

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

ДРОБОТ КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 575.222.7:581.1

**КУЛЬТУРА ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ РОСЛИН РОДУ *ARTEMISIA* ЯК
ДЖЕРЕЛО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Матвєєва Надія Анатоліївна,
Інститут клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України,
завідувач лабораторією адаптаційної біотехнології
старший науковий співробітник
відділу генетичної інженерії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор, член-кореспондент НАН України
Кунах Віктор Анатолійович,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
завідувач відділу генетики клітинних популяцій

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Сахно Людмила Олександрівна
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки»
НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу клітинної біології і біотехнології

Захист відбудеться «05» липня 2018 р. об 11-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148

Автореферат розісланий «04» червня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

К. В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Біотехнологія — одна з міждисциплінарних галузей сучасної біологічної науки, головною метою якої є покращення якості природної сировини для забезпечення потреб людини. Біотехнологія рослин охоплює цілий ряд напрямків, серед яких є мікроклональне розмноження рослин, збереження генофонду рідкісних видів, прискорення селекційного процесу, генетична модифікація рослин. Порівняно з тваринними та мікробними системами експресії білків, рослини є зручною та безпечною системою для продукування цінних метаболітів (Weathers et al., 2010; Goddijn, Oscar, 1995). За допомогою рослинних систем синтезують широке коло речовин медичного призначення, зокрема гормони, ферменти, білки імунної системи людини (Кунах, 2005). Для зміни природних якостей рослин застосовують методи генетичної інженерії, які дозволяють керовано впливати на геном рослин. Генетична трансформація за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* належить до таких методів (Christey, 2001). Отримані після трансформування трансгенні корені здатні рости на живильному середовищі без додавання регуляторів росту, характеризуються генетичною стабільністю, та можуть синтезувати сполуки, притаманні нетрансформованим рослинам, а також рекомбінантні сполуки відповідно до перенесених генів. Такі ознаки дозволяють використовувати культуру «бородатих» коренів для продукування біологічно активних сполук (БАС) медичного призначення (Zhou et al., 2011).

Полин здавна використовується у медицині (Nageeb et al., 2013). Зокрема, це обумовлено наявністю у його хімічному складі ефірних олій, аскорбінової кислоти, флавоноїдів та сесквітерпенових сполук. Попри широке використання рослин роду *Artemisia* у медицині, ці рослини залишаються досі недостатньо вивченими з біотехнологічної точки зору. У численних дослідженнях головна увага була зосереджена на рослинах *A. annua* L., проте на даний час існують лише декілька публікацій з генетичної трансформації інших видів полину. Так, досі не було проведено генетичну трансформацію естрагону (*A. dracuncululus* L), до геному рослин цього виду раніше не переносили гени білків медичного призначення, зокрема гена інтерферону, а також не визначали зміну у вмісті біологічно активних сполук та біологічній активності у екстрактах коренів цих рослин після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації. З огляду на багатий фітохімічний склад представників роду *Artemisia*, трансгенні корені, отримані з цих рослин, можуть бути зручною біотехнологічною системою для синтезу та накопичення БАС. Дослідження в цій сфері можуть бути поштовхом для створення рослинної біотехнологічної платформи для продукції біологічно активних сполук, а також використання цих сполук в косметології, харчовій та медичній промисловостях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, у рамках наукової бюджетної теми №: Ш-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних

генів в рослинних системах» (№ держреєстрації 0115U000025, 2015-2017 рр), а також гранту Державного фонду фундаментальних досліджень № Ф73/2-2017 «Розробка біотехнологічної платформи для отримання природних рослинних і рекомбінантних сполук з лікувальними властивостями», (№ держреєстрації 0117U000943, 2017 р).

Мета та завдання дослідження. Отримання культури трансгенних коренів рослин *Artemisia annua* L., *A. vulgaris* L. та *A. dracunculoides* L., а також визначення вмісту біологічно активних сполук (артемізиніну, флавоноїдів та цукрів) і біологічної активності (антиоксидантної та противірусної) в отриманих коренях.

У завдання входило:

1. Уведення в культуру *in vitro* рослин полину однорічного — *A. annua* L., полину звичайного — *A. vulgaris* L. та естрагону — *A. dracunculoides* L.

2. Оптимізація методики генетичної трансформації рослин зазначених видів з використанням *A. rhizogenes* та створення культури трансгенних коренів.

3. Вивчення особливостей росту культур «бородатих» коренів та можливості його стимулювання з використанням регуляторів.

4. Визначення у трансформованих коренях вмісту біологічно активних сполук (артемізиніну, флавоноїдів, цукрів, фруктанів та інуліну) та біологічної активності (антиоксидантної та противірусної).

5. Відбір ліній з підвищеним вмістом БАС та створення колекції трансгенних коренів — продуцентів цінних сполук.

Об'єкт дослідження — процес створення культур «бородатих» коренів *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracunculoides* – продуцентів біологічно активних сполук.

Предмет дослідження — вдосконалення біотехнологічних підходів з використанням *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації для отримання «бородатих» коренів рослин *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracunculoides* з підвищеним вмістом біологічно активних сполук

Методи дослідження. Для виконання роботи з отримання культури «бородатих» коренів використовувалися такі методи:

- метод культивування рослин та культур органів *in vitro*;
- метод генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*;
- молекулярно-біологічний метод (ПЛР);
- фізіологічний метод (визначення швидкості росту);
- біохімічні методи (визначення вмісту синтезованих сполук (фруктанів, флавоноїдів) та антиоксидантної активності);
- метод високоефективної рідинної хроматографії (визначення вмісту артемізиніну та цукрів);
- метод статистичної обробки (для аналізу експериментальних даних).

Наукова новизна. Автором було оптимізовано протокол *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації *A. dracunculoides* та уперше отримано «бородаті» корені цього виду. Уперше було показано можливість отримання «бородатих» коренів *A. vulgaris* з використанням *A. rhizogenes*, яка несе не тільки селективні та репортерні гени, але й ген рекомбінантного білка, зокрема, інтерферону

людини *ifn- α 2b* — сполуки, яка має лікувальні властивості. Кількісно визначено накопичення природних для рослин БАС (артемізиніну, флавоноїдів, цукрів), та порівняно їх вміст у *in vitro* культивованих рослинах та трансгенних коренях. Показано, що екстракти трансгенних коренів, які містять ген *ifn- α 2b*, проявляють противірусну активність. Створено колекцію «бородатих» коренів *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracuncululus* — продуцентів ряду БАС.

Практичне значення одержаних результатів. Здобувачем оптимізовано протокол *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації для отримання культури «бородатих» коренів *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracuncululus*, що може бути використаним для створення ліній-продуцентів БАС. Було порівняно вміст біологічно активних сполук у коренях інтактних рослин та «бородатих» коренях *Artemisia* та виявлено зміни у накопиченні БАС. Створена культура «бородатих» коренів є джерелом біологічно активних сполук, зокрема, артемізиніну, фруктозовмісних цукрів, флавоноїдів, а також сполук з антиоксидантними та противірусними активностями. Отримані «бородаті» корені *Artemisia* можуть бути використані для потреб фармацевтичної промисловості та косметології.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Дробот К.О. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів.

Загальну концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні наукові положення, аналіз і обговорення результатів дослідження дисертаційної роботи було обговорено здобувачем разом із науковим керівником д.б.н., с.н.с. Матвєєвою Н.А. Автором було особисто проведено аналіз наукової літератури, вибір об'єктів досліджень, підготовлено текст дисертації.

