.K., McDonald K.A. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures / T.K. Huang, K.A. McDonald // Biotechnol Adv. – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 398–3409.

242. Woods R.R. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase / R.R. Woods, B.C. Geyer, T.S. Mor // BMC Biotechnol. – 2008. – Vol. 23. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/95>.
243. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody / S.T. Häkkinen, N. Raven, M. Henquet [et al.] // Biotechnol. Bioeng. – 2014. – Vol. 111, № 2. – P. 336–346.
244. Klein-Lankhorst R.M. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet / R.M. Klein-Lankhorst, E.M.J. Salentijn, W. Lange, W.J. Stiekema // Science. – 1997. – Vol. 275. – P. 832–834.
245. The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* isolates in transgenic plants / G.-L. Wang, W.-Y. Song, D.-L. Ruan [et al.] // Mol. Plant–Microbe Interact. – 1996. – Vol. 9. – P. 850–855.
246. Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes / J.E. Parker, E.B. Holub, L.N. Frost [et al.] // Plant Cell. – 1996. – Vol. 8. – P. 2033–2046.
247. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expressed both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance / S.A. Bowling, J.D. Clarke, Y. Liu [et al.] // Plant Cell. – 1997. – Vol. 9. – P. 1573–1584.
248. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance / R. Buschges, K. Hollricher, R. Panstruga [et al.] // Cell. – 1997. – Vol. 88. – P. 695–670.
249. McKersie B. D. Water deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase / B. D. McKersie, S. R. Bowley, E. Harjanto, O. Leprince // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 111. – P. 1177–1181.
250. Close T. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature / T. Close // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 100. – P. 291–296.
251. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice / D. Xu, X. Duan, B. Wang [et al.] // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 110. – P. 249–257.
252. TraeALDH7B1-5A, encoding aldehyde dehydrogenase 7 in wheat, confers improved drought tolerance in *Arabidopsis* / J. Chen, B. Wei, G. Li [et al.] // Planta. – 2015. – Vol.242, №1. – P.137–141.

253. Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances / M. Ashraf // Biotechnol. Adv. – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 169–183.
254. Fung K.L. Tobacco-expressed Brassica juncea chitinase BjCHI1 shows antifungal activity *in vitro* / K.L. Fung, K.J. Zhao, Z.M. He, M.L. Chye // Plant Mol. Biol. – 2002. – Vol. 50, № 2. – P. 283–294.
255. Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato / D.M. Horvath, R.E. Stall, J.B. Jones [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 8. – РЕЖИМ ДОСТУПУ: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042036>.
256. Singh H.R. Enhanced resistance to blister blight in transgenic tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) by overexpression of class I chitinase gene from potato (*Solanum tuberosum*) / H.R. Singh, M. Deka, S. Das // Funct Integr Genomics. – 2015. – Vol.15, №4. – P. 461-480.
257. Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease / G. Kovács, L. Sági, G. Jacon [et al.] // Transgenic Res. – 2013. – Vol. 22, № 1. – P. 117–130.
258. Iqbal M.M. Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot / M.M. Iqbal, F. Nazir, S. Ali // Mol Biotechnol. – 2012. – Vol. 50, № 2. – P. 129–136.
259. Duan H. Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eva1 elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1 / H. Duan, C. Richael, C.M. Rommens // Transgenic Res. – 2012. – Vol. 21, № 5. – P. 929–938.
260. Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct / C.Y. Lin, H.M. Ku, Y.H. Chiang [et al.] // Transgenic Res. – 2012. – Vol. 21, № 5. – P. 983–993.
261. Ignacimuthu S. Development of transgenic finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) resistant to leaf blast disease / S. Ignacimuthu, S.A. Ceasar // J. Biosci. – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 135–147.
262. Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunt) selected for PVY resistance in

- Argentina / F. Bravo-Almonacid, V. Rudoy, B. Welin [et al.] // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21, № 5. – P. 967–982.
263. Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato / Arif M., Azhar U., Arshad M. [et al.] // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21, № 2. – P. 303–311.
264. Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of papaya ringspot virus in Hawaii / S. Ferreira, K. Pitz, R. Manshardt [et al.] // *Plant Disease.* – 2002. – Vol. 86. – P. 101–105.
265. Fuchs M. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies / M. Fuchs, D. Gonsalves // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 173–202.
266. Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects / F. Ahmed, M.Y. Rafii, M.R. Ismail [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963525>.
267. Bhatnagar-Mathur P. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects / P. Bhatnagar-Mathur, V. Vadez, K.K. Sharma // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 411–424.
268. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) / H. E. Schroeder, A. H. Schotz, T. Wardley-Richardson [et al.] // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101, № 3. – P. 751 – 757.
269. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector / J.A.J. Fillatti, J. Kiser, R. Rose [et al.] // *Bio/Technol.* – 1987. – Vol. 5, № 7. - P. 726 – 730.
270. Expression of the Bar Gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce / U. Mohapatra, M.S. McCabe, J. B. Power [et al.] // *Transgen. Res.* - 1999. – Vol. 8, № 1. – P. 33 – 44.
271. Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake / Mukhopadhyay Arundhati, Töpfer Reinhard, Pradhan Akshay [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1991. - Vol. 10, № 8. – P. 375 – 379.

272. *In vitro* assay selection of glyphosate resistance in lettuce / A.C. Torres, R.T. Nagata, R.J. Ferl, Bewick T. A., Cantliffe D. J. // J. Amer. Soc. Hort. Sci. - 1999. - Vol. 124, № 1. - P. 86 – 89.
273. Bioassay for detection of glyphosate or kanamycin resistance in lettuce plants / A.C. Torres, W.M. Nascimento, S.A.V. Paiva, F.A.S. Aragao, D.J. Cantliffe // Plant Cell. Cult. and Micropropag. – 2005. – Vol. 1, № 1. – P. 13 – 18.
274. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate / M. Mannerlöf, S. Tuveesson, P. Steen, P. Tenning // Euphytica. - 1997. – Vol. 94, № 1. – P.83 – 91.
275. Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line / S. R. Padgett, K. H. Kolacz, X. Delannay [et al.] // Crop Sci. – 1995. – Vol. 35, № 5. – P. 1451 – 1461.
276. Pollegioni L. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering / L. Pollegioni, E. Schonbrunn, D. Siehl // FEBS J. – 2011. – Vol. 278, №16. – P. 2753–2766.
277. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct gene transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein gene and a selectable marker gene / C. Herve, D. Rouan, P. Guerche, M.H. Montane, P.Yot // Plant Sci. – 1993. – Vol. 91, № 2. – P. 181 – 193.
278. Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme / M. de Block, J. Botterman, M. Vandewiele [et al.] // EMBO J.- 1987. – Vol. 6, № 9. – P. 2513 – 2518.
279. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue / A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1986. – Vol. 6. – P. 347–357.
280. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification / E.E. Hood, D.R. Witcher, S. Maddock [et al.] // Mol Breed 1997. – Vol. 3. – P. 291–306.
281. Commercial production of b-glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants / D.R. Witcher, E.E. Hood, D. Peterson [et al.] // Mol. Breed. –1998. – Vol. 4. – P. 301–312.

282. The search for a promising cell factory system for production of edible vaccine / A. Barzegari, N. Saeedi, H. Zarredar [et al.] // Hum. Vaccin. Immunother. – 2014. – Vol. 10, №8. – P. 2497–2502.
283. Rosales-Mendoza S. Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines / S. Rosales-Mendoza, J.A. Salazar-González // Expert. Rev. Vaccines. – 2014. – Vol. 13, № 6. – P. 737–749.
284. Plant-based vaccines: novel and low-cost possible route for Mediterranean innovative vaccination strategies / A.A. Aboul-Ata, A. Vitti, M. Nuzzaci [et al.] // Adv. Virus Res. – 2014. – Vol. 89. – P. 1–37.
285. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine / J. Gorantala, S. Grover, A. Rahi [et al.] // J. Biotechnol. – 2014. – Vol. 176. – P. 1–10.
286. Expression of the human milk protein  $\beta$ -casein in transgenic potato plants / D.K.X. Chong, W. Roberts, T. Arakawa [et al.] // Transgenic Res. – 1997. – Vol. 6. – P. 289–296.
287. Yu J. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases / J. Yu, W.H. Langridge // Nat. Biotechnol. – 2001. – Vol. 19. – P. 548–552.
288. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant / C. Merle, S. Perret, T. Lacour [et al.] // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 515. – P. 114–118.
289. Scheller J. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation / J. Scheller, D. Henggeler, A. Viviani, U. Conrad // Transgen. Res. – 2004. – Vol. 13. – P. 51–57.
290. Higo K. Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco / K. Higo, Y. Saito, H. Higo // Biosci. Biotech. Biochem. – 1993. – Vol. 57. – P. 1477–1481.
291. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco / C.L. Cramer, D.L. Weissenborn, K.K. Oishi [et al.] // Ann. NY Acad. Sci. – 1996. – Vol. 792. – P. 62–71.

292. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants / S.L. Woodard, J.M. Mayor, M.R. Bailey [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2003. – Vol. 38. – P. 123–130.
293. Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies / A. Gutierrez-Ortega, F. Avila-Moreno, L.J. Saucedo-Arias [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – Vol. 85. – P. 734–740.
294. Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture / T.H. Kwon, J.E. Seo, J. Kim [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 81. – P. 870–875.
295. Menassa R. A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10 / R. Menassa, V. Nguyen, A. Jevnikar, J. Brandle // *Mol. Breeding.* – 2001. – Vol. 8. – P. 177–185.
296. Park Y. Expression and Production of Recombinant Human Interleukin-2 in Potato Plants / Y. Park, H. Cheong // *Protein Expr. Purif.* – 2002. – Vol. 25. – P. 160–165.
297. Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants / B. Zhang, Y.-H. Yang, Y.-M. Lin [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – Vol. 25. – P. 1629–1635.
298. Expression of human  $\alpha$ -interferon cDNA in transgenic rice plants / Z. Zhu, K. Hughes, L. Huang [et al.] // *Plant Cell Tiss. ] Organ Cult.* – 1994. – Vol. 36. – P. 197–204.
299. Sawahel W.A. The production of transgenic potato plants expressing human  $\alpha$ -interferon using lipofectin-mediated transformation / W.A. Sawahel // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – Vol. 7. – P. 19–29.
300. Expression of biologically active human tumor necrosis factor-alpha in transgenic potato plant / K. Ohya, N. Itchoda, K. Ohashi [et al.] // *Ibid.* – 2002. – Vol. 22. – P. 371–378.
301. Leelavathi S. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors / S. Leelavathi, V.S. Reddy // *Mol. Breeding.* – 2003. – Vol. 11. – P. 49–58.
302. Budzianowski J. Tobacco - a producer of recombinant interferons / J. Budzianowski // *Przegl. Lek.* – 2014. – Vol. 71, № 11. – 639–643.



303. Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene / L.O. Sakhno, O.Y. Kvasko, Z.M. Olevinska [et al.] // *Tsitol Genet.* – 2012. – Vol. 46, № 6. – P. 12–18.
304. Lowther W. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* / W. Lowther, K. Lorick, S.D., Lawrence W.S. Yeow // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21, № 6. – P. 1349–1357
305. Evaluation of unintended effects in the composition of tomatoes expressing a human immunoglobulin A against rotavirus / P. Juarez, A. Fernandez-del-Carmen, J.L. Rambla [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2014. – Vol. 62, № 32. – P. 8158–8168.
306. Yemets A.I. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin / A.I. Yemets, I.V. Tanasienko, Y.A. Krasnylenko, Y.B. Blume // *Cell Biol. Int.* – 2014. – Vol. 38, № 9. – P. 989–1002.
307. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody / K. Ko, Y. Tekoah, P.M. Rudd [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 8013–8018.
308. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes / L. Zeitlin, S.S. Olmsted, T.R. Moench [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16. – P. 1361–1364.
309. Fulton A. Purification of monoclonal antibody against Ebola GP1 protein expressed in *Nicotiana benthamiana* / A. Fulton, H. Lai, Q. Chen, C. Zhang // *J. Chromatogr.* – 2015. – Vol. 1389. – P. 128–132.
310. High-Yield Expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants / A. Firsov, I. Tarasenko, T. Mitiouchkina [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 57, № 7. – P. 653–661.
311. Generation and analysis of novel plant-derived antibody-based therapeutic molecules against West Nile virus / J. He, H. Lai, M. Engle [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 3. – РЕЖИМ ДОСТУПУ: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093541>.
312. Enhanced-Transient expression of hepatitis C virus core protein in *Nicotiana tabacum*, a protein with potential clinical applications / S. Mohammadzadeh, A.

- Khabiri, F. Roohvand [et al.] // *Hepat. Mon.* – 2014. – Vol. 14, № 11. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286711/>.
313. Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants / N. Ramirez, M. Ayala, D. Orenzo [et al.] // *Transgenic Res.* – 2002. – Vol. 11. – P. 61–64.
314. Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen / N. Ramirez, M. Rodriguez, M. Ayala [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2003. – Vol. 38. – P. 223–230.
315. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale / R. Valdes, B. Reyes, T. Alvarez [et al.] // *BBRC.* – 2003. – Vol. 310. – P. 742–747.
316. Salyaev R.K. Candidate mucosal vaccine against hepatitis B based on tomatoes transgenic for the preS2-S gene / R.K. Salyaev, N.I. Rekoslavskaya, A.S. Stolbikov, A.V. Tret'yakova // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 446. – P. 257–259.
317. High-yield production of a human monoclonal IgG by rhizosecretion in hydroponic tobacco cultures / L.M. Madeira, Szeto T.H., Henquet M. [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2015, Режим доступа: [ttp://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12407/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12407/full)
318. Parthasarathy B., P. K. S., Venkataraman K., Vijayalakshmi M.A. Expression of anti-tumor necrosis factor alpha (tnf $\alpha$ ) single chain variable fragment (scFv) in *Spirodela punctata* plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* / B. Parthasarathy, P. K. S., K. Venkataraman, M.A. Vijayalakshmi // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2015, Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786575>
319. Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV- mice / Y. Wang, K. Chen, Z. Wu [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 29. – P. 31–36.
320. Supercritical fluid extraction provides an enhancement to the immune response for orally-delivered hepatitis B surface antigen / C.A. Hayden, E.M. Smith, D.D. Turner // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32, № 11. – P. 1240–1246.
321. Mardanova E.S. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors / E.S.

Mardanov, R.Y. Kotlyarov, V.V. Kuprianov [et al.] // BMC Biotechnol. – 2015. –

Vol. 15. – Режим доступа:

<http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-015-0164-6>.

322. Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12 / E. Vamvaka, R.M. Twyman, A.M. Murad [et al.] // Plant Biotechnol J. – 2015. – Vol.14, №1. – P. 97-108.
323. Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses / I. Lindh, A. Bråve, D. Hallengård [et al.] // Vaccine. – 2014. – Vol. 32, № 20. – P. 2288–2293.
324. An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice / L. Orellana-Escobedo, S. Rosales-Mendoza, A. Romero-Maldonado [et al.] // Plant Cell Rep. – 2015. – Vol. 34, № 3. – P. 425–433.
325. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants / Kumar G.B.S., Ganapathi T.R., Revathi C.J. [et al.] // Planta. – 2005. – Vol. 222. – P. 484–493
326. Induction of immune responses in mice and pigs by oral administration of classical swine fever virus E2 protein expressed in rice calli / M. Jung, Y.J. Shin, J. Kim [et al.] // Arch Virol. – 2014. – Vol. 159, № 12. – P. 3219–3230.
327. Secretion of hepatitis B surface antigen in transformed tobacco cell suspension cultures / G.B.S. Kumar, T.R. Ganapathi, L. Srinivas [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2005. – Vol. 27. – P. 927–932.
328. Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety / E.B. Rukavtsova, N.V. Rudenko, E.N. Puchko [et al.] // J. Biotechnol. – 2015. – Vol. 203. – P. 84–88.
329. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots / G.B.S. Kumar, T.R. Ganapathi, L. Srinivas [et al.] // Plant Sci. – 2006. – Vol. 170. – P. 918–925.
330. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg / Y. Gao, Y. Ma, M. Li [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9. – P. 996–1002
331. Ma Y. Transformation of HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) into tomato plants / Y. Ma, S.Q. Lin, Y. Gao // Fu jian Nonglin Daxue Xuebao. – 2002. – Vol. 31. – P. 223–227.

332. Chen H.Y. Transforming HBsAg into peanut and detection of its immunogenicity / H.Y.Chen, J.Zhang, Y.Gao [et al.] // Shengwu Jishu Tongxun. – 2002. – Vol. 13. – P. 245–250.
333. Oral immunization of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B / T.G. Hauterslager, D.E. Florack, T.J. Wal [et al.] // Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 2749–2755.
334. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT) / R. Chikwamba, J. Cunnick, D. Hathaway // Transgenic Res. – 2002. – Vol. 11. – P. 479–493.
335. Daniell H. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts / H. Daniell, S.B. Lee, T. Panchal, P.O. Wiebe // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 311. – P. 1001–1009.
336. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice / H.S. Mason, J.M. Ball, J.J. Shi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – Vol. 93. – P. 5335–5340.
337. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes / C.O. Tacket, H.S. Mason, G. Losonsky [et al.] // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 182. – P. 302–305.
338. Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection / R. Franconi, P. Di Bonito, F. Dibello [et al.] // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 3654–3658.
339. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus / N. Gómez, A. Wigdorovitz, S. Castañón [et al.] // Arch. Virol. – 2000. – Vol. 145. – P. 1725–1732.
340. Immunodiagnostic properties of wucheraria bancrofti sxp-1, a potential filarial diagnostic candidate expressed in tobacco plant, *Nicotiana tabacum* / M. Ganapathy, M. Chakravarthi, S.J. Charles [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 176, №7. – P. 1889–1903.
341. Hudson L.C. Soybean seeds: a practical host for the production of functional subunit vaccines / L.C. Hudson, R. Garg, K.L. Bost, K.J. Piller // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/340804>.

342. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection / J.L.Dong, B.G.Liang, Y.Jin [et al.] // *Virol.* – 2005. – 339, № 2. – P. 153–163
343. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants / M.S. Pérez Aguirreburualde, M.C. Gómez, A. Ostachuk [et al.] // *Vet Immunol. Immunopathol.* – 2013. – Vol. 151, № 3-4. – 315–324.
344. Delivery of subunit vaccines in maize seed / B. Lamphear, S. Streatfield, J. Jilka [et al.] // *J. Control. Release.* – 2002. – Vol.85. – P. 169–180.
345. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination / T. Nochi, H. Takagi, Y. Yuki [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 10986–10991.
346. A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine / B. Lamphear, J. Jilka, L. Kesl [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22. – P. 2420–2424.
347. Oral immunogenicity of potato-derived antigens to *Mycobacterium tuberculosis* in mice / Y. Zhang, S. Chen, J. Li [et al.] // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* – 2012. – Vol. 44, № 10. – P. 823–830.
348. Chen X. Generation and immunogenicity of transgenic potato expressing the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / X. Chen, J. Liu // *J. Virol. Methods.* – 2011. – Vol.173, № 1. – P. 153–158.
349. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination / D.E. Webster, S.D. Smith, R.J. Pickering [et al.] // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, № 17. – P. 3538–3544.
350. Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica* / A.B. Legocki, K. Miedzinska, M. Czaplińska [et al.] // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, № 15. – P. 1844–1846.
351. A novel chimeric MOMP antigen expressed in *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, and *Daucus carota* as a potential *Chlamydia trachomatis* vaccine candidate / I. Kalbina, A. Wallin, I. Lindh [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2011. – Vol. 80, № 2. – P. 194–202
352. Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge / S. Rosales-Mendoza, R.E.

- Soria-Guerra, R. López-Revilla [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27, № 1. – P. 79–84.
353. Marquet-Blouin E. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin / E. Marquet-Blouin, F.B. Bouche, A. Steinmetz, C.P. Muller // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 51, № 4. – P. 459–469.
354. Ramessar K. Molecular pharming in cereal crops / K. Ramessar, T. Capell, P. Cristou // *Pytochem. Rev.* – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 579–592.
355. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine / D. Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – Vol. 107. – P. 8794–8799.
356. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination / T. Nochi, H. Takagi, Y. Yuki [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007. – Vol. 104. – P. 10986–10991.
357. Efficient induction of oral tolerance by fusing cholera toxin B subunit with allergen-specific T-cell epitopes accumulated in rice seed / H. Takagi, T. Hiroi, L. Yang [et al.] // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26. – P. 6027–6030.
358. McMurray D. N. Recent progress in the development and testing of vaccines against human tuberculosis/ D. N. McMurray // *Intern. J. Parasitol.* – 2003. – Vol. 33, № 5-6. – P. 547–554.
359. Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development / I.M. Orme // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, № 17-18. - P. 2105–2108.
360. Orme I. M. Tuberculosis vaccine development: recent progress / I. M. Orme, D.N. McMurray, J. T. Belislea // *Trends in Microbiol.* – 2001. – Vol. 9, № 3. – P. 115–118.
361. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* / Wang Bao-Lin, Ying Xu, Chao-Qun Wu [et al] // *Protein Expression and Purification.* – 2005. – Vol. 39, № 2. – P. 184–188.
362. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? / P. Brodin, I. Rosenkrands, P. Andersen, // *Trends Microbiol.* – 2004. – Vol. 12. – P. 500–508.
363. Young D. The development and impact of tuberculosis vaccines / D. Young, C. Dye // *Cell.* – 2006. – Vol. 124. – P. 683–687.

364. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex / E. Lozes, K. I. Huygen, J. Content [et al.] // *Vaccine*. – 1997. – Vol. 15, № 8. – P. 830–833.
365. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6 / A. Weinrich Olsen, L.A. van Pinxteren, L. Meng Okkels, // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 2773–2778.
366. Expanding the antigenic repertoire of BCG improves protective efficacy against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection / Umaimainthan Palendiraa, J. M. Spratta, W. J. Brittona, J. A. Triccas // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – P. 1680–1685.
367. Daoyin Zhu, Shan Jiang, Xudong Luo. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection / Daoyin Zhu, Shan Jiang, Xudong Luo // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23, № 37. – P. 4619–4624.
368. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice / H. Zhang, P. Peng, S. Miao [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 72, № 4. – P. 349–357.
369. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine / M.M. Rigano, S. Dreitz, A.P. Kipnis [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, № 5. – P. 691–695.
370. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector / A.M. Zelada, G. Calamante, M. de la Paz Santangelo // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2006. – Vol. 86, № (3-4). – P. 263–267.
371. Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy / L. Dedieu, D. M. Floss, M. Mockey et al. [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/274346>.
372. Воронцова А.Л. Интерфероны и их применение в клинической онкологии / А.Л. Воронцова, Ю.И. Кудрявец, В.Е. Жильчук // *Здоровье женщины*. – 2003. – Vol. 4, №16. – С.8–14.
373. Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.Й. Цитокини в терапії злоякісних новоутворень У книзі: "Онкологія (Вибрані лекції для студентів і лікарів)". За ред. акад. НАН України В.Ф.Чехуна. К.: Здоров'я України.- 2010. – С. 597–612.

374. Белоцкий С.М., Спивак Н.Я. Интерфероны. Биологические и клинические эффекты. Киев.- Фитосоциоцентр.– 2006. – 288 с
375. Orchansky P. Human interferons protect plants from virus infection / P. Orchansky, M. Rubinstein, I. Sela // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1982. – Vol. 79, № 7. – P. 2278–2280.
376. Antoniwi J.F. An examination of the effect of human  $\alpha$ -interferons on the infection and multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco / J.F. Antoniwi, R.F. White, J.P. Carr // Phytopath. Z. – 1984. – Vol. 109, № 4. – P. 367–371.
377. Генетическая трансформация *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, несущей плазмиду с геном  $\beta$ -интерферона человека / В.А. Рудас, Н.М. Пивень, М.И Ривкин. [и др.] // Цитология и генетика. – 1997. – Т. 31, № 2. – С. 17–22.
378. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- $\alpha$ 2b / P. A. Arlen, R. Falconer, S. Cherukumilli [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5, № 4. – P. 511–525.
379. Expression of Two Subtypes of Human IFN- $\alpha$  in Transgenic Potato / K. Ohya, T. Matsumura, K. Ohashi [et al.] // Plants J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – Vol. 21, № 8. – P. 595–602.
380. Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits / T. Arazi, S.G. Slutsky, Y.M. Shibolet [et al.] // J. Biotechnol. – 2001. – Vol. 87. – P. 67–82.
381. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures / T.-L. Chen, Y.-L. Lin, Y.-L. Lee et al. // Transgenic Res. – 2004. – Vol. 13, № 5. – P. 499–510.
382. Risk analysis for plant-made vaccines / D. D. Kirk, K. McIntosh, A. M. Walmsley, R. K. D. Peterson // Transgenic Res. – 2005. – Vol. 14, № 4. – P. 449 – 462
383. Mishra S. Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently / S. Mishra, D.K. Yadav, R. Tuli // J. Biotechnol. – 2006. – Vol. 127. – P. 95-108.
384. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum*



- lycopersicum*) / M.K. Sharma, N.K. Singh, D. Jani [et al.] // Plant Cell. Rep. – 2008. – Vol. 27. – P. 307–318.
385. Pontis H.G., del Campillo E. Fructans. *In*: Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. Edited by P.M. Dey and R.A. Dixon. Academic Press, New York, 1985. – P. 205–227.
386. Suzuki M. Extraction and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy (*Phleum pratense*) / M. Suzuki, C.J. Pollock // Can. J. Bot. – 1986. – Vol. 64, № 9. – P. 1884–1886.
387. Carpita N.C. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinacea* leaves / N.C. Carpita, J. Kanabus, T.L. Housley // J. Plant Physiol. – 1989. – Vol. 134, № 2. – P. 162–168.
388. Van den Ende Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development / Van den Ende, W. Michiels A., J. De Roover, A. Van Laere // Sci. World J. - 2002. – Vol.11, № 2. – P. 1273–1287.
389. Pollock C.J. Fructan metabolism in grasses and cereals / C.J. Pollock, A.J. Cairns //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. –1991. – Vol. 42, № 1. – P. 77–101.
390. Chatterton N.J. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures / N.J. Chatterton, P.A. Harrison, J.H. Bennett, K.H. Asay // J. Plant Physiol. – 1989. – Vol. 134, №1. – P.169–179.
391. Chatterton N.J. Oligosaccharides in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* and *Phleum* / N.J. Chatterton, P.A. Harrison, W.R. Thornley, E.A. Draper //New Phytol. – 1990. – Vol.114, № 2. – P. 167–171.
392. Baert J.R.A. Cultivation and breeding of root chicory for inulin production / J.R.A. Baert, E.J. Van Bockstaele // Industrial Crops and Prod. – 1992. – Vol. 1, № 2-4. – P. 229–234.
393. Darwen C.E. Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) / C.E. Darwen, P. John // Plant Physiol. – 1989. – Vol. 89, № 2. – P. 658–663.
394. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots / E.M.

- Hellwege, S. Czapla, A. Jahnke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, № 15. – P. 8699–8704.
395. Characterization of fructan biosynthesis in big bluegrass (*Poa secunda*) / J.Z. Wei, N.J. Chatterton, P.A. Harrison [et al.] // J. Plant Physiol. – 2002. – Vol. 159, № 7. – P. 705–715.
396. Bancal P. Differences in fructan accumulation in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis / P. Bancal, N.C. Carpita, J.P. Gaudillère // New Phytol. – 1992. – Vol. 120, № 3. – P. 313–321.
397. Shiomi N. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants / N. Shiomi // J. Plant Physiol. – 1989. – Vol. 134, № 1. – P. 151–155.
398. López M.G. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var azul / M.G. López, N.A. Mancilla Margalli, G. Mendoza Díaz // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, № 27 – P. 7835–7840.
399. Garcia P.M. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby / P.M. Garcia, A.F. Asega, E.A. Silva, M.A. Carvalho // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – Vol. 49, № 6. – P. 664–670.
400. Oliveira V.F. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker / V.F. Oliveira, E.A. Silva, L.B. Zaidan, M.A. Carvalho // Plant Biol (Stuttg). – 2013. – Vol. 15, № 3. – P. 471–482.
401. Hinch D.K. Specific effects of fructo- and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying / D.K. Hinch, E. Zuther, E.M. Hellwege, A. Heyer // Glycobiol. – 2002. – Vol. 12, № 2. – P.103–110.
402. Livingston III D. P. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants / D. P. Livingston III, D. K. Hinch, A.G. Heyer // Cell Mol. Life Sci.– 2009. – Vol. 66, № 13. – P. 2007–2023.
403. A sucrose: Fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco / X. He, Z. Chen, J. Wang [et al.] // Gene. – 2015. – Vol. 570, №2. – P.239–247.
404. Carbohydrate profiling in seeds and seedlings of transgenic triticale modified in the expression of sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase (1-SST) and sucrose:fructan-6-

- fructosyltransferase (6-SFT) / C. Diedhiou, D. Gaudet, Y. Liang [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* –2012. – Vol. 114, № 4. – P. 371–378.
405. Valluru R. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects / R. Valluru, W. Van den Ende // *J. Exp. Bot.* – 2008.– Vol. 59, № 11. – P. 2905–2916.
406. Kawakami A. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance / A. Kawakami, Y. Sato, M. Yoshida // *J. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 59, № 4. – P. 793–802.
407. Sharma Arun Dev. Advances in microbial inulinases: its production and properties in: *Progress in food engineering research and development* Ed.J.M.Cantor. Nova Science publishers Inc. - 2008. – P.175–195.
408. Gupta A.K. Fructan metabolism in Jerusalem artichoke and chicory // *Developments in Crop Science.* - 2000. - Vol.26. – P. 223–248.
409. Ranjitha Kumari B.D., Velayutham P., Anitha S.A. Comparative Study on inulin and esculin content of in vitro and in vivo plants of chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) / A.K. Gupta, N. Kaur // *Adv. Biol. Res.* – 2007. – Vol. 1, № 1-2. – P. 22–25.
410. Hijova E. Improved efficacy of prebiotic by flaxseed oil and horse chestnut in experimental colon cancer / E. Hijova, A. Chmelarova, A. Bomba // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2011. – Vol. 112, № 4. – P. 161–164.
411. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans / M.B. Roberfroid // *Br. J. Nutr.* – 2005. – Vol. 93, № 1. – P.13–25.
412. Kaur N. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition / N. Kaur, A.K. Gupta // *J. Biosci.* – 2002. - Vol. 27, № 7. – P. 703–714.
413. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile / S.A. Reis, L.L. Conceição, D.D. Rosa [et al.] // *Nutr. Hosp.* – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 528–534
414. Inulin-type fructans with different degrees of polymerization improve lipid metabolism but not glucose metabolism in rats fed a high-fat diet under energy restriction / K.H. Han, H. Tsuchihira, Y. Nakamura [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2013. – Vol. 58, № 8. – P. 2177–2186.