Особистий внесок здобувача полягає також у проведенні експериментів з генетичної трансформації обраних рослин, дослідження швидкості росту та розробці протоколу прискорення росту «бородатих» коренів. Автором проведено біохімічні аналізи отриманих ліній «бородатих» коренів, визначено вміст флавоноїдів, фруктанів. Вміст артемізиніну, інуліну та цукрів (глюкози, фруктози, сахарози, галактози, манітолу) було визначено разом з к.б.н. Остапчуком А. М., та к.б.н., н.с Хархотою М. О. (Центр колективного користування Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Дисертантом було здійснено тестування антиоксидантної активності екстрактів коренів інтактних рослин та «бородатих» коренів полину. Противірусну активність було визначено спільно з к.б.н., с.н.с Трохименко О.П. на базі Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментів з трансформації, проведенні пробопідготовки до аналізів, участі у обговоренні результатів, формулюванні узагальнень та висновків, написанні статей.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень було презентовано на міжнародній науково-практичній XXV щорічній конференції

«Сучасні аспекти біохімії та біотехнології» (Київ, 2017 р.); IX Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 170 річниці від народження Іллі Мечникова «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 2015 р.); II міжнародній науковій конференції «Агробіорізномобразие для улучшения питания, здоровья и качества жизни», (Нітра, Словаччина, 2015 р.); Міжнародній науковій конференції Українського товариства клітинної біології «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології (Львів, 2015 р.); X та XI Міжнародних науково-практичних конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, 2015 р., Одеса, 2016 р.); та на семінарах відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (2015 – 2017 рр).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 16 наукових робіт, серед яких один патент на корисну модель, 9 статей, 5 з яких у виданнях, що є у переліку ДАК, одна стаття у виданні, що має індекси Scopus та Web of Science, 6 тез у матеріалах міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 459 посилань. Дисертація викладена на 182 сторінках комп'ютерного друку і містить 8 таблиць та 21 рисунок

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури є аналізом літературних джерел, присвячених використанню рослин роду *Artemisia* у культурі *in vitro*. Розглянуто наявні роботи з біотехнологічного використання культур «бородатих» коренів як рослин полину, так і рослин інших родів. Проаналізовано роботи з генетичної трансформації дводольних, зокрема зроблено акцент на використанні *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації у якості інструмента впливу на метаболічні характеристики рослин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для ініціювання культур «бородатих» коренів рослин полину використовували суспензію бактерій *A. rhizogenes*. Експлантами для генетичної трансформації слугували гіпокотилі, листки, міжвузля та корені 21-денних проростків полину.

Для дослідження вмісту біологічно активних сполук (БАС) використовували лінії «бородатих» коренів кожного з досліджуваних видів, які культивували *in vitro* на безгормональному живильному середовищі Мурасіге-Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей (1/2МС) (Murashige et al., 1962). В якості контролю використовували корені *in vitro* культивованих нетрансформованих рослин.

Уведення в культуру *in vitro* та мікроклональне розмноження рослин *Artemisia*. У роботі використовували три види полину *Artemisia vulgaris* L.,

Artemisia dracuncululus L. та *Artemisia annua* L. Рослини вводили в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння («Benary», Німеччина) хлорвмісним препаратом «Білизна» (у співвідношенні з дистильованою водою 1:3). Після стерилізації насіння переносили на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга (Murashige et al., 1962) зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів (1/2МС) та культивували при температурі +24 °С і 16-годинному освітленні. Для ініціювання множинного пагоноутворення бічні бруньки пагонів переносили на середовище МС з додаванням бензиламінопурина (БАП) у концентрації 0,5 мг/л та α -нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентрації 0,05 мг/л.

Генетична трансформація з використанням *A. rhizogenes*. Для отримання культур «бородатих» коренів рослин полину використовували суспензію бактерій *A. rhizogenes*. Експлантами для генетичної трансформації слугували гіпокотилі, листки, міжвузля та корені 21-денних культивованих *in vitro* проростків *A. vulgaris*, *A. dracuncululus* та *A. annua*. Експланти з попередньо зробленими насічками інкубували у бактеріальній суспензії протягом 30 хв., далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2МС (протягом 2-4 діб) та переносили на середовище з цефотаксимом у концентрації 600 мг/л для елімінації агробактерій. Корені, які утворювались на експлантах після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, відділяли та вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2МС.

Виділення загальної ДНК та молекулярно-біологічний аналіз трансформованих коренів. Виділення тотальної ДНК з «бородатих» коренів проводили СТАВ-методом (Дрейпер, 1991). Наявність трансгенів визначали за допомогою методу ПЛР з використанням набору реактивів «Fermentas» та праймерів, специфічних до генів *ifn- α 2b* (5'-ttgatgctcctggcacag-3' F та 5'-ttctgctctgacaacctc-3' R), *nptII* (5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' F та 5'-gctctagatccagagtcccgcctcagaag-3' R), та *rolB*. (5'-atggatcccaaatgctattcctccacga-3' F та 5'-ttaggctctttcttcagtttactgcagc-3' R). Щоб переконатися у відсутності агробактеріальної контамінації, «бородаті» корені також аналізували на наявність *virD* гена (праймери 5'-atgctgcaaggcagtaagccca -3' F та 5'-ggagtctttcagcatggagca-3' R).

Ампліфікацію проводили за таких умов: первинна денатурація – 94°C, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (94°C, 30 с – 62°C, 30 с – 72°C, 30 с. Для генів *nptII* та *ifn- α 2b* і 94°C, 30 с – 56°C, 30 с – 72°C, 45 с для *rolB*), заключний синтез – 72°C, 3 хв. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5%-вому агарозному гелі у Tris–боратній буферній системі. Негативним контролем слугувала ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем — ДНК відповідного плазмідного вектору. Було використано маркер нуклеотидних послідовностей O'GeneRuler 1kb №1163 («Fermentas», Литва).

Дослідження швидкості росту трансгенних коренів. Швидкість росту трансгенних коренів визначали за приростом маси за 21 добу. Кореневі апекси довжиною 20 мм відокремлювали, зважували у асептичних умовах та культивували на поверхні середовища 1/2МС у чашках Петрі при температурі +24°C. Приріст

маси Δm визначали через три тижні за формулою: $\Delta m = m_1 - m_0$, де m_1 – маса коренів через три тижні, m_0 – вихідна маса коренів. Експерименти проводили у трьох повторностях.

Для дослідження впливу регуляторів росту на ріст трансгенних коренів полину апікальні частини коренів довжиною 20 мм відокремлювали та переносили на поверхню агаризованого живильного середовища 1/2МС, до якого додавали регулятори росту: 0,5 мг/л індопіроцтової кислоти; 0,5 мг/л індопілмасляної кислоти; 0,05 мкл/л Емістиму С та 0,05 мкл/л Стимпо («Агробіотех»). Корені вирощували при температурі +24°C протягом трьох тижнів, після чого відділяли від середовища, зважували та визначали приріст маси Δm . У якості контролю використовували корені, які культивували на живильному середовищі 1/2МС без додавання регуляторів росту. Експерименти проводили у трьох повторностях.

Визначення вмісту поліфруктанів. Для дослідження накопичення фруктозовмісних цукрів у трансгенних коренях полину використовували по п'ять ліній коренів кожного виду. Вміст поліфруктанів визначали за методикою (Ермаков, 1987).

Визначення вмісту цукрів та інуліну. Зразки готували за методом (Albersheim, 1967). Аналіз проводили на базі Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України методом газо-рідинної хроматографії на хроматографі „Chrom-5” (Чехія) з полуменево-іонізаційним детектором. Температурний режим 180-235°C при градієнті температури 3°C/хв, газ-носіє гелій, швидкість потоку 20 мл/хв, колонка – скляна, діаметром 3 мм, довжина 120 см, фаза GP 3 % на 100/200 Supelcoport (виробник Supelco, США), розчинник — етилацетат. Ідентифікацію проводили за часом утримання піка речовини на хроматограмі у порівнянні з часом утримання цукрів у стандартній суміші.