415. Shang H.M. Effects of inulin on performance, egg quality, gut microflora and serum and yolk cholesterol in laying hens / H.M. Shang, T.M. Hu, Y.J. Lu, H.X. Wu // Br. Poult. Sci. – 2010.– Vol. 51, № 6. – P. 791–796.
416. Kelly G. Inulin-type prebiotics-a review: part 1 / G. Kelly // Altern. Med. Rev. – 2008. – Vol. 13, № 4. – P. 315–329.
417. Özer D. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt / D. Özer, S. Akin, B. Özer // Food Sci. Technol. International. – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 19–24.
418. Van der Meulen R. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 / R. Van der Meulen, L. Avonts, L. De Vuyst // Appl. Environm. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 4. – P.1923–1930.
419. Pool-Zobel B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data / B. L. Pool-Zobel // British J. Nutr. – 2005. – Vol. 93, № 1. – P. 73–90.
420. Taper H.S. Nontoxic potentiation of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin / H.S. Taper, M.B. Roberfroid // Nutr. Cancer. – 2000. – Vol. 38, № 1. – P.1–5.
421. Protective effect of *Agave salmiana* fructans in azoxymethane- induced colon cancer in Wistar rats / A. Dávila-Céspedes, B.I. Juárez-Flores, J.M.Pinos-Rodríguezc [et al.] // Nat. Prod. Commun. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. 1503–1506.
422. Immunological properties of inulin-type fructans / L. Vogt, D. Meyer, G. Pullens [et al.] // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2015. – Vol. 55, № 3. – P. 414–436.
423. Hijova E. Changes chemopreventive markers in colorectal cancer development after inulin supplementation / E. Hijova, V. Szabadosova, L. Strojny, A. Bomba // Bratisl. Lek Listy. – 2014. – Vol. 115, № 2. – P. 76–79.
424. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents / S. A. Abrams, I. J. Griffin, K. M. Hawthorne [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 82, № 2. – P. 471–476.
425. Delzenne N.M. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism / N.M. Delzenne, N. Kok // Am. J. Clin Nutr. – 2001. – Vol. 73, № 1-2. – P. 456–458.

426. Ritsema T. How to Fructans: beneficial for plants and humans / T. Ritsema, S. Smeekens // *Curr. Opinion in Plant Biol.* – 2003. – Vol.6, № 3. – P. 223–230.
427. Wei J.-Z. Linkage mapping and nucleotide polymorphisms of the 6-SFT gene of cool-season grasses / J.-Z. Wei, N. J. Chatterton, S. R. Larson, R.R.-C. Wang // *Genome.* – 2000. – Vol. 43, № 6. – P. 931–938.
428. Singh Randhir, Bhatia I. S. Substrate specificity of fructosyl transferase from chicory roots / Singh Randhir, I. S. Bhatia // *Phytochem.* – 1971. – Vol. 10, № 9. – P. 2037–2039.
429. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress/ E.A.H. Pilon-Smits, M.J.M. Ebskamp, M.J. Paul [et al.] // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 107, № 1. – P. 125–130.
430. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing / H. Hisano, A. Kanazawa, A. Kawakami [et al.] // *Plant Sci.* – 2004. – Vol. 167, № 4. – P. 861–868.
431. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco / M.J.M. Ebskamp, I.M. der Meer, B.A. Spronk [et al.] // *BioTechnol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 272–275.
432. Microbial fructan production in transgenic potato plants and tubers / E.A.H. Pilon-Smits, M.J.M. Ebskamp, M.J.W. Jeuken [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 1996. – Vol. 5, № 1. – P. 35–46.
433. Caimi P.G. Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens sacB* gene / P.G. Caimi, L.M. McCole, T.M. Klein, P.S. Kerr // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 110, № 2. – P. 355–363
434. Pilon-Smits E.A.H. Enhanced drought resistance in fructanproducing sugar beet / E.A.H. Pilon-Smits, N. Terry, T. Sears, K. van Dun // *Plant Physiol. Biochem.* – 1999. – Vol. 37, № 4. – P. 313–317.
435. Banguela A. Fructans: from natural sources to transgenic plants / A. Banguela, Lázaro Hernández. // *Biotechnol. Aplicada.* – 2006. – Vol. 23. – P. 202–210.
436. Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyl transferase / N. Sprenger, L. Schellenbaum, K. Van Dun [et al.] // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 400, № 3. – P. 355–358.

437. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots / E.M. Hellwege, S. Czaplá, A. Jahnke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2000. – Vol. 97, №15. – P. 8699–8704.
438. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase / I. Vijn, A. van Dijken, N. Sprenger [et al.] // Plant J. – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 387–398.
439. Van der Meer I.M. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke / I.M. Van der Meer, A.J. Koops, J.C. Hakkert, A.J. Van Tunen // Plant J. – 1998. – Vol. 15, № 4. – P. 489–500.
440. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet / R. Sévenier, R.D. Hall, I.M. Van der Meer [et al.] // Nat. Biotechnol. – 1998. – Vol. 16, № 9. – P. 843–846.
441. Carbohydrate profiling in seeds and seedlings of transgenic triticale modified in the expression of sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase (1-SST) and sucrose:fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT) / C. Diedhiou, D. Gaudet, Y. Liang // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – Vol. 114, № 4. – P. 371–378.
442. Tiwari S. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens / S. Tiwari, P. C. Verma, P. K. Singh, R. Tuli. // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27. – P. 449–467.
443. Orzáez D. Manufacturing antibodies in the plant cell / D. Orzáez, A. Granell, M. A. Blázquez // Biotechnol. J. – 2009. – Vol. 4, № 12. – P. 1712–1724.
444. Daniell H. Plant-made vaccine antigens and Biopharmaceuticals / H. Daniell, Nameirakpam D. Singh, H. Mason, S. J. Streatfield // Trends in Plant Sci. – 2009. – Vol. 14, № 12. – P. 669–679.
445. Sharma A. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities / A. K. Sharma, M. K. Sharma // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27. – P. 811–832
446. Hairy roots as a vaccine production and delivery system / M. Skarjinskaia, K. Ruby, A. Araujo [et al.] // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2013. – Vol. 134. – P. 115–134.
447. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins / R. Fischer, S. Schillberg, S. Hellwig [et al.] // Biotechnol. Adv. – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 434–439.

448. Jansen P. L. Controlled-release interferon alpha 2b, a new member of the interferon family for the treatment of chronic hepatitis C / P. L. Jansen, J. De Bruijne // *Expert Opin. Investig. Drugs*. – 2012. – Vol. 21, № 1. – P. 111–118.
449. Rosales-Mendoza S. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague / S. Rosales-Mendoza, R. E. Soria-Guerra, L. Moreno-Fierros, A. Alpuche-Solís // *Planta*. – 2010. – Vol. 232, № 2. – P. 409–416.
450. Li Y., Huang H., Wu Y. L. Qinghaosu (artemisinin)—a fantastic antimalarial drug from a traditional Chinese medicine. In: Liang XT, Fang WS (eds) *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. Wiley, New York. 2006. – P. 183–256.
451. Quality of artemisinin-based combination formulations for malaria treatment: prevalence and risk factors for poor quality medicines in public facilities and private sector drug outlets in enugu, Nigeria / H. Kaur, E.L. Allan, I. Mamadu [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125577>.
452. Evidence of falciparum malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment / R. Leang, W.R. Taylor, D.M. Bouth [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – P. 4719–4726.
453. Implications of Glutathione Levels in the Plasmodium berghei Response to Chloroquine and Artemisinin / J. Vega-Rodríguez, R. Pastrana-Mena, K.N. Crespo-Lladó [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444287/>.
454. Bharati A. Artemisinin inhibits chloroplast electron transport activity: mode of action / A. Bharati, M. Kar, S.C. Sabat // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 6. – e38942.
455. Lai H. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds / H. Lai, T. Sasaki, N.P. Singh // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2005. – Vol. 9, № 5. – P. 995–1007.
456. Lai H.C. Development of artemisinin compounds for cancer treatment / H.C. Lai, N.P. Singh, T. Sasaki // *Invest. New Drugs*. – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 230–246.

457. Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells / C. Morrissey, B. Gallis, J.W. Solazzi [et al.] // *Anticancer Drugs*. – 2010. – Vol. 21, № 4. – P. 423–432.
458. New efficient artemisinin derived agents against human leukemia cells, human cytomegalovirus and *Plasmodium falciparum*: 2nd generation 1,2,4-trioxane-ferrocene hybrids / C. Reiter, T. Fröhlich, M. Zeino [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 97. – P. 164–172.
459. Trichome and artemisinin regulator 1 Is Required for Trichome Development and Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* / Tan H., Xiao L., Gao S. [et al.] // *Mol. Plant*. – 2015. – Vol. 8, №9. – P. 1396–1411.
460. Brown G. D. The Biosynthesis of Artemisinin (Qinghaosu) and the Phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao) / G. D. Brown // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 7603–7698.
461. Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan / A. Mannan, I. Ahmad, W. Arshad [et al.] // *Malaria J.* – 2010. – Vol. 9. – P. 299–310.
462. Obimba K.C. The significance of artemisinin in roll back malaria partnership programmes and cancer therapy/ K.C. Obimba // *Afr. J. Biochim. Res.* – 2012. – Vol. 6, №2. – P. 20–26.
463. Martin V.J. The *in vivo* synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli* / V.J. Martin, Y. Yoshikuni, J.D. Keasling // *Biotechnol. Bioeng.* – 2010. – Vol. 75. – P. 497–503.
464. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast / D.K. Ro, E.M. Paradise, M. Ouellet [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 440. – P. 940–943.
465. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-dien synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [et al.] / P. Mercke, M. Bengtsson, H. J. Bouwmeester [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 381. – P. 173–180.
466. Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production / D.H. Chen, C. J. Liu, H. C. Ye [et al.] // *Plant Cell Tis. Org. Cult.* – 1999. – Vol. 57, № 3. – P. 157–162.



467. Chen D. H. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation / D. H. Chen, H. C. Ye, G. F. Li // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 179–185.
468. Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. / J. L. Han, B. Liu Y., H. C. Ye [et al.] // *J. Integr. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 48, № 4. – P. 482–487.
469. Banyai W. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. / W. Banyai, C. Kirdmanee, M. Mii, K. Supaibulwatana // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2010. – Vol. 103, № 2. – P. 255–265.
470. Effects of *ipt* gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. / S. Geng, M. Ma, H. C. Ye [et al.] // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 160, № 4. – P. 691–698.
471. Alam P. Over-expression of HMG-CoA reductase and amorpho-4,11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content / P. Alam, M. Z. Abdin // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30, № 10. – P. 1919–1928.
472. Artemisinin biosynthesis enhancement in transgenic *Artemisia annua* plants by downregulation of the beta-caryophyllene synthase gene / J. L. Chen, H. M. Fang, Y. P. Ji [et al.] // *Planta Med.* – 2011. – Vol. 77, № 15. – P. 1759–1765.
473. Co-overexpression of the *HMGR* and *FPS* genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L. / Y. Wang, F. Jing, S. Yu [et al.] // *J. Med. Plants Res.* – 2011. – Vol. 5, № 15. – P. 3396–3403.
474. *In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin / R.U. Rehman, M. Israr, P.S. Srivastava, K. C. Bansal, M. Z. Abdin // *In vitro Cell. Devel. Biol. Plant.* - 2003. – Vol. 39, № 2. – P. 142 – 146.
475. Anti-inflammatory activity of roots of *Cichorium intybus* due to its inhibitory effect on various cytokines and antioxidant activity / W. Rizvi, M. Fayazuddin, S. Shariq [et al.] // *Anc. Sci. Life.* – 2014. – Vol. 34, № 1. – P. 44–49.

476. Evaluation of hepatocyteprotective and anti-hepatitis B virus properties of Cichoric acid from *Cichorium intybus* leaves in cell culture / H.L. Zhang, L.H. Dai, Y.H. Wu [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2014. – Vol. 37, № 7. – P. 1214–1220.
477. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats / K.D. Ahmad, S.N. Gilani, A.H. Akhta, L. Khan // Pakistan. J. of Scie. and Industrial Res. - 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 92 – 96.
478. Chicory (*Cichorium intybus* L.) root extract regulates the oxidative status and antioxidant gene transcripts in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity / Y.S. El-Sayed, M.A. Lebda, M. Hassinin, S.A. Neoman // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 3. – e0121549.
479. Ahmed B., Al-Howiriny Ta. A., Siddiqu A. B. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus* / B. Ahmed , Ta. A. Al-Howiriny, A. B. Siddiqu// J. Ethnopharmacol. – 2003. – Vol.87, № 2–3. – P. 237–240.
480. Antimalarial activity of Lactucin and Lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. / T. A. Bischoff , C. J. Kelley, Y. Karchesy [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2004. – Vol.95, № 2–3. – P. 455–457
481. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains / R. Al Akeel, Y. Al-Sheikh, A. Mateen [et al.] // Saudi J. Biol. Sci. – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 147–151.
482. Petrovic J. Antibacterial activity of *Cichorium intybus* / J. Petrovic, A. Stanojkovic, L. Comic, S. Curcic / Fitoterapia. – 2004. – Vol. 75, № 7–8. – P. 737–739
483. Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats / Pushparaj P.N., Low H.K., Manikandan J. [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2007. – Vol. 111, № 2. – P. 430–434.
484. Karimi M. The effects of cichorium intybus extract on the maturation and activity of dendritic cells / M.H. Karimi, S. Ebrahimnezhad, M. Namayandeh, Z. Amirghofran// DARU J. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 22. – Режим доступа: <http://www.darujps.com/content/22/1/28>.
485. Chicory, a typical vegetable in Mediterranean diet, exerts a therapeutic role in established atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / W.Lin, C.Liu, H.Yang [et al.] // Mol. Nutr. Food. Res. – 2015. – Vol. 59, № 9. – P. 1803–1813.

486. Protective effect of *Cichorium glandulosum* seeds from ultraviolet B-induced damage in rat liver mitochondria / B. Huang, Y. Chen, B. Ma [et al.] // Food Funct. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 869–875.
487. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: II. Effect of different hormonal treatments / P. Profumo, P. Gastaldo, L. Caffaro [et al.] // Protoplasma. – 1985. – Vol. 126, № 3. – P. 215 – 220.
488. Buhara Yucesan. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) / Buhara Yucesan, Arzu Ucar Turker, Ekrem Gurel // Plant Cell, Tiss. Organ Culture. – 2007. – Vol. 91, № 3. – P. 243 – 250.
489. Velayuthan P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. – an important medicinal plant / P. Velayuthan, B.D. Ranjithakumari, P. Baskaran // J. Agricult. Technol. – 2006. – Vol. 2, № 2. – P. 287 – 298.
490. Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development / A. Charman, A.-S. Blervacq, J. Vasseur, J.-L. Hilbert // Planta. – 2000. - Vol. 211, № 3, – P. 305 – 314.
491. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory – In vitro shoot regeneration and induction of flowering / Harsh Pal Bais, R. T. Venkatesh, Arun Chandrashekar, G. A. Ravishankar // Current Sci. – 2001. – Vol. 80, № 1. – P. 83 – 87.
492. Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes* - transformed chicory regenerants flowering *in vitro* / M. D. Bogdanović, S. I. Todorović, T. Banjanac [et al.] // Industr. Crops Prod. – 2014. – Vol. 60. – P. 52–59.
493. George J. Production of esculin by hairy root cultures of chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Lucknow local) / J. George, H. Bais, G. A. Ravishankar // IJEB. – 1999. – Vol.37, № 3. – P. 269-273.
494. Establishment of a highly efficient genetic transformation system in *Cichorium intybus* / C. L. Mei, C. Q. Fen, Huang Jing [et al.] // Acta Prataculturae Sinica. – 2004. – Vol. 13, № 6. – P. 112 – 116.
495. Transformation of chicory and expression of the bacterial *uidA* and *nptII* genes in the transgenic regenerants / Abid Malika, Benoît Palms, Riet Derycke [et al.] // J. Exp. Bot. – 1995. – Vol 46, № 3. – P. 337 – 346.

496. Frulleux F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of shoot-buds of chicory / F. Frulleux, G. Weyens, M. Jacobs // Plant Cell Tiss. Organ Culture. – 1997. – Vol. 50, № 2. – P. 107 – 112.
497. *Agrobacterium* mediated transfer of a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) / A. Vermeulen, H. Vaucheret, V. Pautot [et al.] // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11, № 5-6. – P. 243 - 247.
498. Michelmore R.W. Eash Handbook of Plant Cell Culture. Lettuce. – New York: Macmillian, 1985. – P. 512–551.
499. Zobel R.W. Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants / R.W. Zobel, L.W. Roberts // Can. J. Bot. – 1978. – Vol. 56, № 8. – P. 987–990.
500. Stuart D.A. Induction of somatic embryogenesis using side chain and ring modified forms of phenoxy acid growth regulators / D.A. Stuart, C.M. McCall // Plant Physiol. – 1992. – Vol. 99, №1. – P. 111–118.
501. Taniguchi T. Effect of coconut water and coconut cream on organ development in calli of rice and lettuce / T. Taniguchi, Y. Sanada, E. Maeda // Rep. Tokai Branch of the Crop Sci. Society Japan. – 1987. – № 103. – P. 25–29.
502. Xiaoli Z. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons / Z. Xiaoli, H. Yang, Y. Wenjie, X. Ti // Ann. Bot. – 1992. – Vol. 69, № 2. – P. 97–100.
503. Alconero R. Regeneration of plants from cell suspensions of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa* and *Lactuca serriola* / R. Alconero // Hort. Sci. – 1983. – Vol. 18, № 3. – P. 305–307.
504. Teng W.L. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture / W.L. Teng, Y.J. Liu, T.S. Soong // Hort Sci. – 1992. – Vol. 27, № 9. – P. 1030–1032.
505. Zhang X.R. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons / X.R. Zhang, A.J. Conner // J. Genet. and Breed. – 1992. – Vol. 46, № 3. – P. 287 – 290.
506. Ampomah Dwamena C. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro / C. Ampomah Dwamena, A.J. Conner, A.G. Fautrier // Sci. Hortic. – 1997. – Vol. 71, № 3-4. – P. 137 – 145.

507. Агробактериальная трансформация салата *Lactuca sativa* L. конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* / Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский, КН.В. учук // Цитология и генетика. – 2009. – Т.43, № 2. – С. 27 – 32.
508. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / R.W. Michelmore, E. Marsh, S. Seely [et al.] // Plant Cell Rep. – 1987. – Vol.6, № 6. – P. 439 – 442.
509. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens* / I.S. Curtis, J.B. Power, N.W. Blackhall [et al.] // J. of Exp. Bot. – 1994. – Vol. 45, № 279. – P. 1441–1449.
510. Enomoto Sueo Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis-related protein gene promoter region / Enomoto Sueo, Hirotaka Itoh, Masahiro Ohshima, Yuko Ohashi // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9, № 1. – P. 6 – 9.
511. Kim J. H. Etr1-1 gene expression alters regeneration patterns in transgenic lettuce stimulating root formation / J. H. Kim, J.R. Botella // Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. – 2004. – Vol. 78, № 1. – P. 69 – 73.
512. Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) / E.Vanjildorj, T.-W. Bae, K.-Z. Riu [et al.] // Plant Cell Tiss. and Organ Cult. – 2005. – Vol.83, №1. – P. 41 – 50.
513. Kawazu Y. Transgenic resistance to Mirafiori lettuce virus in lettuce carrying inverted repeats of the viral coat protein gene / Y. Kawazu, R. Fujiyama, Y. Noguchi // Transgen. Res. – 2009. – Vol. 18, № 1. – P. 113 – 120.
514. Park B. J. Plant growth regulation increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA / B. J. Park, Z. Liu, A. Kanno, T. Kameya // Plant Growth Regulat. – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 165 – 171.
515. The overexpression of asparagine synthetase A from *E. coli* affects the nitrogen status in leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and enhances vegetative growth / D. Giannino, C. Nicolodi, G. Testone [et al.] // Euphytica. – 2008. – Vol. 162, № 1. – P. 11 – 22.

516. Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce / R.T. Nagata, J.A. Dusky, R.J. Ferl [et al.] // J.Amer. Soc. Hort. Sci. – 2000. – Vol. 125, № 6. – P. 669 – 672
517. Expression of the Bar Gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce / U. Mohapatra, M.S. McCabe, J. B. Power [et al.] // Transgen. Res. – 1999. – Vol. 8, № 1. – P. 33 – 44.
518. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin / F. Goto, T. Yoshihara, H. Saiki [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2000. – Vol. 100, № 5. – P. 658 – 664.
519. Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce / M.S. McCabe, L.C. Garratt, F. Schepers [et al.] // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127, № 2. – P. 505–516.
520. Strong increase of foliar inulin occurs in transgenic lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) overexpressing the Asparagine Synthetase A gene from *Escherichia coli* / A.P. Sobolev, A.L. Segre, D. Giannino [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 26. – P.10827–10831.
521. Sun H.J. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce / H.J. Sun, M.L. Cui, B. Ma, H. Ezura // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580, №2. – P.620–626.
522. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants / L. Penarrubia, R. Kim, J. Giovannoni [et al.] // Biotechnology. – 1992. – Vol. 10. – P. 561–563.
523. Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains / S. Dinant, B. Maisonneuve, J. Albouy [et al.] // Mol. Breeding. – 1997. – Vol. 3, № 1. – P. 75 – 86.
524. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus / J. Kapusta, A. Modelska, M. Figlerowicz [et al.] // FASEB J. – 1999. – Vol. 13, № 13. – P. 1796 – 1799.
525. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) / T.G. Kim, M.Y. Kim, B.G. Kim [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2007. – Vol. 51, № 1. – P. 22–27.
526. Transgenic lettuce producing a candidate protein for vaccine against Edema Disease / T. Matsui, H. Asao, M. Ki [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2009. – Vol. 73, № 7. – P. 1628–1634.

527. Yang Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using Agrobacterium-mediated transformation system / Y. S. Kim, B. G. Kim, T. G. Kim [et al.] // Plant Cell, Tiss. and Organ Culture. – 2006. – Vol. 87, № 2. – P. 203 – 210.
528. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce / Jing Lia, Min Chena, Xian-Wei Liua [et al.] // Sci. Hortic. – 2007. – Vol. 112, № 3. – P. 258 – 265.
529. Song L. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce / L. Song, D.G. Zhao, Y.J Wu, Y.B. Li // J. Zhej. Univ. Sci. – 2008. – Vol. 9, № 5. – P. 351–355
530. Матвеева Н.А. Агробактериальная трансформация салата *Lactuca sativa* L. конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* / Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // Цитол. и генет. – 2009. – Т.43, № 2. – С. 27 – 32.
531. Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) expressing H1N1 influenza surface antigen (neuraminidase) / C.-W. Liu, J. J. W. Chen, C.-C. Kang, C.-H.Wu [et al.] // Sci. Hortic. – 2012. – Vol. 139. – P. 8–13.
532. Jing J. Establishment of genetic transformation system of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* and introduction of HIV gap-gp120 gene / J. Jing, J. Ji, G. Wang // Tianjin Agric. Sci. – 2007. – Vol. 13, № 1. – P. 14–17.
533. Li H. Y. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines / H. Y. Li, S. Ramalingam, M. L. Chye // Exp. Biol. Med. – 2006. – Vol. 231, № 8. – P. 1346–1352.
534. Deng X.-L. Transformation of Lettuce with FMDV Epitopes Fused Gene Mediated by *Agrobacterium* / X.-L. Deng, J.-L. Chang, J. He, G.-C. He // Plant Sci. J. – 2006. – Vol. 4, № 5. – P. 476–479.
535. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) / C.L.C. Lelivelt, M.S. McCabe, C.A. Newell [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2005. – Vol. 58, № 6. – P. 763 – 774
536. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids / H. Kamamoto, A. Yamashita, H. Asao [et al.] // Transgen. Res. – 2006. – Vol.15, № 2. – P. 205 – 217.

537. Turi C.E. North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (Sagebrush): A phytochemical, botanical and pharmacological review / C.E. Turi, P.R. Shipley, S.J. Murch // *Phytochem.* – 2014. – Vol. 98. – P. 9-26.
538. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis / G. Sujatha, S. Zdravković-Korać, D. Čalić [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2013. – Vol. 44. – P. 643–652
539. Sesquiterpenes from the aerial parts of *Artemisia vestita* Wall. / T. Shuaihua, W. Helin, Z. Mingbo [et al.] // *JCPS.* – 2013. – Vol. 22, № 6. – P. 527–530.
540. Khan S. Affordable and rapid HPTLC method for the simultaneous analysis of artemisinin and its metabolite artemisinic acid in *Artemisia annua* L. / S. Khan, A. Ali, S. Ahmad, M.Z. Abdin // *Biomed. Chromatogr.* – 2015. – Vol. 29, № 10. – P. 1594–1603.
541. Tasdemir D. Antiprotozoal effect of *Artemisia indica* extracts and essential oil / D. Tasdemir, M. Tierney, R. Sen // *Planta Med.* – 2015. – Vol. 81, № 12-13. – P. 1029–1037.
542. Mojarrab M. Screening of different extracts from artemisia species for their potential antimalarial activity / M. Mojarrab, R. Naderi, F. Heshmati Afshar // *Iran J. Pharm. Res.* – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 603–608.
543. Pandey N. Updates on artemisinin: an insight to mode of actions and strategies for enhanced global production / N. Pandey, S. Pandey-Rai // *Protoplasma.* – 2015. – Vol. 253, №1. – P. 15-30.
544. Antidiabetic effects of aqueous infusions of *Artemisia herba-alba* and *Ajuga iva* in alloxan-induced diabetic rats / A. Boudjelal, L. Siracusa, C. Henchiri [et al.] // *Planta Med.* – 2015. – Vol. 81, № 9. – P. 696–704.
545. Antidiabetic activity of *Artemisia amygdalina* Decne in streptozotocin induced diabetic rats / K. Ghazanfar, B.A. Ganai, S. Akbar [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/185676/>.
546. Jang M. Extraction Optimization for Obtaining *Artemisia capillaris* Extract with High Anti-Inflammatory Activity in RAW 264.7 Macrophage Cells / M. Jang, S.W. Jeong, B.K. Kim, J.C. Kim // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/872718>.



547. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts / K. Durić, E.E. Kovac Besovic, H. Niksic [et al.] // *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 15, № 2. – P. 9–14.
548. Artemisinin reduces cell proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma / S. Zhu, W. Liu, X. Ke [et al.] // *Oncol. Rep.* –2014. – Vol. 32, № 3. – P. 1094–1100.
549. Influence of *Artemisia annua* extract derivatives on proliferation, apoptosis and metastasis of osteosarcoma cells / C. Tang, Y. Zhao, S. Huang, [et al.] // *Pak. J. Pharm. Sci.* –2015. – Vol. 28, № 2. – P. 773–779.
550. Metabolic profiling of antioxidants constituents in *Artemisia selengensis* leaves / L. Zhang, Z.C. Tu, H. Wang [et al.] // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 186. – P. 123–132.
551. Tang K. Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. / K. Tang, Q. Shen, T. Yan, X. Fu // *Plant Cell Rep.* – 2014.– Vol. 33, № 4. – P. 605–615
552. Chen D. H. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation / D. H. Chen, H. C. Ye, G. F. Li // *Plant Sci.* –2000. – Vol. 155, № 2. – P. 179–185.
553. Han J. Effects of overexpression of AaWRKY1 on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants / J. Han, H. Wang, A. Lundgren, P.E. Brodelius // *Phytochem.* – 2014. – Vol. 102. – P. 89-96.
554. Giri A. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy root and artemisinin production in *Artemisia annua* / A. Giri, S. T. Ravundra, V. Dhingra, M. L. Narasu // *Cur. Sci.* – 2001. – Vol. 81, № 4. – P. 4–25
555. Weathers P. J. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots / P. J. Weathers, G. Bunk, M. C. McCoy // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 47–53.
556. Patra N. Enhanced production of artemisinin by hairy root cultivation of *Artemisia annua* in a modified stirred tank reactor / N. Patra, A.K. Srivastava // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 174, № 6. – P. 2209–2222.
557. Wyslouzil B. E. The growth of single roots of *Artemisia annua* in nutrient mist reactors / B. E. Wyslouzil, R. G. Waterbury, P. J. Weathers // *Biotechnol. Bioeng.* – 2000. – Vol. 70, № 2. – P. 143–150.