Визначення вмісту артемізиніну. Для визначення вмісту артемізиніну ліофілізовані корені або пагони з листям подрібнювали, додавали етиловий ефір оцтової кислоти у співвідношенні 1/40 та проводили екстрагування протягом 20 хвилин, фільтрували за допомогою вакуумного насосу. Отриманий розчин випарювали на центрифужному ротаційному випаровувачі SpeedVac Savant AES 2010 (Labconco, USA). Утворений осад розчиняли в 2 мл ацетонітрилу. Хроматографічні дослідження були виконані з використанням обладнання Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України на вискоєфективному рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Розділення проводили в ізократичному режимі з використанням аналітичної колонки Zorbax SB-C18 2,1мм×150мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). В якості рухомої фази використовували суміш $H_2O/MeOH/ACN$ (30/20/50 v/v), швидкість потоку через колонку 0,4 мл/хв., температура термостату 30°C. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора в ультрафіолетовому діапазоні на 210, 280 та 216 нм. Ідентифікацію проводили за

допомогою стандарту артемізініну (Sigma-Aldrich, 63968-64-9), кількісний аналіз проводили методом зовнішньої калібровки.

Визначення вмісту флавоноїдів. Для визначення вмісту флавоноїдів використовували ліофілізований рослинний матеріал. До 100 мг матеріалу додавали 5 мл 70% етанолу та екстрагували протягом 20 годин. Аналіз проводили за методикою, описаною в роботі (Baba, 2015). Вміст флавоноїдів виражали у мг рутинового еквіваленту на 1 г сухої маси

Визначення антиоксидантної активності екстрактів. Антиоксидантну активність екстрактів визначали, використовуючи 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал (DPPH⁺) за методикою (Blois, 1958). Кількісно відновлення радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою $A(k) - A(e) / A(k) \cdot 100$, де $A(k)$ — оптична щільність контрольного розчину $A(e)$ — оптична щільність розчину досліджуваного екстракту.

Визначення противірусної активності екстрактів. Для визначення противірусної активності використовували «бородаті» корені, у яких було доведено наявність гена *ifn- α 2b* методом ПЛР. Для приготування водно-солевих екстрактів використовували фосфатний буфер рН 7,1–7,4. Рослинний матеріал зважували та розтирали на льоді з буфером у співвідношенні 100 мг матеріалу на 1 мл води, центрифугували протягом 5 хвилин при 10000g при температурі +4°C. Інтерфероподібну противірусну активність екстрактів визначали мікрометодом за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу везикулярного стоматиту (VCS, штам Індіана) у перевивній культурі клітин тестикул поросят (ПТП). Противірусну активність розраховували за методом Кербера за зниженням цитопатичної дії VCS (Ашмарин, 1962) і виражали у міжнародних одиницях у перерахунку на 1 г маси коренів (МО/г). Як референс-зразок інтерферону- α 2b людини використовували WHO International Standard. Interferon Alpha 2b (Human rDNA derived), (NIBSC, UK).

Статистична обробка результатів. Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу (Лакин, 1990). Діаграми створювали у програмі Microsoft Excel, на яких зображали середнє значення та довірчі інтервали ($p < 0.05$). Для порівняння середніх значень незалежних вибірок застосовували дисперсний аналіз (Лакин, 1990) та тест Тьюкі (Tukey, 1949). До даних, виражених в процентах, застосовували логістичне перетворення (Sharon, 1995).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Культивування рослин *Artemisia* spp. *in vitro* та ініціювання культури «бородатих» коренів. Для отримання асептичних рослин полину використовували метод поверхневої стерилізації насіння *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracunculius*. Ефективність поверхневої стерилізації насіння з використанням водного розчину «Білизна» (1:3) виявилася високою, оскільки за застосованих умов була відсутня бактеріальна контамінація. Схожість насіння залежала від виду та складала до 100% для *A. dracunculius* і *A. annua*, у той час як для насіння *A. vulgaris* становила лише 10%.

Зменшення часу обробки насіння розчином «Білизна» не збільшувало схожість насіння полину звичайного.

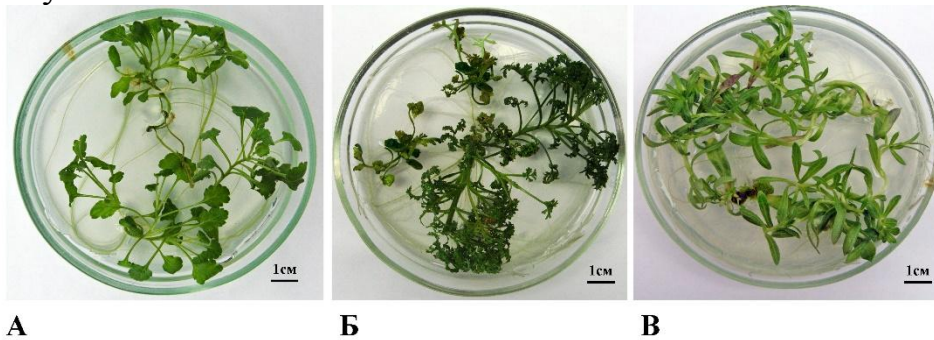


Рис. 1. Зовнішній вигляд рослин *A. vulgaris* (А), *A. annua* (Б), *A. dracunculus* (В), культивованих *in vitro* на живильному середовищі Мурасіге-Скуга

У результаті експериментів було встановлено, що використання регуляторів росту БАП і НОК в концентрації 0,5 мг/л і 0,05 мг/л відповідно прискорює формування нових пагонів *A. annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris*. Нові пагони утворювалися через 5 днів після перенесення на середовище МС з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК. На експлантах, культивованих на безгормональному середовищі МС (контроль), за цей проміжок часу утворювався лише один пагін. На середовищах з додаванням БАП і НОК в залежності від виду рослин кількість новоутворених пагонів варіювала від трьох до дев'яти за 14 діб.

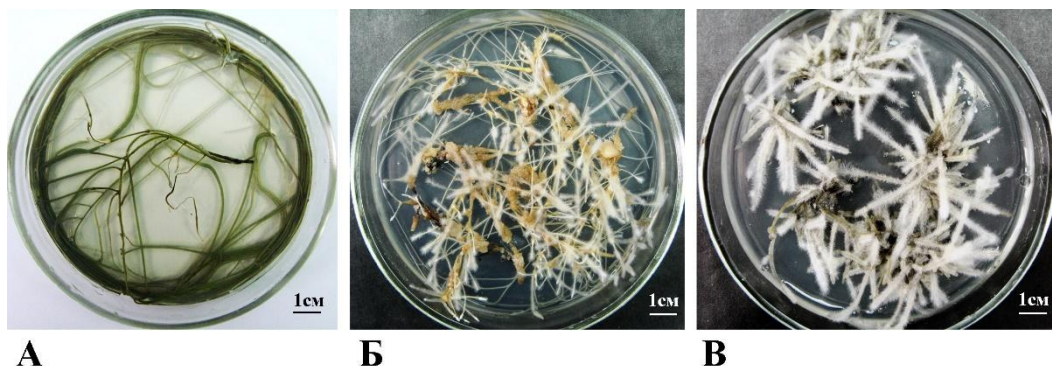


Рис. 2. Зовнішній вигляд культивованих *in vitro* «бородатих» коренів *A. vulgaris* (А), *A. annua* (Б), *A. dracunculus* (В)

У результаті генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* було отримано культури «бородатих» коренів. Частота коренеутворення становила 100%, 20%, 20% відповідно для *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracunculus*. Низька частота генетичної трансформації *A. annua* та *A. dracunculus* може бути обумовлена фізіологічними особливостями цих видів, а саме наявністю протимікробної активності у рослин та, відповідно, невразливості до ураження агробактеріями. Перенесення *rolB* гена агробактерій було підтверджено результатами ПЛР-аналізу для усіх «бородатих» коренів. Також за результатами ПЛР було підтверджено наявність гена *ifn- α 2b* у коренях, що були отримані після трансформації *A. rhizogenes* А4 з векторами рСВ124 та рСВ161

(рис. 3). Найкращим типом експланту виявилися листки та гіпокотилі, максимальна частота формування «бородатих» коренів при використанні яких становила до 100%. Отримані корені були здатні до тривалого росту (протягом 3-4 років) в культурі *in vitro* без фенотипових змін.