558. Kim Y. J. Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas-phase reactors / Y. J. Kim, P. J. Weathers, B. E. Wyslouzil // *Biotechnol. Bioeng.* – 2002. – Vol. 80, № 4. – P. 454–464.
559. Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression / F. F. Souret, Y. Kim, B. E. Wyslouzil [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 83, № 6. – P. 653–667.
560. Kim Y. J. Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems / Y. J. Kim, P. J. Weathers, B. E. Wyslouzil // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 83, № 4. – P. 428–443.
561. Sharafi A. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Artemisia aucheri* Boiss / A. Sharafi, H.H. Sohi, H. Mirzaee, P. Azadi // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2014. – Vol. 20, № 4. – P. 487–494.
562. Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica* / A. Mannan, N. Shaheen, W. Arshad [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 7, № 18. – P. 3288–3292.
563. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) and production of secondary metabolites / S. Nin, G. Bennici, D. Roselli [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1997. – Vol. 16, № 10. – P. 725–730.
564. Enhanced production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia dubia* / M. Ali, B.H. Kiani, A. Mannan [et al.] // *J. Med. Plant. Res.* – 2012. – Vol. 6, № 9. – P. 1619–1622.
565. Griffin D. Contributions to the ethnobotany of the Cyp'it Eskimo, Nunivac Island, Alaska / D. Griffin // *J. of Ethnobiol.* – 2001. – Vol. 21, № 2. – P. 91–127.
566. Kirakosyan A., Kaufman P. B. *Recent Advances in Plant Biotechnology.* – Springer Science and Business Media, 2009. – P. 380–382.
567. Essential oil compositions and anticholinesterase activities of two edible plants *Tragopogon latifolius* var. *angustifolius* and *Lycopsis orientalis* / A. Ertaş, A.C. Gören, M. Boğa [et al.] // *Nat. Prod. Res.* – 2014. – Vol. 28, № 17. – P. 1405–1408.
568. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Tragopogon graminifolius*, a medicinal herb from Iran / M.H. Farzaei, R. Rahimi, F. Attar [et al.] // *Nat. Prod. Commun.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 121–124.

569. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line--pilot study / M. Wegiera, H.D. Smolarz, M. Jedruch [et al.] // *Acta Pol. Pharm.* – 2012. – Vol. 69, № 2. – P. 263–268.
570. Phenolic compounds from *Allium schoenoprasum*, *Tragopogon pratensis* and *Rumex acetosa* and their antiproliferative effects / Z. Kucekova, J. Mlcek, P. Humpolicek [et al.] // *Molecules.* – 2011. – Vol. 16, № 11. – P. 9207–9217.
571. Tenkerian C. A. Anticancer and Antioxidant Effects of *Tragopogon porrifolius* extract// A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Molecular Biology / C. A. Tenkerian. – 2011. – 54 p.
572. Bibenzyls and dihydroisocoumarins from white salsify (*Tragopogon porrifolius* subsp. *porrifolius*) / C. Zidorn, U. Lohwasser, S. Pschorr [et al.] // *Phytochem.* – 2005. – Vol. 66. – P. 1691–1697.
573. Phenolic compounds from *Tragopogon porrifolius* L. / V. Sareedenchai, M. Ganzera, E.P. Ellmerer [et al.] // *Biochem. Sys. Ecol.* – 2009. – Vol. 37. – P. 234–236
574. Tenkerian C. Hepatoprotective, antioxidant, and anticancer effects of the *Tragopogon porrifolius* methanolic extract / C. Tenkerian, M. El-Sibai, C.F. Daher, M. Mroueh / *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* – 2015. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324983>.
575. Zeeni N. *Tragopogon porrifolius* improves serum lipid profile and increases short-term satiety in rats / N. Zeeni, C.F. Daher, L. Saab, M. Mroueh // *Appetite.* – 2014. – Vol. 72. – P. 1–7.
576. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil / C.C. Borges, T. F. Matos, J. Moreora [et al.] // *Rev. bras. plantas med.* – 2013. – Vol.15, №1, – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100004>.
577. Flavonoids, centaurein and centaureidin from *Bidens pilosa* stimulate IFN-expression / S.L. Chang, Y.M Chiang, L.T. Chang [et al.] // *J. of Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol.112. – P. 232–236.
578. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. / F.L Silva, D.C. Fischer, J.F. Tavares [et al.] // *Molecules.* – 2011. – Vol. 16, № 2. – P.1070–1102.

579. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: a key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations / D.F. Cortes-Rojas, D.A. Chagas-Paula, F.B. Da Costa [et al.] // Rev. Bras. Farmacogn. – 2013. – Vol. 23. – P. 28–35.
580. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae) / F. Fotso, F. Longo, P. D. Djomeni [et al.] // Inflammopharmacol. – 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 105–114.
581. Anti-*Herpes simplex* virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata* / L.C. Chiang, J.S. Chang, C.C. Chen [et al.] // Am. J. Chin. Med. – 2003. – Vol. 31, № 3. – P. 355–362.
582. Yang Wc. Botanical, pharmacological, phytochemical and toxicological aspects of the antidiabetic plant *Bidens pilosa* L. / Wc. Yang // Evid. Based. Complement. Alternat. Med. – 2014. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698617>.
583. *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic / J. J. Silva, C.D. Cerdeira, J.M. Chavasco [et al.] // Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. – 2014. – Vol. 56, №4. – P. 333–340.
584. Efficacy of *Bidens pilosa* extract against Herpes Simplex Virus infection *in vitro* and *in vivo*/ S. Nakama, K. Tamaki, C. Ishikawa [et al.] // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2012. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/413453>.
585. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity / M.R. Kwiecinski, P. Benelli, K.B. Felipe [et al.] // J. Supercritical Fluids. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 243–248.
586. Wang C.-K. Transformation and characterization of transgenic *Bidens pilosa* L. / C.-K. Wang, S.-Y. Hsu, P.-Y. Chen, K.-Y. To // Plant Cell Tiss. and Organ Cult. – 2012. – Vol. 109, № 3. – P. 457–464.
587. Гродзинський А.М. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник // Під ред. А.М. Гродзинського. – К.: Українська енциклопедія. 1989. – с. 37-38.
588. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. / S. M. Ali Shah, Naveed Akhtar, M. Akram [et al.] // J. Med. Plants Res. – 2011. – Vol. 5, № 24. – P. 5662–5666.

589. Polyprenols from leaves and stems of the plant *Althaea officinalis* / N. Khidyrova, E.V. Van, R. Shakhidoyatov [et al.] // Chem. Nat. Compd. – 2012. – Vol. 48. – P. 358–360.
590. Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althaea officinalis* L.): cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro / A. Deters, J. Zippel, N. Hellenbrand [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2010. – Vol. 127, № 1. – P. 62–69.
591. Evaluation of the antibacterial activity of the *Althaea officinalis* L. leaf extract and its wound healing potency in the rat model of excision wound creation / M. Rezaei, Z. Dadgar, A. Noori-Zadeh [et al.] // Avicenna J. Phytomed. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 105–112.
592. Antitussive activity of *Althaea officinalis* L. polysaccharide rhamnogalacturonan and its changes in guinea pigs with ovalbumine-induced airways inflammation / M. Sutovska, P. Capek, S. Franova [et al.] // Bratisl. Lek. Listy. – 2011. – Vol. 112, № 12. – P. 670–675.
593. Alani B. Bronchodilatory and B-adrenergic effects of methanolic and aqueous extracts of *Althaea* root on isolated tracheobronchial smooth rat muscle / B. Alani, M. Zare, M. Nouredini // Adv. Biomed. Res. – 2015. – Vol. 4. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386210>.
594. Hypoglycemic activity evaluation and chemical study on hollyhock flowers / Y. Zhang, L. Jin, Q. Chen [et al.] // Fitoter. – 2015. – Vol. 102. – P. 7–14.
595. The antioxidant and Flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color / P. Sadighara, S. Gharibi, A. Moghadam Jafari, [et al.] // Avicenna J. Phytomed. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 113–117.
596. Pakrokh Ghavi P. The extraction process optimization of antioxidant polysaccharides from Marshmallow (*Althaea officinalis* L.) roots / P. Pakrokh Ghavi // Int. J. Biol. Macromol. – 2015. – Vol. 75. – P. 51–57.
597. Naz R. Acceleration of adventitious shoots by interaction between exogenous hormone and adenine sulphate in *Althaea officinalis* L. / R. Naz, M. Anis // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – Vol. 168, № 5. – P. 1239–1255.

598. Drake P.M. Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N / P.M. Drake, L. de Moraes Madeira, T.H. Szeto, J.K. Ma // Transgenic Res. – 2013. – Vol. 22, № 6. – P. 1225–1229.
599. Lemon G. D., Posluszny U., Husband B. C. Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia borealis* // Aquatic Botany. - 2001. - Vol. 70, № 1. – P.79–87
600. Geoffroy L. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin / L. Geoffroy, C. Frankart, P. Eullaffroy // Environmental Pollution. – 2004. – Vol. 131, № 2. – P. 233–241.
601. Drost W. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure / W. Drost, M. Matzke, T. Backhaus // Chemosphere. – 2007. – Vol. 67, № 1. – P. 36–43.
602. Bergmann B. A. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation / B. A. Bergmann, J. Classen, J. Cheng, A.-M. Stomp // Bioresource Technol. – 2000. – Vol. 73, № 1. – P. 13–20.
603. Heavy metal removal in duckweed and algae ponds as a polishing step for textile wastewater treatment / B. Christian, Sekomo, P.L. Diederik [et al.] // Ecol. Engineering. – 2012. – Vol. 44. – P. 102–110.
604. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation / K.-J. Appenroth, K. Krech, Á. Keresztes [et al.] // Chemosphere. – 2010. – Vol. 78, № 3. – P. 216–223.
605. Rai P.K. Phytoremediation of heavy metals in a tropical impoundment of industrial region / P.K. Rai // Environ. Monit Assess. – 2010. – V.165, № 1-4. – P. 529-537.
606. Гастроцитопротективное действие лемнана, пектинового полисахарида, выделенного из ряски малой *Lemna minor* L. / Э.И. Хасина, М.Н. Сгребнева, Р.Г. Оводова [и др.] // ДАН. – 2003. – Т. 390, № 3. – С. 413-415.
607. Cheng L. Detection and homogeneity of cell wall pectic polysaccharides of *Lemna minor* / L. Cheng, P.K. Kindel // Carb. Res. – 1997. – V. 301, № 3-4. – P. 205–212.

608. Cryoprotective action of lemnan, a pectin from the duckweed *Lemna minor* / E.P. Svedentsov, T.V. Tumanova, R.G. Ovodova [et al.] // Dokl. Biol. Sci. – 2008. – Vol. 421. – P. 233–234.
609. Rusoff L.L. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids / L.L. Rusoff, Jr. E. W. Blakeney, D. Dudley, Jr. Culley // J. Agric. Food Chem. – 1980. – Vol. 28, № 4. – P. 848–850.
610. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* / Y.T. Yamamoto, N. Rajbhandari, X.H. Lin [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2001. – Vol. 37, № 3. – P. 349–353.
611. Stomp A.M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing / A.M. Stomp // Biotechnol. Annu. Rev. – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 69–99.
612. Stefaniak B. Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. / B. Stefaniak, A. Woźny, I. Budna // Biol. Plant. – 2002. – Vol. 45, №3. – P. 469–472.
613. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* / J. Li, M. Jain, R. Vunsh [et al.] // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22, №7. – P.457–464.
614. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment // Aquatic Bot. - 2002. – Vol.72, № 2. – P. 175–181
615. Boenm R., Kruse C., Voeste D., Barth S., Schnalb H. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using Agrobacterium-mediated gene transfer / C. Kruse, R. Boehm, D. Voeste [et al.] // J. Appl. Bot. – 2001. – Vol. 75, № 3-4. – P. 107–111.
616. Разработка системы генетической трансформации ряски малой (*Lemna minor*) / С.Е. Гайдукова, А.Л. Ракитин, Н.В. Равин [и др.] // Экол. генет. – 2008. – Т.6, № 4 – С. 13–15.
617. Chhabra G. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants / G. Chhabra, D. Chaudhary, M. Sainger, P.K. Jaiwal // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 129–136.
618. Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 / Y. Sun, J.J. Cheng, M.E. Himmel [et al.] // Bioresour. Technol. – 2007. – Vol. 98, № 15. – P. 2866–2872.

619. Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic *Lemna* for purification process development / S.L. Woodard, L.R. Wilken, G.O. Barros [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol. 104, № 3. – P. 562–571.
620. United States Patent 7161064. Method for producing stably transformed duckweed using microprojectile bombardment / A.-M. Stomp, N. Rajbhandari; Application Number: 10/273974 Publication Date: 01/09/2007.
621. Patent WO/2005/005643 Chloroplast transformation of duckweed / Cox K., Peele C.; Biolex Inc, Cox Kevin M, Peele Charles G., PCT/US2004/021106, Publication Date: 20.01.2005, International Filing Date: 30.06.2004.
622. Stomp A.-M., Rajbhandari N. Genetically engineered duckweed // United States Patent 6040498 Application Number: 09/132536 Publication Date:03/21/2000.
623. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants / A. Firsov, I. Tarasenko, T. Mitouchkina [et al.] // *Mol Biotechnol.* – 2015. – Vol. 57, № 7. – P. 653–661.
624. Chemical composition, phytotoxic and antifungal properties of *Ruta chalepensis* L. essential oils / W. Bouabidi, M. Hanana, S. Gargouri [et al.] // *Nat. Prod. Res.* – 2015. – Vol. 29, № 9. – P. 864–868.
625. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria / F. Haddouchi, T.M. Chaouche, Y. Zaouali [et al.] // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141, № 1. – P. 253–258.
626. De Feo V. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens* / V. De Feo, F. De Simone, F. Senatore // *Phytochem.* – 2002. – Vol. 61. – P. 573–578.
627. Ratheesh M. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats / M. Ratheesh, A. Helen // *Afr. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 6, № 10. – P. 1209–1211.
628. Biting deterrence, repellency, and larvicidal activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) essential oil and its major individual constituents against mosquitoes / A. Ali, B. Demirci, H.T. Kiyani [et al.] // *J. Med. Entomol.* – 2013. – Vol. 50, 6. – P. 1267–1274.
629. Biological activity of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae / F.