За результатами роботи вперше було розроблено біотехнологію генетичної трансформації та отримано культуру «бородатих» коренів полину *A. dracuncululus* L. з частотою 20% за допомогою дикого штаму *A. rhizogenes* A4. Було встановлено, що важливим біотехнологічним чинником, який впливає на частоту трансформації, є час кокультивування експлантів з *Agrobacterium*. Також уперше показано можливість отримання «бородатих» коренів полину з використанням *A. rhizogenes* з геном синтезу інтерферону людини *ifn- α 2b* – сполуки, яка має фармакологічні властивості.

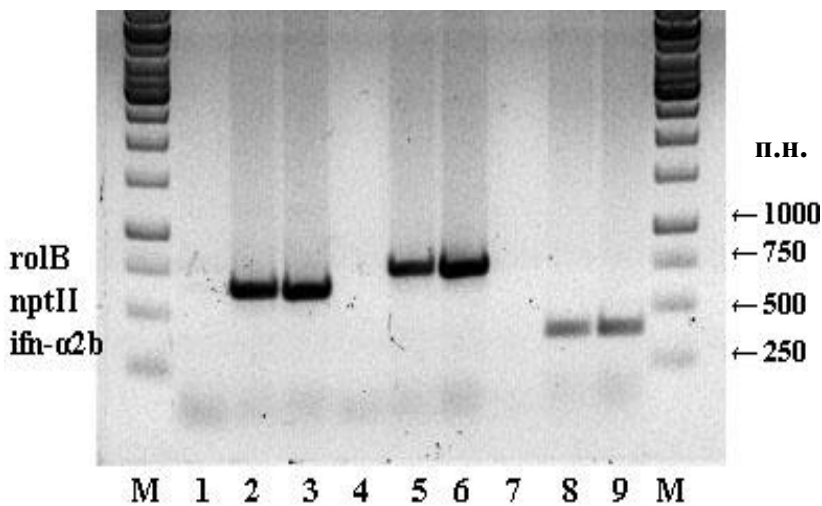


Рис.3. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *nptII* (1-3), *rolB* (4-6) та *ifn- α 2b* (7-9) у трансгенних коренях полину, отриманих з використанням *A. rhizogenes* з вектором pCB161: треки 1, 4 та 7 – ДНК контрольних нетрансформованих рослин; треки 2, 3, 5, 6, 8, 9 – ДНК трансгенних коренів; М – маркери.

Дослідження впливу генетичної трансформації на морфо-фізіологічні параметри «бородатих» коренів. Отримані лінії «бородатих» коренів мали характерний фенотип: високу ступінь галуження, негативний геотропізм. Окрім того, такі корені були здатні до росту на середовищі без додавання екзогенних регуляторів росту рослин. Було відзначено морфологічні відмінності серед різних трансгенних ліній одного виду. Вони відрізнялися за забарвленням, ступенем обводнення та ступенем галуження.

Також трансгенні лінії коренів відрізнялися за швидкістю росту. Швидкість росту «бородатих» коренів слід урахувати для того, щоб оцінити цінність культури трансгенних коренів та відібрати найбільш продуктивні лінії.

Найбільш високими темпами росту відрізнялись трансгенні корені *A. vulgaris* та *A. annua*, в той час як *A. dracuncululus* був притаманний більш повільний темп росту. Так, середній приріст маси коренів *A. vulgaris* залежав від лінії та коливався у межах $0,093 \pm 0,015$ – $0,186 \pm 0,023$ г через 21 добу культивування на безгормональному середовищі $\frac{1}{2}$ МС (у перерахунку на

одну точку росту). Як видно з наведеної діаграми (рис.4), корені ліній №1 та №8 удвічі повільніше накопичували масу, ніж корені лінії №7.

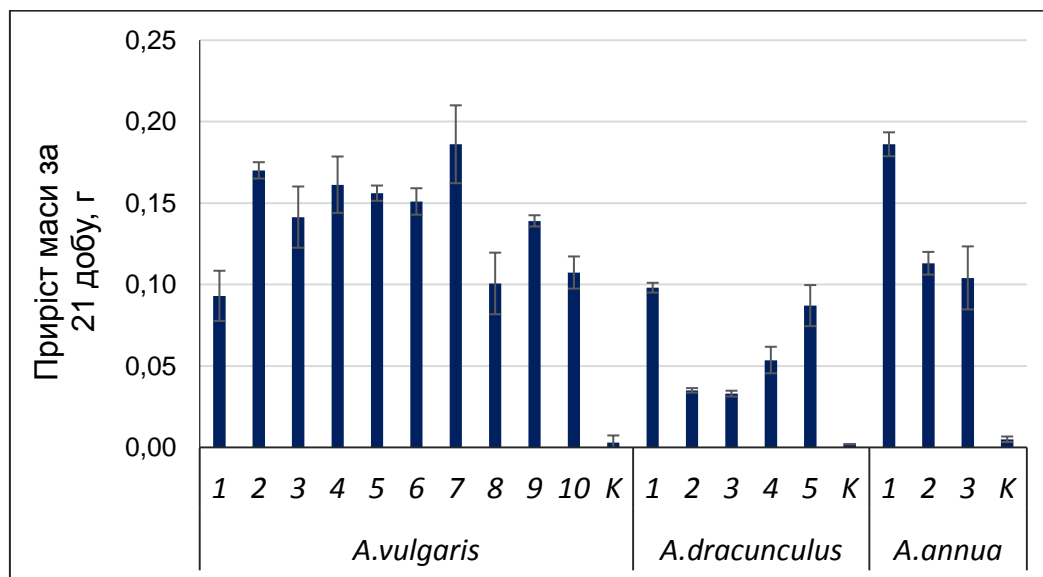


Рис.4. Приріст маси коренів *Artemisia*: К – корені контрольних нетрансформованих рослин; 1-10 – лінії «бородатих» коренів полину

Аналогічний результат було отримано і при вирощуванні різних ліній коренів *A. dracunculus* та *A. annua*. Середній приріст маси коренів *A. annua* варіював у межах $0,104 \pm 0,019$ – $0,186 \pm 0,007$ г, а для коренів *A. dracunculus* — $0,033 \pm 0,001$ – $0,098 \pm 0,003$ г. Така варіабельність за досліджуваним параметром дозволила вибрати саме ті лінії, які характеризуються швидким ростом та накопиченням біомаси.

Було проведено дослідження можливості прискорення росту культури «бородатих» коренів *Artemisia* шляхом додавання до живильного середовища індолілоцтової та індоділмасляної кислот та полікомпонентних препаратів ТМ «Агробіотех» Емістим С (продукт біотехнологічного вирощування грибів-епіфітів з кореневої системи лікарських рослин) і Стімпо (препарат біологічного походження, який містить ненасичені жирні кислоти, вуглеводи, аналоги натуральних фітогормонів, біогенні мікроелементи, аверсектини). Визначено, що застосування індолілоцтової та індоділмасляної кислот дозволяє пришвидшити ріст «бородатих» коренів у 1,2 – 4,1 та 1,5 – 3,6 рази відповідно. Такий ефект спостерігався для усіх ліній коренів, які використовували у експериментах.

Визначення вмісту біологічно активних сполук та біологічної активності у «бородатих» коренях *Artemisia*. Лікарські рослини є джерелом низки хімічних сполук та використовуються для потреб медицини, харчової та косметичної промисловостей. Задля отримання біологічно активних сполук зазвичай використовують рослини, які зібрані у природних ареалах. Отримання БАС з таких рослин має недоліки. Зокрема, масовий збір дикоростучих рослин може призвести до їх знищення, а неконтрольовані умови вирощування не

гарантують чистоти рослинної сировини. При вирощуванні рослин у природних умовах вміст сполук вторинного метаболізму залежить від цілого ряду факторів — вологи ґрунту, змін температури, освітлення (Atanasov, 2015). Окрім того, природні ресурси є вичерпними і часто не можуть задовільнити широкий попит індустрії.

Розв'язати ці проблеми може використання культури *in vitro* та методів біотехнології. Культура *in vitro* надає можливість контролювати умови вирощування рослин, а біотехнологічні підходи дозволяють вдосконалювати природні властивості лікарських рослин та відбирати найбільш продуктивні лінії. Культивовані *in vitro* «бородаті» корені є альтернативним джерелом цінних сполук та є перспективною біотехнологічною системою для синтезування та отримання біологічно активних сполук.

Визначення вмісту поліфруктанів. За результатами наших досліджень виявлено, що в коренях нетрансформованих рослин та у «бородатих» коренях *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracunculus* дійсно накопичувались фруктани. В залежності від виду вміст фруктанів у нетрансформованих коренях коливався у широкому діапазоні $61,68 \pm 0,98$ – $263,88 \pm 5,72$ мг/г сухої речовини. Найвищий вміст фруктанів було зафіксовано у коренях *A. vulgaris*, а найменший — у коренях *A. dracunculus*. Проведений аналіз вмісту поліфруктанів у різних лініях трансгенних коренів цих видів свідчив також про значну варіабельність за цим показником (рис. 5). Найвищий вміст фруктанів був зафіксований у трансгенних лініях *A. dracunculus* та *A. annua*, а найменший — у трансгенних коренях *A. vulgaris*.

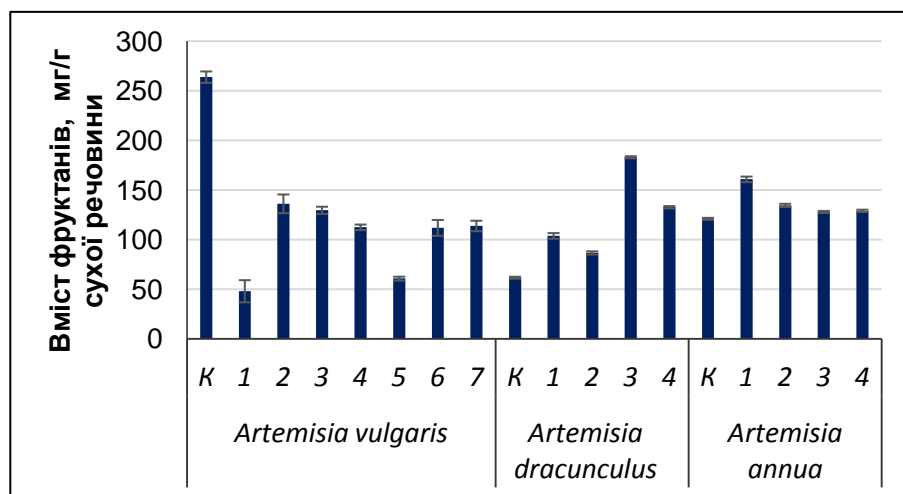


Рис. 5. Вміст фруктанів у «бородатих» коренях *Artemisia*: К – корені нетрансформованих рослин; цифрами позначено окремі лінії «бородатих» коренів полину.

У трансгенних коренях *A. vulgaris* в усіх досліджуваних лініях фруктозовмісні сполуки накопичувалися у кількості, значно меншій за таку у коренях контрольних нетрансформованих рослин. Вірогідно, це може бути пов'язано зі значною швидкістю росту культури «бородатих» коренів, що може призводити до зменшення швидкості накопичення фруктанів. Вміст цих сполук у трансгенних коренях *A. vulgaris* коливався у межах $48,01 \pm 11,18$ мг/г – $136,13 \pm 9,44$ мг/г сухої речовини (при $263,88 \pm 5,72$ мг/г сухої речовини у контролі), і не залежав від використаної для трансформування бактерії.

Генетична трансформація призводила до збільшення накопичення фруктанів у трансгенних коренях *A. annua* та *A. dracunculul*. В усіх досліджуваних трансгенних лініях *A. annua* та *A. dracunculul* вміст фруктанів перевищував такий у коренях нетрансформованих рослин. Так, у «бородатих» коренях *A. annua* вміст фруктанів знаходився у діапазоні $127,93 \pm 1,05$ – $160,8 \pm 2,81$ мг/г сухої речовини та був вищим, ніж у нетрансформованих коренях цього виду у 1,05–1,32 раза. У «бородатих» коренях *A. dracunculul* фруктани накопичувались у кількості в 1,4 – 2,15 раза вищій, ніж у контрольних коренях, вміст цих сполук коливався у межах $86,61 \pm 1,6$ – $183,1 \pm 1,05$ мг/г сухої речовини.

Визначення вмісту цукрів. Було виявлено зміни у вмісті цукрів в трансгенних коренях *A. vulgaris* та *A. dracunculul* (рис. 6). Відмінності проявлялися у наявності сполук, які не були притаманні нетрансформованим кореням. Наприклад, в трансгенних коренях *A. vulgaris* відбувався синтез манітолу, а в трансгенних коренях *A. dracunculul* – синтез галактози. Також було виявлено і кількісні зміни у накопиченні «бородатими» коренями сполук (у порівнянні з їх кількістю у нетрансформованих коренях). Наприклад, кількість фруктози в деяких трансгенних лініях *A. vulgaris* перевищувала таку у контрольних коренях в 3,4 рази, а сахарози — в 1,3-1,6 рази.

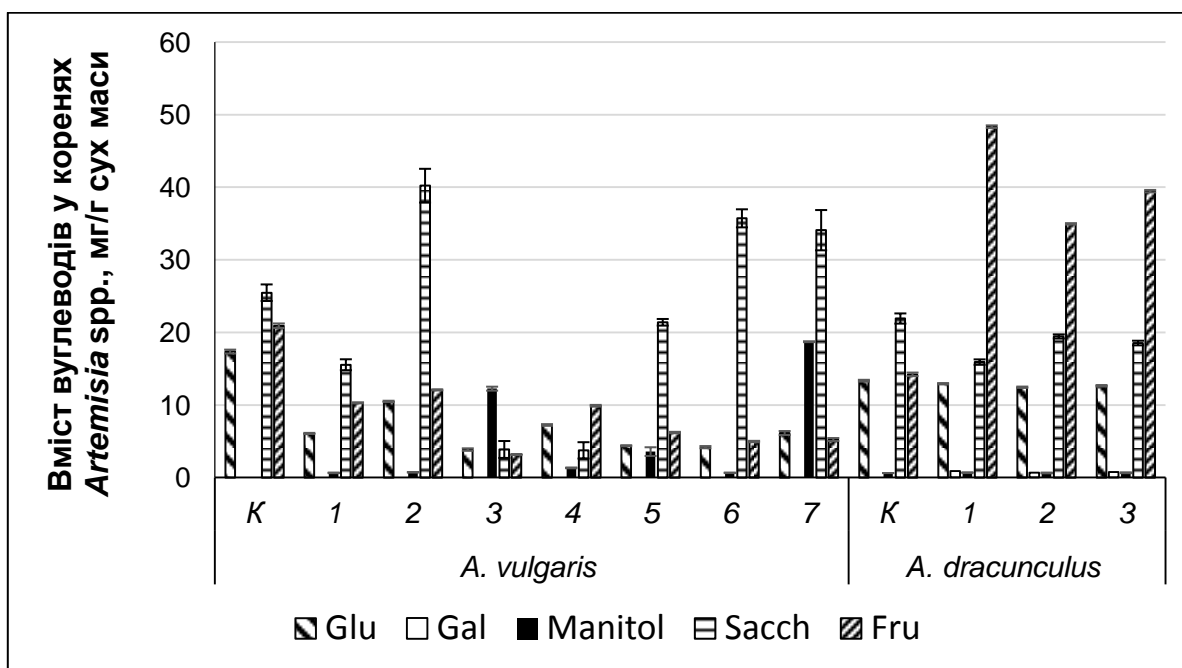
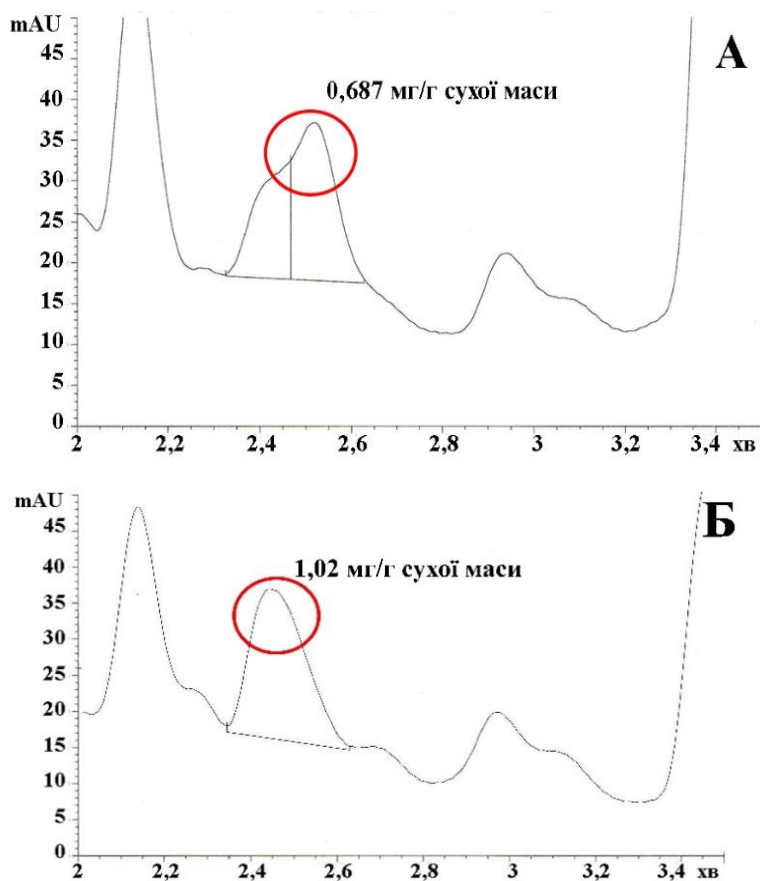