- Mancebo, L. Hilje, G.A. Mora [et al.] // Rev. Biol. Trop. – 2001. – Vol. 49, № 2. – P. 501–508.
630. Trovato A. In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids / A. Trovato, M.T. Monforte, A.M. Forestieri, F. Pizzimenti // Boll. Chim. Farm. – 2000. – Vol. 139, № 5. – P. 225-227.
631. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland / T. Ojala, S. Remes, P. Haansuu [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2000. – Vol. 73, № 1-2. – P. 299-305.
632. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens* // A. Ivanova, B. Mikhova, H. Najdenski [et al.] // Fitoter. – 2005. – Vol. 76, № 3-4. – P. 344-347.
633. França Orlanda J.F. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil / J.F. França Orlanda, A.R. Nascimento // South African J. of Bot. – 2015. – Vol. 99. – P. 103–106.
634. Alzoreky N.S. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia / N.S. Alzoreky, K. Nakahara // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 80, № 3. – P. 223–230.
635. Ratheesh M. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats / M. Ratheesh, G.L. Shyni, G. Sindhu, A. Helen // Exp. Toxicol. Pathol. – 2011. – Vol. 63. – P. 285–290.
636. Biological effects of rutin on the survival of *Escherichia coli* AB1157 and on the electrophoretic mobility of plasmid PUC 9.1 DNA / L.C. Bernardo, M.B. de Oliveira, C.R. da Silva [et al.] // Cell Mol. Biol. – 2002. – Vol. 48, № 5. – P. 517–520.
637. Ratheesh M. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats / M. Ratheesh, A. Helen // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 6, № 10. – P. 1209–1211.
638. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival / K. Fadlalla, A. Watson, T. Yehualaeshet [et al.] // Anticancer Res. – 2011. – Vol. 31. – P. 233–241.
639. Preethi K.C. Anti-tumour activity of *Ruta graveolens* extract / K.C. Preethi, G. Kuttan, R. Kuttan // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2006. – Vol. 7, № 3. – P. 439–443.

640. *Ruta graveolens* L. induces death of glioblastoma cells and neural progenitors, but not of neurons, via ERK 1/2 and AKT Activation / M.T. Gentile, C. Ciniglia, M.G. Reccia [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, – P. e0118864.
641. Faisal M. *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. a multipurpose shrub / M. Faisal, N. Ahmad, M. Anis // HortScience. – 2005. – Vol. 40. – P. 1478–1480.
642. Effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of 'Garden Rue' (*Ruta graveolens* L.) / S. Bohidar, M. Thirunavoukkarasu, T. Rao // Int. J. Integ. Biol. – 2008. – Vol. 3. – P. 36–43.
643. Mushfique M. Organogenesis and callogenesis in *Ruta graveolens* L. using nodal explants / M. Mushfique // Asian J. Biol. and Biotechnol. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 1–5.
644. Ahmad N. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. / N. Ahmad, M. Faisal, M. Anis, I.M. Aref // South African J. Bot. – 2010. – Vol. 76. – P. 597–600.
645. Tissue culture and evaluation of some active constituents of *Ruta graveolens* L.: Effect of plant growth regulators and explant type on growth of *Ruta graveolens* L. callus cultures / M.M. Shabana, T.S. El-Alfy, M.E. El-Tantawy [et al.] // Arab. J. Biotech. – 2002. – Vol. 5. – P. 45–46.
646. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Ruta graveolens* L. / K. Lièvre, T. Tran, S., Doerper [et al.] // Meth. Mol. Biol. – 2009. – Vol. 547. – P. 235–248.
647. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins / M. Sidwa-Gorycka, A. Krolicka, A. Orlita [et al.] // Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. – 2009. – Vol. 97, № 1. – P. 59–69.
648. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
649. Кищенко Е.М. Особенности экспрессии репортерного гена  $\beta$ -глюкуронидазы под контролем *35S* и *MilI* промоторов в трансгенных растениях / Е.М. Кищенко

- // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. редкол.:  
В.А.Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – Т. 9. – К.: Логос, 2010. – С. 261-267.
650. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование – М.: Мир, 1984. – 480 с.
651. Logemann J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues / J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer // *Analytical biochem.* – 1987. – Vol. 163, № 1. – P. 16 – 20.
652. Руководство по химическому и технологическому анализу воды: М.: Стройиздат. – 1973. – С. 146-148.
653. Шлык А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // *Биохим. методы в физиологии растений.* М.: Наука, 1975. – С. 154–170
654. Матвеева Н.А. Синтез інуліну в «бородатих» корнях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* / Н.А. Матвеева, О.М. Кіщенко, А.М. Шаховський, М.В. Кучук // *Біотехнол.* – 2011. – Т.4, №3. – С.56-63.
655. Методы биохимического исследования растений / Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. [и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С.143.
656. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – №72. – P. 248-254.
657. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. школа. – 1990. – 352 с.
658. Daniell H. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants / H. Daniell, S. J. Streatfield, K. Wycoff // *Trends Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6, № 5. – P. 219 – 226.
659. Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines / M.E. Horn, K.M. Pappu, M.R. Bailey [et al.] // *J. Drug Target.* – 2003. – Vol. 11, № 8-10. – P. 539 – 545.
660. Ki C.G. Biological activities of root of *Cichorium intybus* / C.G. Ki, D. Yim, S.Y. Lee // *Nat. Prod. Science.* – 1999. – Vol. 5, №. 4. – P. 155–158.
661. Gadgoli C. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* / C. Gadgoli, S.H. Mishra // *Ethanopharmacol.* - 1997. – Vol. 58, № 2. – P. 131–134.

662. Hughes R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon / R. Hughes, I.R Rowland. // *Carcinogen*. – 2001. – Vol. 22, № 1. – P. 43–47.
663. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$  в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації / Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський, І. М. Герасименко [та ін.] // *Біополімери і клітина*. – 2009. – Vol. 25, №2. – С. 120–125.
664. Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT6 / Матвеева Н.А., М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский [и др.] // *Цитология и генетика*. – 2011. – Т. 45, № 1. – С.11–17.
665. Assaad F. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis / F. Assaad, K.L. Tucker, E.R. Signer // *Plant. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 22, № 6. – P.1067–1085.
666. Curtis I.S. Leaf disk transformation / I.S. Curtis, M.I R. Davey, J. B. Power // *Meth. in Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 44, № 1. – P. 59–70.
667. Матвеева Н.А. Культура бородатых корней цикория с геном интерферона человека / Н.А. Матвеева, Е.Ю. Кваско, А.М. Шаховский, И.М. Герасименко // *Укр. біохім. журнал*. – 2010. – Т.82, №4, дод. 2. – С.278.
668. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with human interferon  $\alpha 2b$  gene / N.A. Matvieieva, Yu.I. Kudryavets, A.A. Likhova [et al.]// *Cytol. and Genet.* – 2012. – Т.46, № 5. – С.285-290.
669. Buhara Yucesan TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) / Buhara Yucesan, Arzu Ucar Turker, Ekrem Gurel // *Plant Cell, Tiss. and Organ Culture*. – 2007. – Vol. 91, № 3. – P. 243–250.
670. Velayutham P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L.– an important medicinal plant / P. Velayutham, B.D. Ranjitha Kumari, P. Baskaran // *J. of Agricult. Technol.* – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 287–298.
671. Caffaro L. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: 1. A cytological study / L. Caffaro, R. M. Dameri, P. Profumo, A. Bennici // *Protoplasma*. – 1982. – Vol. 111, № 2. – P. 107–112.

672. Sidikou-Seyni R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L. x *Cichorium endivia* L. / R. Sidikou-Seyni, C. Rambaud, J. Dubois, J. Vasseur // *Plant Cell, Tiss. and Organ Culture*. – 1992. – Vol. 29, № 2. – P. 83–91.
673. Heirwegh K. M. G. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, Compositae) / K. M. G. Heirwegh, Banerjee Nirmalya, K. van Nerum, E. de Langhe // *Plant Cell Rep.* – 1985. – Vol. 4, № 2. – P.108–111.
674. Velayutham P. Direct shoot regeneration from leaf explants of Chicory (*Cichorium intybus* L.) / P. Velayutham, B.D. Ranjitha Kumari // *Plant Cell Biotechnol. and Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 4, № 3-4. – P. 125–130.
675. Кищенко Е.М. Получение трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium rhizogenes* / Е.М. Кищенко, И.К. Комарницкий, Н.В. Кучук // *Цитология и генетика*. – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 9–13
676. Jia H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the *Apocynum venetum* / H. Jia, B. Zhao, X. Wang, Y. Wang // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. – 2008. – Vol. 24, № 10. – P. 1723–1728.
677. Subotić A. Direct Regeneration of Shoots from Hairy Root Cultures of *Centaurea erythraea* Inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* / A. Subotić, S. Budimir, D. Grubišić, I. Momčilović // *Biol. Plantarum*. – 2003. – Vol. 47, № 4. – P. 617–619.
678. Lee M.H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters / M.H. Lee, E.S. Yoon, J.H. Jeong, Y.E Choi // *Plant. Cell Rep.* – 2004. – Vol. 22, № 11. – P. 822–827.
679. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus* / P.S. Choi, Y.D. Kim, K.M. Choi [et al] // *Plant Cell Rep.* – 2004. – Vol. 22, № 11. – P. 828–831.
680. Zhou X. Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* and production of regenerative plants in hairy root cultures in maize / X. Zhou, J. Lu, J. Wang, X. Wang // *Sci. China Life Sci.* – 2006. – Vol. 49, № 4. – P. 305–310.
681. Wang Y.M. Regeneration of plants from callus tissues of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi* / Y.M. Wang, J.B. Wang, D. Luo, J.F. Jia // *Cell Res.* – 2001. – Vol. 11, № 4. – P. 79–84.

682. Moghaieb R.E. Shoot regeneration from GUS-transformed tomato (*Lycopersicon esculentum*) hairy root / R.E. Moghaieb, H. Saneoka, K. Fujita // Cell Mol. Biol. Lett. – 2004. – Vol. 9, № 3. – P. 439–449.
683. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies for of symbiotic nitrogen fixation / A. Petit, J. Stougaard, A. Kühle [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1987. – Vol. 207, № 2-3. – P. 245–250.
684. Hamill J.D. A spontaneous, light independent and prolific plant regeneration response from hairy roots of *Nicotiana glauca* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* / J.D. Hamill, M.J.C. Rhodes // J. Plant Physiol. – 1988. – Vol. 133, № 1. – P.506–509.
685. Transformation of Ipecac (*Cephaelis ipecacuanha*) with *Agrobacterium rhizogenes* / K. Yoshimatsu, K. Shimomura, M. Yamazaki [et al.] // Planta Med. – 2003. - Vol. 69, №. 11 – P. 1018–1023.
686. Christensen B. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with rol-genes is useful in molecular breeding towards compact growth / B. Christensen, M. Serek, R. Müller // Plant Cell Rep. – 2008. – Vol. 27, № 9. – P. 1485–1495.
687. Nilsson O. Getting to the Root: The Role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol Genes in the formation of hairy roots / O. Nilsson, O. Olsson // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 100, №3. – P. 463–473.
688. Michael T. The plant oncogenes *rol* A, B, and C from *Agrobacterium rhizogenes*: effects on morphology, development, and hormone metabolism / T. Michael, A. Spena // Meth. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 44, № 1. – P. 207–222.
689. *Tepfer D.* The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In: A. Puhler, ed, Molecular genetics of the bacteria plant interaction. Springer Verlag, Berlin,1983. – P. 248–258.
690. Hu Z.-B. Hairy root and its application in plant genetic engineering / Z.-B. Hu, Du Min // J. of Integrat. Plant Biol. – 2006. – Vol. 48, № 2. – P.121–127.
691. Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures / S. Banerjee, T.Q. Shang, A.Wilson [et al.]. // Biotechnol Bioeng. – 2002. –Vol. 77. – P. 462–466

692. Azlan G.J. Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins / G.J. Azlan, M. Marziah, M. Radzali, R. Johari // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2002. – Vol. 69. – P. 271–278.
693. Ayora-Talavera T. Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene / T. Ayora-Talavera, J. Chappell, E. Lozoya-Gloria, V.M. Loyola-Vargas // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2002. – Vol. 7. – P. 135–145.
694. Sevon N. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids / N. Sevon, C. Oksman, M. Kirsi // Planta Med. – 2002. – Vol. 68. – P. 859–868.
695. Srivastava S. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites / S. Srivastava, A. Srivastava // Crit Rev. Biotechnol. – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 29–43.
696. Mishra B.N. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites / B.N. Mishra, R. Ranjan // Biotechnol. Appl Biochem. – 2008. – Vol. 49. – P. 1–10.
697. Tian L. Using Hairy roots for production of valuable plant secondary metabolites / L.Tian // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2015. – Vol. 149. – P. 275–324.
698. Veena V. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications / V. Veena, C.G. Taylor // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 383–403.
699. Firoozabady E. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue / E. Firoozabady, Y. Moy, N. Courtney-Gutterson, Robinson K. // Bio/Technol. – 1994. – Vol. 12, № 6. – P. 609–613.
700. Yamakawa Y. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds / Y. Yamakawa, L.H. Chen // J. Jap. Soc. Hort. Sci. – 1996. – Vol. 64, № 4. – P. 741–747.
701. Perez-Molphe-Balch E. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues / E. Perez-Molphe-Balch, N. Ochoa-Alejo // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17, № 8. – P. 591–596.

702. Матвєєва Н.А. Перенесення в рослини ряски *Lemna minor* L. генів туберкульозних антигенів ESAT6 та AG85B шляхом *Agrobacterium rhizogenes* – опосередкованої трансформації / Н.А. Матвєєва, О.М. Кіщенко, А.М. Шаховський, М.В. Кучук // Біотехнол. – 2011. – Т.4, № 2. – С. 46-53.
703. Armitage P, Walden R., Draper J. Vectors for transformation of higher plants. In: Walden (ed), Plant Genetic Transformation and Gene Expression, Blackwell Sci. Pub.: Oxford, 1992. – P. 1–67.
704. Patent WO1999019498A1 Transgenic Lemnaceae / A. Blumenthal, M. Edelman, M. Flaishman, A. Perl; Yeda Research And Development Company, Ltd. – No EP1021552 A1.10/10/1997, EP19980947760, Patent Application PCT/IL 98/00487.
705. Huffman G.A. Hairy root inducing plasmid: physical map and homology to tumor inducing plasmids / G.A. Huffman, F.F. White, M.P. Gordon, G.W. Nester // J. Bacteriol. – 1984. – Vol. 157, № 1 – P. 269–276.
706. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* / F.F. White, B.H. Taylor, G.A. Huffman [et al.] // J. Bacteriol. – 1985. – Vol. 164, № 1. – P. 33–44.
707. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 / L. Jouanin, P. Guerche, N. Pamboukdjian [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1987. – Vol. 206, № 3. – P. 387–392.
708. Braun R.H. Evaluation of cauliflower transgenic for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / R.H. Braun, J.K. Reader, M.C. Christey // Acta Hort. – 2000. – Vol. 539. – P. 137–143.
709. Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots cotransformed with *A. rhizogenes* and a binary vector plasmid / H. Hatamoto, M. Boulter, A. Shirsat [et al.] // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9, № 2. – P. 88–92.
710. Kuzovkina I.N. Genetically transformed root cultures — generation, properties and application in plant sciences / I.N. Kuzovkina, B. Schneider // Progress in Bot. – 2006. – Vol. 67, № 3. – P. 275–314.
711. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects / S. Guillon, J. Trémouillaux-Guiller, P.K. Pati [et al.] // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – Vol. 9, № 3. – P. 341–346.