Рис. 6. Вміст цукрів у «бородатих» коренях *Artemisia*: К – корені нетрансформованих рослин; цифрами позначено окремі лінії «бородатих» коренів полину; Glu – глюкоза, Gal – галактоза, Manitol – манітол, Sacch – сахароза, Fru – фруктоза.

Отже, було визначено, що трансформація з використанням агробактерій може призводити до змін у синтезі цукрів і, таким чином, може бути використана для отримання ліній-продуцентів цих сполук.

Визначення вмісту артемізиніну. Деякі лінії трансгенних коренів *A. vulgaris* накопичували артемізинін у більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин (до 1,02 мг/г сухої речовини, рис. 7). Серед п'яти досліджуваних ліній, лише одна лінія накопичувала цю сполуку у меншій кількості, ніж корені контрольних нетрансформованих рослин (0,237 мг/г сухої



речовини). У нашому дослідженні виявлено, що у 40% ліній *A. vulgaris* вміст артемізиніну був більший, ніж у контролі, у 40% — на рівні контролю, та у 20% — менше, ніж у контролі. Слід відзначити, що на сьогодні немає публікацій стосовно вмісту артемізиніну у «бородатих» коренях *A. vulgaris* або *A. dracunculus*.

Рис. 7. Хроматограми результатів HPLC аналізу вмісту артемізинін-подібних сполук: А — у нетрансформованих коренях рослин *A. vulgaris*; Б — у одній з трансгенних ліній *A. vulgaris*.

Вміст артемізиніну у трансгенних коренях *A. dracunculus* варіював у діапазоні 0,554 – 1,056 мг/г сухої речовини і поступався вмісту цієї сполуки у контрольних коренях, однак був вищим, ніж у пагонах *in vitro* культивованих нетрансформованих рослин.

Вміст артемізиніну у нетрансформованих коренях *A. annua* був значно вищим, ніж у всіх досліджуваних лініях «бородатих» коренів (до 6,5 мг/г сухої речовини). В той же час, вміст цих сполук у «бородатих» коренях коливався в діапазоні 0,43–1,64 мг/г сухої речовини. Таким чином, у коренях *A. annua*, отриманих після генетичної трансформації, спостерігали зменшення накопичення артемізинін-подібних сполук.

Визначення вмісту флавоноїдів Усі трансформовані лінії *A. vulgaris* накопичували флавоноїди у 2-3 рази більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин (рис. 8). Вміст цих сполук коливався у межах $15,59 \pm 1,24$ – $21,92 \pm 1,01$ мг/г сухої речовини. У 65% «бородатих» коренів *A. dracunculus* спостерігали зменшення вмісту флавоноїдів у порівнянні з

контрольними коренями. Однак, з-поміж усіх досліджуваних видів полину, трансгенні корені естрагону мали найвищий вміст цих сполук – у діапазоні $38,03 \pm 4,66$ – $55,39 \pm 2,8$ мг/г сухої речовини. Вміст флавоноїдів у трансформованих коренях *A. annua* варіював у межах $27,5 \pm 0,53$ – $35,6 \pm 1,38$ мг/г сухої речовини. Трансгенні корені у 100% випадків накопичували флавоноїди в більшій кількості, ніж корені (в 1,8 рази вище) і листя (в 1,6 рази вище) контрольних рослин.

Отже, за результатами наших досліджень було встановлено, що трансгенні корені *A. annua* та *A. vulgaris* накопичували флавоноїди у більшій кількості у порівнянні з контролем. Однак корені *A. dracunculus* переважно мали нижчий вміст цих сполук, ніж корені нетрансформованих рослин. Лише одна лінія з досліджуваних накопичувала флавоноїди у більшій кількості (у 1,08 рази).

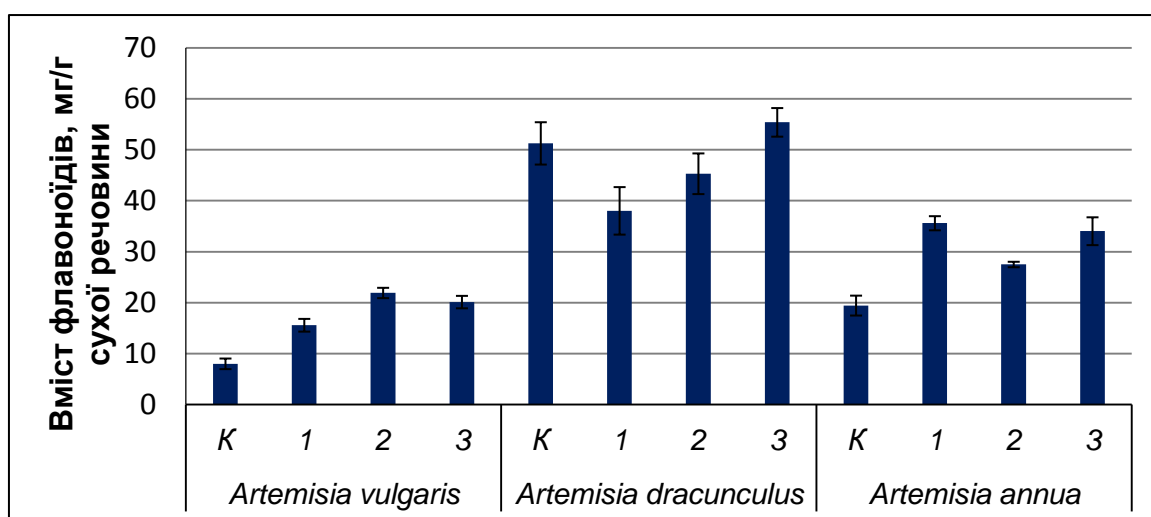


Рис. 8. Вміст флавоноїдів у коренях *Artemisia* (калібрування за 70% етанольним розчином рутину): К – корені нетрансформованих рослин; 1-3 – лінії «бородатих» коренів полину.

Визначення антиоксидантної активності екстрактів. Ми дослідили антиоксидантну (протирадикальну) активність екстрактів з нетрансформованих та трансгенних коренів рослин *A. vulgaris*, *A. dracunculus* та *A. annua*. Екстракти, отримані з трансгенних коренів різних видів *Artemisia*, відрізнялися за здатністю відновлювати DPPH^+ радикал (рис. 9).

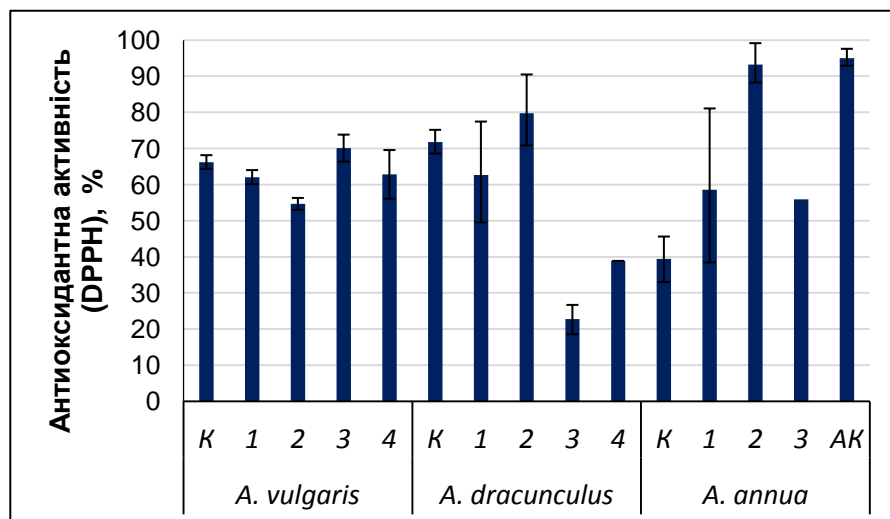


Рис.9. Антиоксидантна активність (АОА) екстрактів з нетрансформованих та трансгенних коренів рослин роду

Artemisia: 1-4 – АОА екстрактів з трансгенних коренів полину; **К** – АОА екстрактів з коренів контрольних рослин; **АК** – АОА розчину аскорбінової кислоти концентрацією

1 мг/мл.

Рівень протирадикальної активності екстрактів, отриманих з нетрансформованих коренів рослин різних видів, варіював в межах $40 \pm 6,4$ – $71,8 \pm 3,2\%$. Найменшу активність проявляли екстракти, отримані з нетрансформованих коренів *A. annua*, а найвищу — екстракти з *A. dracuncululus*. Екстракти з нетрансформованих коренів *A. vulgaris* проявляли дещо нижчу активність — на рівні $66 \pm 2\%$.

Здатність екстрактів з трансгенних коренів відновлювати $DPPH^+$ радикал коливалась у широкому діапазоні $22 \pm 4,2$ – $93 \pm 5\%$. Найнижчу протирадикальну активність було виявлено у екстрактах, отриманих з трансгенних коренів *A. dracuncululus*, а найвищу – у екстрактах з *A. annua*. У ряді екстрактів, отриманих з трансгенних ліній, рівень активності виявився вищим у порівнянні з таким у екстрактах з контрольних нетрансформованих коренів відповідних видів.

Визначення протівірусної активності екстрактів. Було визначено протівірусну активність екстрактів з коренів рослин роду *Artemisia*, які було отримано шляхом генетичної трансформації з використанням гена інтерферону *ifn- α 2b* людини.

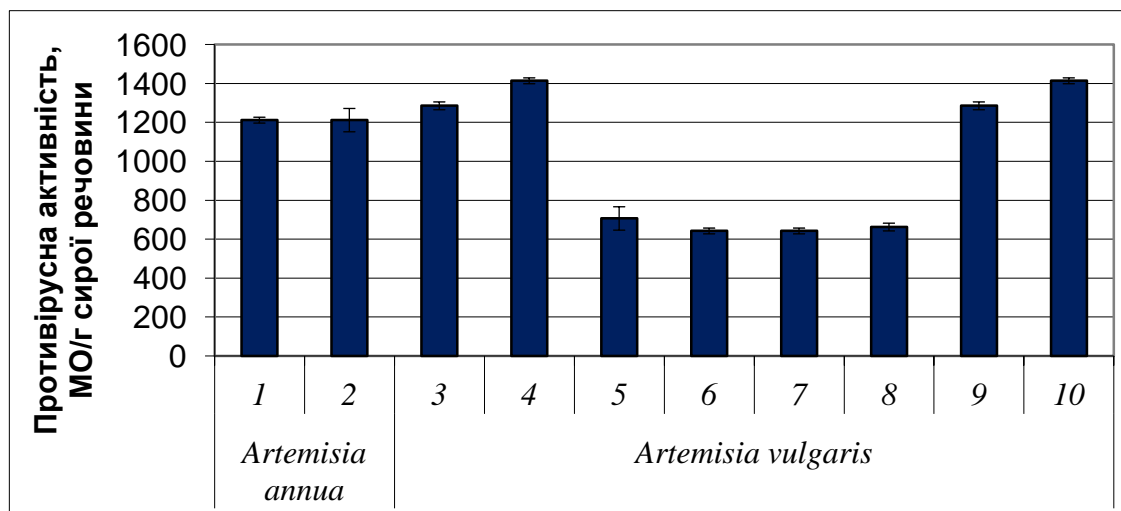


Рис. 10. Протівірусна активність екстрактів «бородатих» коренів *Artemisia* проти вірусу везикулярного стоматиту при тестуванні на перевивній культурі клітин тестикул поросят: **1-10** – протівірусна активність екстрактів з «бородатих» коренів полину; **К** – протівірусна активність екстрактів з коренів контрольних рослин

Встановлено, що лінії «бородатих» коренів *A. vulgaris* та *A. annua* значно відрізнялися за рівнем інтерфероподібної активності, яка варіювала в межах 642 – 1414 МО/г маси. Високу активність мали екстракти з двох ліній трансгенних коренів *A. vulgaris* та двох ліній *A. annua* — на рівні 1414 та 1212 МО/г маси відповідно (рис. 10). Такі суттєві відмінності, очевидно, є

видоспецифічними та можуть бути пов'язані з місцем вбудовування та активністю перенесеного гена інтерферону. Слід зазначити, що екстракти з контрольних рослин противірусної активності при тестуванні на клітинах ПТП проти вірусу везикулярного стоматиту не мали.

Відбір ліній-продуцентів біологічно активних сполук. За результатами проведених досліджень було відібрано по одній лінії кожного з видів. Так, одна з ліній *A. vulgaris* накопичувала фруктани у кількості 111 мг/г, флавоноїди та артемізинін у кількості 45,3 мг/г та 1,02 мг/г відповідно. Одна з ліній *A. annua* містила фруктани у кількості 160,8 мг/г, флавоноїди у кількості 35,6 мг/г, а вміст артемізиніну був на рівні 1,64 мг/г. В одній з ліній *A. dracunculus* вміст фруктанів сягав 132,7 мг/г, флавоноїдів – 15,6 мг/г та артемізиніну – 1,05 мг/г. Серед цих ліній найвищий темп росту був притаманний *A. vulgaris*, який становив у 0,15 г сухої біомаси за 21 добу вирощування. Екстракти з обраних ліній коренів проявляли антиоксидантну та противірусну активності.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень оптимізовано методику *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації рослин *Artemisia annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris*, отримано «бородаті» корені цих рослин, визначено вміст природних для рослин цих видів біологічно активних сполук (фруктанів, цукрів, інуліну, флавоноїдів). Доведено, що генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* може бути використана для підвищення вмісту таких сполук як фруктани (*A. annua* та *A. dracunculus*), артемізинін (*A. vulgaris*) та флавоноїди (*A. annua* та *A. vulgaris*).