712. Christey M.C. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / M.C. Christey, R.H. Braun // *Methods Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 286, № 1. – P.47–60.
713. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture / M.-L. Zhou, X.-M. Zhu, J.-R. Shao [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 90, № 4. – P. 1229 – 1239.
714. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. / S. M. Alihah, Akhtar Naveed, M. Akram [et al.] // *J. of Med. Plants Res.* – 2011. – Vol. 5, № 24. – P. 5662–5666.
715. Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althaea officinalis* / J. Gudej // *Planta Med.* – 1991. – Vol. 57 – P. 284–285.
716. Chakraborty D. *In vitro* flowering of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench / D. Chakraborty, A. Bandhyopadhyay, P.K. Bhattacharyaa, K. Gupta // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 17–22.
717. Kalimuthu K. *In vitro* micropropagation of *Musa sapientum* L. (Cavendish Dwarf) / K. Kalimuthu, M. Saravankumar, R. Senthilkumar // *Afr. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1106–1109.
718. Baksha R. *In vitro* rapid clonal propagation of *Rauwolfia serpentina* (Linn.) / R. Baksha, M.A.A. Jahan, R. Khatun, J.L. Munshi // *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* – 2007. – Vol. 42. – P. 37–44.
719. Meena M.C. *In vitro* clonal propagation of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad: a threatened medicinal plant / M.C. Meena, V. Patni // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 147–152.
720. Harish Kumar Antibacterial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Ruta graveolens* L. / K. Harish Kumar, M. Shanmugavadivu, Ranjithkumar Rajamani, Selvam Kuppsam // *Internat. J. Bioscie. Nanosci.* – 2014. – Vol. 1, № 1. – P.9–11.
721. Ahmadi jalali Moghadam M. Study on antibacterial effect of *Ruta graveolens* extracts on pathogenic bacteria / M. Ahmadi jalali Moghadam, H. Honarmand, S. Falah-Delavar, A. Saeidinia // *Ann. of Biol. Res.* – 2012. – Vol. 3, № 9. – P. 4542–4454
722. Pandey P. Evaluation of antimicrobial activity of *Ruta graveolens* stem extracts by disc diffusion method / P. Pandey, A. Mehta, S. Hajra // *J. Phytol.* – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 92–95.

723. Mathews P. Phytochemical extraction of alkaloids from *Ruta graveolens* (snake repellent plant) and evaluation of its antibacterial and antifungal activity / P. Mathews, A. Lavanya, K.N. Abhijit // Intern. J. of Biol. Res. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 1–10.
724. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells / Raghav S. K., B. Gupta, C. Agrawal [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2006. – Vol. 104. – P. 234–239.
725. Matvieieva N. High frequency genetic transformation of *Cichorium intybus* L. using *nptIII* gene as a selective marker / N. Matvieieva, A. Shakhovsky, O. Kvasko, N. Kuchuk // Цитол. и генет. – 2015. – Т. 49, № 4. – С. 11–16.
726. Матвеева Н.А. Регенерация трансгенных растений из «бородатых» корней цикория *Cichorium intybus* L. Var *foliosum* Hegi / Н.А. Матвеева, Е.М. Кищенко, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // Цитол. и генет. – 2011. – №5. – С. 11–16.
727. Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT6 / Матвеева Н.А., М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский [и др.] // Цитология и генетика. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 11–17.
728. Матвеева Н.А. Особенности трансгенных растений салата с геном интерферона- $\alpha 2b$ , полученных путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации / Н.А. Матвеева, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, № 3. – С. 27–32.
729. Створення та вивчення трансгенних коренів *Althaea officinalis* L з геном інтерферону альфа 2b людини / Н.А. Матвєєва, Ю.Й. Кудрявєць, Ліхова О.А. [та ін. ] // Biotechnol. Acta – 2013. – Т. 6, № 2. – С. 74–79.
730. Матвєєва Н.А. Отримання «бородатих» коренів рослин *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis* з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / Н.А. Матвєєва // Вісник українського тов.-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 262–268.
731. Matvieieva N.A. An efficient regeneration system and antimicrobial activity of *Ruta graveolens* L. plants / N.A. Matvieieva, K.O. Drobot, L.A. Pasichnyk, N.V. Zhytkevych // Ecol. engineering and environment protection. – 2015, № 1. – P. 33–39.

732. Matvieieva N.A. *Artemisia tilesii* Ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky, V.B. Belokurova, K.O. Drobot // Preparative biochem. Biotechnol. – 2015. – Режим доступу: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2015>
733. Матвєєва Н.А. Отримання та культивування «бородатих» коренів рослин *Bidens pilosa* L. / Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський // Вісн укр тов-ва генетиків та селекціонерів. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 46–50.
734. Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism / S. Radić, Dr. Stipaničev, P. Cvjetko [et al.] // Ecotoxicol. – 2010. – Vol.19, № 1. – P. 216–222.
735. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*) / W. Hou, X. Chen, G. Song [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2007. – Vol. 45. – P. 62–69.
736. Naumann B. Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone / B. Naumann, M. Eberius, K.-J. Appenroth // J. Plant Physiol. – 2007. – Vol. 164. – P. 1656–1664.
737. Ater M. Tolerance and accumulation of copper and chromium in two duckweed species : *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. / M. Ater, N. Ait Ali, H. Kasmi // J. Water Sci. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 57– 67.
738. Ташире́в А.Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами / А.Б. Ташире́в // Мікробіол. журнал. – 1994. – Т.56, № 6. – С.89–100.
739. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитич. химии. – М.: Химия, 1979. – 480 с.
740. Матвєєва Н.А. Вплив шестивалентного хрому на ріст трансгенних рослин ряски в умовах *in vitro* / Н.А. Матвєєва, В.П. Дуплій // Вісник укр. тов.-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. –Т.9, № 2. – С.240–246.
741. Matvieieva N.A. Reduction of hexavalent chromium by duckweed (*Lemna minor*) in *in vitro* culture / N.A. Matvieieva, V.P. Dupliyi, V.O. Panov // Hydrob. j. – 2013. – Т.49, № 1. – С.58-67.

742. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress / E.H. Beck, S. Fettig, C. Knake [et al.] // J. of Biosci. – 2007. – Vol. 32. – P. 501–510.
743. Hinch D.K. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions / D.K. Hinch, E. Zuther, A.G. Heyer // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol.1612. – P. 172–177.
744. Inulin is a promising cryo- and lyoprotectant for PEGylated lipoplexes / W.L.J. Hinrichs, N.N. Sanders, S.C. Smedt [et al.] // J. Controlled Release. –2005. – Vol.103. – P. 465–479.
745. The effect of fructan on membrane lipid organization and dynamics in the dry state / I.J. Vereyken, V. Chupin, F.A. Hoekstra [et al.] // Biophys. J. –2003. – Vol. 84. – P. 3759–3766.
746. Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying / D.K. Hinch, D. III Livingston, R. Premakumar [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1768. – P. 1611–1619.
747. Vijn I. Fructan: more than a reserve carbohydrate? / I. Vijn, S. Smeekens // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 351–359.
748. Ritsema T. Engineering fructan metabolism in plants / T. Ritsema, S.CM. Smeekens // J. Plant Physiol. –2003. – Vol. 160. – P. 811–820.
749. Cairns A.J. Fructan biosynthesis in transgenic plants / A.J. Cairns // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54. – P. 549–567.
750. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots / E.M. Hellwege, S. Czapla, A. Jahnke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 8699–8704.
751. Molecular cloning and characterization of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Viguiera discolor* (*Asteraceae*) and its heterologous expression in *Pichia pastoris* / W. Ende, A. Laere, K. Roy [et al.] // Physiol. Plant. – 2005. – Vol. 125. – P. 419–429.

752. Матвеева Н.А. Ріст рослин при різних температурних умовах: чи відрізняються рослини Антарктики / Н.А. Матвеева, С.Е. Чапкевич, К.О. Дробот, В.П. Дуплій / Укр. антарктичний журнал. – 2011-2012. - №10-11. – С. 257-262.
753. Developmental modulation of inulin accumulation in storage organs of transgenic maize and transgenic potato / J.M. Stoop, J. Arkel, J.C. Hakkert [et al.] // Plant Sci. – 2007. – Vol. 173. – P. 172–181.
754. Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing-sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa* / H.J. Li, A.F. Yang, X.C. Zhang [et al.] // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2007. – Vol. 89. – P. 7–48.
755. De Roover L. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of *Cichorium* seedlings (*Cichorium intybus* L.) / L. De Roover, K. Vandenbranden, A. Van Laere, W. Van den Ende // Planta. – 2000. – Vol. 210. – P. 808–814.
756. Scheer H. Chlorophylls and carotenoids in: Encyclopedia of Biological Chemistry.- 2004. – P. 430–437.
757. Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll protein levels to high-light and low-light growth conditions / H.K. Lichtenthaler, G. Kuhn, U. Prenzel, [et al.] // Z. Naturforsch.- 1982. – Vol. 37, № 1. – P. 464–475.
758. Is light quality involved in the regulation of the photosynthetic apparatus in attached rice leaves? / J.Y. Yamazaki, Y. Kamimura, K. Nakayama [et al.] // Photosynth. Res. – 2010. – Vol. 105, № 1. – P. 63–71.
759. Zhang R.H. Effects of shading light quality at seedling stage on the photosynthesis and growth of ginger / R.H. Zhang, K. Xu // Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. – 2008. – Vol.19, № 3. – P.499–504.
760. Bajguz A. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide / A. Bajguz // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – Vol. 60, № 3. – P. 406–416.
761. Drażkiewicz M. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays* / M. Drażkiewicz, T. Baszyński // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2010. – Vol.73, №5. – P. 982–986.

762. Zengin F.K. The effects of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  on the contents of protein, abscisic acid, proline and chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings / F.K. Zengin // J. Environ. Biol. – 2006. – Vol. 27, № 2. – P. 441–448.
763. Jnandabhiram Chutia Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* linn.) genotypes of Assam, India ii. protein and proline status in seedlings under peg induced water stress / Jnandabhiram Chutia, Sailen Prasad Borah // Am. J. of Plant Scie. – 2012. – Vol. 3. – P. 971–980.
764. Матвєєва Н.А. Вміст фотосинтетичних пігментів у трансгенних рослинах цикорію з геном туберкульозного антигена ESAT 6 / Н.А. Матвєєва, О.Ю. Кваско // Вісн. Дон. нац. універ. Сер.А: Прир.науки. – 2010, вип.2. – С. 249-253.
765. Матвєєва Н.А. Особливості накопичення поліфруктанів в трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. / Н.А. Матвєєва, О.Ю. Кваско // Вісник укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 1. – С.65–69.
766. Використання регуляторів росту рослин для інтенсифікації росту біомаси та підвищення вмісту поліфруктанів в культурі «бородатих коренів» цикорію / Н.А. Матвєєва, В.А. Циганкова, С.Е. Чапкевич [та ін.] // Вісник укр. тов. генетиків і селекціонерів. – 2012. –Т.10, № 2. – С.269–278.
767. Матвєєва Н.А. Накопичення фруктозовмісних цукрів в культурі трансгенних коренів лікарських рослин / Н.А. Матвєєва, К.О. Дробот // Фізіол. та біохім. культурних рослин. – 2015. – Т.47, №1. – С.74–79.
768. Матвєєва Н.А. Вплив трансформації на накопичення біологічно активних сполук у «бородатих» коренях *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* / Н.А. Матвєєва, К.О. Дробот // Фактори експеримент. еволюції організмів. – 2015. – Т.17. – С.205–208.
769. Остапчук А. Вивчення «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb / А. Остапчук, Н. Матвєєва // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and research of international research, education and development programme “Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality” Ed. J. Brindza, S. Klimenko – Nitra, 2015. – P.518–520.

770. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds / N. B. Cunha, A. M. Murad, G. L. Ramos [et al.] // Transgenic Res. – 2011. – Vol. 20. – P. 841–855.
771. Kim W.S. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells / W.S. Kim, H.B. Krishnan // Plant Biotechnol. J. – 2004. – Vol. 2. – P. 199–210.
772. Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novokinin / Yamada Y., Nishizawa K., Yokoo M. [et al.] // Peptides. – 2008. – Vol. 29. – P. 331–337.
773. Song L. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce / L. Song, Zhao De-gang, Wu Yong-jun, Li Yi // J. Zhejiang Univ. Sci. – 2008. – Vol. 9, № 5. – P. 351–355.
774. Cellular responses in chickens treated with IFN-alpha orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN-alpha / K.W. Jarosinski, W. Jia, M.J. Sekellick [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – Vol. 21, № 5. – P. 287–296.
775. Ability of orally administered IFN-alpha-containing transgenic potato extracts to inhibit *Listeria monocytogenes* infection / K. Ohya, T. Matsumura, N. Itchoda [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2005. - Vol. 25, № 8. – P.459–466.
776. Перспективы применения в ветеринарной медицине трансгенных растений, синтезирующих физиологически активный интерферон  $\alpha 2b$  человека / Ю.В. Шелудько, И.М. Герасименко, Н.Л. Щербак [и др.] // Вет. медицина. – 2009. – Т. 92. – С. 528–532.
777. Production of human interferon alpha 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression / Y.R. Sindarovska, I.M Gerasymenko, Y.V. Sheludko [et al.] // Cytol Genet. – 2010. - Vol. 44, № 5. – P. 313–316.
778. Expression of human interferon  $\alpha 2b$  gene in *ginseng* cells / Ren Qi, C.-Yi Wang, Z.-M. Song [et al.] // Chem. Res. Chinese Univ. – 2010. – Vol. 26, №3. – P. 420–426.
779. Кунах В.А. Біотехнологія рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. – 730 с.

780. Balandrin M.F. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials / M.F. Balandrin, J.A. Klocke, E.S. Wurtele, W.H. Bollinger // Science. – 1985. – Vol. 228. – P. 1154–1160.
781. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells / M.D. Chilton, D.A. Tepfer, A. Petit [et al.] // Nat. 1982. – Vol. 295. – P. 432–434
782. Tepfer D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* / D. Tepfer // Physiol. Plant. – 1990. – Vol. 79. – P. 140–146.
783. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges In: Biotechnology for Medicinal Plants: Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. – P. 29–68.
784. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype / D. Tepfer // Cell. – 1984. – Vol. 37. – P. 959–967.
785. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit / J. Muir, S. Shepherd, O. Rosella [et al.] // J. Agr. Food. Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 6619–6627.
786. Gupta A.S. Overexpression of Superoxide dismutase protects plants from oxidative stress Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants / A.S. Gupta, Webb R.P., A.S. Holaday, R.D. Allen // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 103, № 4. – P. 1067–1073.
787. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana* / [et al.] / X. Liu, X. Hua, J. Guo [et al.] // Biotechnol Lett. – 2008. – Vol. 30, № 7. – P. 1275–1280.
788. Sakamoto A. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants / A. Sakamoto, N. Murata // Plant, Cell and Environ. – 2002. – Vol. 25, № 2. – P. 163–171.
789. Yamada M. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress / M. Yamada, H. Morishita, K. Urano // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56, № 417. – P. 1975–1981.



790. Shewmaker C. K. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects / C. K. Shewmaker, J. A. Sheehy, M. Daley // *Plant J.* – 1999. – Vol. 20, № 4 – P. 401–412.
791. Saxena D. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn / D. Saxena, G. Stotzky // *Am. J. Bot.* – 2001. – Vol. 88, № 9. – P. 1704–1706.
792. Momma K. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice / K. Momma, W. Hashimoto, S. Ozawa // *Biosci., Biotechnol. Biochem.* – 1999. – Vol. 63, № 2. – P. 314–318.
793. Holmberg N. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production / N. Holmberg, G. Liljus, J. E. Bailey, L. Bülow // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – Vol. 15, № 3. – P. 244–247.
794. Дмитриюкова М.Ю. Влияние экспрессии гена леггемоглобина сои на антиоксидантную систему трансгенных растений табака / М.Ю. Дмитриюкова, А.Х. Баймиев, З.Ф. Рахманкулова // *Вестн. ОГУ.* – 2010. – Т. 12, № 118. – С. 4–8.
795. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies *in planta* and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases / P.J. Weathers, P. Arsenault, P. Covello [et al.] // *Phytochem Rev.* – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 173–183.
796. Evaluation of influence of planting date on growth, artemisinin yield and seed yield of *Artemisia annua* under Bangalore agro-climatic conditions / Rakshopal Singh, K. Puttanna, E.V.S. Prakasa Rao [et al.] // *Archives of Agronomy and Soil Sci.* – 2009. – Vol. 55, № 5. – P. 569–577.
797. Tu Youyou. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine / Youyou Tu // *Nature Medicine.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1217–1220.
798. Thu B.T. Effects of Environmental Factors on Growth and Artemisinin Content of *Artemisia annua* L. / B.T. Thu, T. Van Minh, B.P. Lim, C.L. Keng // *Trop. Life Sci. Res.* – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 37–43.
799. Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. / B. Liu, H. Wang, Z. Du [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 689–694.
800. Zeng Q. Production of artemisinin by genetically-modified microbes / Q. Zeng, F. Qiu, L. Yuan // *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol. 30, № 4. – P. 581–592.

801. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin / P.J. Westfall, D.J. Pitera, J.R. Lenihan [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – Vol. 109, № 3. – P.111–118.
802. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin / C.J. Paddon, P. Westfall, D. Pitera [et al.] // Nat. – 2013. – Vol. 496, № 7446. – P. 528–532.
803. Boeni S. Use of inulin and probiotic lactobacilli in synbiotic yogurt production / S. Boeni, R. Pourahmad // Ann. of Biol. Res. – 2012. – Vol. 3, № 7. – P. 3486-3349.
804. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica / E. Vasileva-Tonkova, V. Romanovskaya, G. Gladka [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 30. – P. 1387–1398.
805. Polyresistance and superresistance of Antarctic microorganisms to heavy metals / O.B. Tashyrev, N.A. Matvieieva, V.A. Romanovskaya [et al.] // Rep. Natnl. Acad. of Sci. of Ukraine. – 2007. – Vol. 11. – P. 170–175.
806. Phylogenetic analysis of bacteria of extreme ecosystems / V.A. Romanovskaya, Parfenova V.V., Belkova N.L. [et al.] // Mikrobiol. Zh. – 2014. – Vol. 76. – P. 3–10.
807. Устойчивость к экстремальным факторам микроорганизмов прибрежных экосистем Мёртвого моря / Романовская В.А., Авдеева Л.В., Гладка Г.В. [и др.] // Мікробіол. журнал. – 2013. – Т.75, № 3. – С. 3–11.
808. Микробное разнообразие в наземных биотопах Антарктики / В.А. Романовская, А.Б. Таширев, П.В. Рокитко [и др.] // Укр. Антарктич. журн. – 2009. – №8. – С. 358-363.
809. Yildirim A. The antioxidant activity of leaves of *Cydonia vulgaris* / A. Yildirim, M. Oktay, V. Bilaloğlu // Turkish J. of Medical Sci. – 2001. – Vol. 31. – P. 23–27.
810. Manda G. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies / G. Manda, M. T. Nechifor, T.-M. Neagu // Curr. Chem. Biol. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 22–46.
811. Fukui M. Mitochondrial Superoxide Dismutase SOD2, but not Cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells / M. Fukui, B.T. Zhu // Free Radical biol. & Med. – 2010. – Vol. 48, № 6. – P. 821–830.

812. Evans M. D. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance / M. D. Evans, M. Dizdaroglu, M. S. Cooke // *Mutation Res.* – 2004. – Vol. 567, № 1. – P. 1–61.
813. Waris G. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions / G. Waris, H. Ahsan // *J. of Carcinogen.* – 2006. – Vol. 5, Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479806/>
814. Fabricant D.S. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery / D.S. Fabricant, N.R. Farnsworth // *Environment & Health Perspectives.* – 2001. – Vol. 109, № 1. – P. 69–75.
815. Plant-derived pharmaceuticals—the road forward / J. K.-C. Ma, R. Chikwamba, P. Sparrow [et al.] // *Trends in Plant Sci.* – 2005. – Vol. 10, № 12. – P. 580–585.
816. El Far M.M.M. Antioxidant activities, total anthocyanins, phenolics and flavonoids contents of some sweetpotato genotypes under stress of different concentrations of sucrose and sorbitol / M.M.M. El Far, H.A.A. Taie // *Austral. J. of Basic and Appl. Sci.* – 2009. – Vol. 3, № 4. – P. 3609–3616.
817. Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemopreventive potential of Basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.) / D. Gajula, M. Verghese, J. Boateng [et al.] // *Int. J. of Cancer Res.* – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. 130–143.
818. Arfan M. Antioxidant activity of mulberry fruit extracts / M. Arfan, R. Khan, A. Rybarczyk, R. Amarowicz // *Int. J. of Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13 № 2. – P. 2472–2480.
819. Olennikov D. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies / D. Olennikov, L. Tankhaeva, S. Agafonova // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2011. – Vol. 47, № 4. – P. 419–425.
820. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration / A. P. Aguiar Prudêncio, E. Schwinden Prudêncio, R.D.M. Castanho Amboni [et al.] // *Food & Bioprod. Proc.* – 2012. – Vol. 90, № 3. – P. 399–405.
821. *In-vitro* antioxidant properties of *Salvia verbenaca*. L. hydromethanolic extract / S. Khilfi, E. Hachimi, A. Khalil [et al.] // *Ind. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 38. – P. 276–280.

822. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический стрессирующий фактор / А.Г. Еникеев, Т.В. Копытина, Л.А. Семенова, [и др.] // *J. of Stress Physiol. & Biochem.* – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 11–19.
823. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф. М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
824. Дейнеко Е.В. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений / Е.В. Дейнеко, А.А. Загорская, В.К. Шумный // *Генетика.* – 2007. – Т. 43, № 1. – С.5–17.
825. Złotek U. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.) / U. Złotek, M. Swieca, A. Jakubczyk // *Food Chem.* – 2014. – Vol. 148. – P.253–260.
826. Ramakrishna A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants / A. Ramakrishna, G.A. Ravishankar // *Plant Signaling and Behav.* – 2011. – Vol. 6, № 11. – p. 1720–1731.
827. Кваско О. Ю. Підвищення антиоксидантної активності та активності супероксиддисмутази у трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. / О. Ю. Кваско, Н. А. Матвеева // *Biopolym. and Cell.* – 2013. – Vol. 29, № 2. – С. 163–166.
828. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: A key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations / D.F. Cortés-Rojas, D.A. Chagas-Paula, F.B. da Costa [et al.] // *Rev. Bras. Farmacogn.* – 2012, Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000100>
829. Extraction of antioxidant components from *Bidens pilosa* flowers and their uptake by human intestinal Caco-2 Cells / W.-C. Lee, C.-Chi Peng, Chi-H. Chang [et al.] // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18. – P.1582–1601.
830. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes / H.-L. Yang, S.-C. Chen, N.-W. Chang [et al.] // *Food and Chem. Toxicol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1513–1521.
831. Evaluation of antioxidant properties of some tragopogon species growing in Turkey / B. Acikara Özlem, S. Çitoglu Gülçin, T. Çoban [et al.] // *Turk. J. of Pharmaceut. Sci.* – 2013. – Vol. 10, № 3. – P. 377–382.

832. Tabaraki R., *In Vitro* assessment of antioxidant and antibacterial activities of six edible plants from Iran / R. Tabaraki, A. Nateghi, S. Ahmady-Asbchin // J. of Acupunct. and Meridian Stud. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 159–162.
833. Mroueh M. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Tragopogon porrifolius* methanolic extract / M. Mroueh, C. Daher, M. El Sibai, C. Tenkerian // Planta Med. – 2011. – Vol. 77 – P. 1372–1378.
834. Llorach R. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts / R. Llorach, F.A. Tomás-Barberán, F. Ferreres // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 16. – P. 5109–5116.
835. Total phenolic content and DPPH• radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado / X. Liu, S. Ardo, M. Bunning [et al.] // LWT - Food Sci. and Technol. – 2007. – Vol. 40, № 3. – P. 552–557.
836. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole / R. Llorach, A. Martínez-Sánchez, F. A. Tomás-Barberán [et al.] // Food Chem. – 2008. – Vol. 108, № 3. – P. 1028–1038.
837. Altunkaya A. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants / A. Altunkaya, E. M. Becker, V. Gökmen, L. H. Skibsted // Food Chem. – 2009. – Vol. 115, № 1. – P. 163–168
838. Evaluation of red chicory extract as a natural antioxidant by pure lipid oxidation and yeast oxidative stress response as model systems / A. Lante, T. Nardi, F. Zocca [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59, №10. – P. 5318-5324.
839. Red chicory (*Cichorium intybus* L. cultivar) as a potential source of antioxidant anthocyanins for intestinal health / L. D'evoli, F. Morroni, G. Lombardi-Boccia [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/704310/>.
840. The antioxidant and Flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color / P. Sadighara, S. Gharibi, A. M. Jafari [et al.] // Avicenna J. Phytomed. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 113–117.
841. Determination of antioxidant activity of marshmallow flower (*Althaea officinalis*) / M. Elmastas, L. Ozturk, I. Gokce [et al.] // Anal. Lett. – 2004. – Vol. 37. – P.1859–1869.

842. Naili M. B. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae) / M. B. Naili, R. O. Alghazeer, N. A. Saleh, A. Y. Al-Najjar // Arabian J. of Chem. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 79–84.
843. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques / I. Karabegović, M. Nikolova, D. Veličković [et al.] // Chin. J. of Chem. Eng. – 2011. – Vol. 19, № 3. – P. 504–511.
844. Quantitative determination of antioxidant potential of artemisia persica/ A. Rashid ch, M. Z. Qureshi, S. A. Raza [et al.] // An. Univ. din Bucur. – Chimie . – 2010. – Vol.19, № 1. – P.23 – 30.
845. Temraz A. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris* / A. Temraz, W.H. El-Tantawy // Pak. J. Pharm. Sci. – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 321–326.
846. Photoprotection by *Cichorium endivia* Extracts: Prevention of UVB-Induced Erythema, Pyrimidine Dimer Formation and IL-6 Expression / C.D. Enk, M. Hochberg, A. Torres [et al.] // Skin Pharmacol. Physiol. – 2004. – Vol. 17. – P.42–48.
847. Afanasieva K. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments / K. Afanasieva, M. Zazhytska, A. Sivolob //Electrophoresis. – 2010. – Vol. 31. – P. 512–519.
848. Antioxidant activity of inulin and its role in the prevention of human colonic muscle cell impairment induced by lipopolysaccharide mucosal exposure / V. Pasqualetti, A. Altomare, M.P. Guarino [et al.] // PLoS One. –2014. – Vol. 9, № 5. – e98031.
849. Порівняння протівірусної активності екстрактів з трансгенних рослин цикорію, салату та алтея / Н.А. Матвєєва, Ю.Й. Кудрявець, О.О. Ліхова [та ін.] // Фактори експ. еволюції організмів. Збірник наук. Праць. – Т.12: Київ, Логос. – 2013. – С. 285–289.
850. Матвєєва Н.А. Накопичення фруктозовмісних цукрів в культурі трансгенних коренів лікарських рослин / Н.А. Матвєєва, К.О. Дробот // Фізіол. та біохім.культ. росл. – 2015. – Т.47, №1. – С.74–79.

851. Матвеева Н.А. Полифруктаны в растениях цикория *Cichorium intybus* L. В культуре *in vitro* и их биологическая активность / Н.А. Матвеева, Е.Ю. Кваско, О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко // Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Новый свет, 2011. – С. 285–286.
852. Кваско О. Ю. Антиоксидантна активність трансгенних рослин цикорію *Cichorium intybus* L. з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини / О. Ю. Кваско, Матвеева Н.А., А. М. Шаховський // Вісн. Дон. унів. Сер.А: Природничі науки. – 2012, №1. – С.179–182.
853. Антимикробная активность экстрактов из трансгенных корней *Ruta graveolens* L. / Матвеева Н.А., Гладка Г., Говоруха В. [та ін] // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. Sci. proc. of the internat. network AgroBioNet of the institution and research of international research, education and development programme “Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality” Ed. J. Brindza, S. Klimenko – Nitra, 2015. – P.468–470.
854. Peterson A. Accumulation of recombinant Ag85B and ESAT6 fusion protein – analog secretory *Mycobacterium tuberculosis* proteins – in transgenic *Lemna minor* l. plants/ A. A. Peterson, M. Yu. Vasylenko, N. A. Matvieieva, M. V. Kuchuk // Biotechnol. Acta. – 2015. – № 5. – P. 39-47