1. Використання листків як оптимального типу експланту та оптимізованої методики трансформації дозволяє отримати «бородаті» корені полину з частотою до 100%.
2. *A. rhizogenes* може бути використана для генетичної трансформації рослин *A. dracunculus*. З використанням цих бактерій уперше було отримано культуру «бородатих» коренів цього виду.
3. Трансформування рослин полину *A. annua* та *A. vulgaris* з використанням *A. rhizogenes* дає можливість отримати «бородаті» корені з геном інтерферону людини *ifn- α 2b*, що було продемонстровано уперше. Екстракти з цих коренів виявляли противірусну активність до 1414 МО/г маси.
4. Індолілоцтова та індолілмасляна кислоти у концентраціях 0,5 мг/л прискорюють ріст трансформованих коренів *A. annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris* у 2-3 рази та можуть бути використані для отримання великої кількості рослинної сировини.
5. Трансформація з використанням *A. rhizogenes* призводить до змін клітинного метаболізму, що виражається у підвищенні вмісту біологічно активних сполук, зокрема, фруктанів до $183,1 \pm 1,05$ мг/г (*A. annua* та *A. dracunculus*), артемізиніну до 1,02 мг/г (*A. vulgaris*) та флавоноїдів до $35,6 \pm 1,38$ мг/г сухої речовини (*A. annua* та *A. vulgaris*), а також до появи нехарактерних для

контрольних коренів сполук — манітолу (*A.vulgaris*) та галактози (*A. dracunculus*) у кількості до 18.72 ± 0.20 мг/г та $0,9 \pm 0,07$ мг/г сухої речовини відповідно.

6. Трансформація також впливає на рівень антиоксидантної активності, оскільки було виявлено підвищення здатності нейтралізувати DPPH⁺ радикал екстрактами з усіх досліджених ліній трансгенних коренів *A. annua* у порівнянні з контролем.
7. Наявність достатньої кількості ліній «бородатих» коренів дозволяє на основі морфо-фізіологічних та біохімічних досліджень провести відбір ліній-продуцентів БАС. Зокрема, було відібрано «бородаті» корені рослин *A. vulgaris*, які одночасно накопичували на 1 г сухої речовини 111 мг фруктанів, 45,3 мг флавоноїдів, 1,02 мг артемізиніну; корені *A. annua*, які одночасно накопичували фруктани (160,8 мг), флавоноїди (35,6 мг), артемізинін (1,64 мг); корені *A. dracunculus*, які також одночасно накопичували фруктани (132,7 мг), флавоноїди (15,6 мг) та артемізинін (1,05 мг).
8. Генетична трансформація з використанням *A. rhizogenes* може бути використана для отримання культур «бородатих» коренів *A. annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris*, що є потенційними продуцентами сполук з антиоксидантними та противірусними властивостями, у тому числі флавоноїдів, артемізиніну та фруктанів.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Study of artemisinin and sugars accumulation in *Artemisia vulgaris* and *Artemisia dracunculus* "hairy" root cultures / **К. Дробот**, N. Matvieieva, A. Ostapchuk, M. Kharkhota // Preparative Biochemistry and Biotechnology – 2017 – Vol.47, №8. – P. 776-781. (Здобувачем здійснювалося вирощування коренів для експерименту, спільно із співавторами проведено планування експерименту, підготовлено зразки для хроматографічних аналізів, взято участь в аналізі отриманих результатів та формулюванні висновків, написано основну частину статті)
2. **Дробот К.О.** Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn- α 2b* людини / **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, Н.А. Матвєєва // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2015 – Т.17. – С.145-147. (Здобувачем уведено в культуру рослини полину звичайного, проведено експеримент з генетичної трансформації, отримано «бородаті» корені, зроблено висновки, написано основну частину статті)
3. **Дробот К.О.** Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / **К.О. Дробот**, Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – Т. 19. – С. 117-120. (Здобувачем уведено в культуру рослини *Artemisia annua*, проведено експеримент з генетичної трансформації, отримано «бородаті» корені, написано основну частину статті)

4. Вплив *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст біологічно активних сполук у трансгенних коренях *Artemisia vulgaris* / **К.О. Дробот**, А.М. Остапчук, В.П. Дуплій, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика. – 2016. – Т. 48, № 5. – С. 450-455. (Здобувачем проводилося вирощування коренів для досліджень, пробопідготовка рослинного матеріалу для проведення аналізу на вміст артемізиніну, опрацювання результатів, написано основну частину статті)
5. Порівняльна оцінка вмісту поліфруктанів у бородатих коренях та рослинах роду *Artemisia* / В.П. Дуплій, **К.О. Дробот**, Я.І. Ратушняк, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика – 2017. – Т.49, №4. – С. 321-327. (Здобувачем проводилося вирощування рослин та коренів для досліджень, а також здійснено аналіз рослинного матеріалу на вміст поліфруктанів)
6. **Drobot K. O.** Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) “hairy” root culture production / **К.О. Drobot**, А.М. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Biotechnologia acta. – 2016. – Vol.9, №2. – P. 55-60. (Здобувачем уведено в культуру рослини *Artemisia dracunculus*, проведено експеримент з генетичної трансформації, отримано культуру «бородатих» коренів, написано основну частину статті)
7. **Дробот Е.А.** *In vitro* растения рода *Artemisia* как продуценты биологически активных соединений / **Е.А. Дробот**, Н.А. Матвеева // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2015. – № 1 – P.127-130. (Здобувачем уведено в культуру рослини полину, проведено мікроклональне розмноження цих рослин, досліджено особливості їх росту, написано основну частину статті).
8. **Drobot K.** Artemisinin content in *Artemisia vulgaris* L. *in vitro* cultivated plants and “hairy” roots / **К. Drobot**, А. Ostapchuk, N. Matvieieva // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2016. – № 1 – P. 518-520. (Здобувачем спільно із співавторами проведено планування експерименту, підготовлено експериментальні зразки, зроблено висновки, взято участь в аналізі отриманих результатів та формулюванні висновків, написано основну частину статті)
9. Artemisinin and total flavonoid content in *in vitro* cultivated *Artemisia annua* L. “hairy” root culture / **К. Drobot**, N. Matvieieva, M. Kharkhota, A. Shakhovsky, Ya. Ratushnyak // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2017. – № 1 – P. 91-94. (Здобувачем підготовлено експериментальні зразки для аналізу на вміст артемізиніну, проведено аналіз на вміст флавоноїдів у екстрактах коренів, написано основну частину статті)
10. Some investigations of using of biostimulators for the activation of seeds germination and stimulation of roots growth / N. Matvieieva, S.P. Ponomarenko, **К.О. Drobot**, Е.

Maluszynska, A. Szydlowska // II Konferencja Naukowa “Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin”, 25-26 lutego 2015. – Warszawa, 2015. – P. 78. *(Здобувачем проведено експериментальну частину роботи)*

11. Противірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2B$ людини / Є.В. Ісаєва, А.А. Лісняк, О.П. Трохименко, А.О. Потрохов, **К.О. Дробот**, Н.А. Матвєєва // Тези доповідей ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття», 24 квітня 2015. – Київ, 2015. – С.45. *(Здобувачем підготовлено екстракти «бородатих» коренів полину для тестування противірусної активності)*

12. Flavonoids content in sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) “hairy” root culture / **К.О. Дробот**, N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky // Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June, 2017 – Kyiv, 2017. – P.67. *(Здобувачем отримано рослинний матеріал та проведено біохімічні дослідження екстрактів коренів полину, написано статтю у співавторстві)*

13. **Drobot K.O.** Transgenic *Artemisia dracunculus* L. “hairy” root culture construction / **К.О. Дробот**, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Тези доповідей Міжнародної наукової конференція «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології», 11-13 жовтня, 2015 р. – Львів, 2015. – С. 110. *(Здобувачем уведено в культуру рослини *Artemisia dracunculus*, проведено експеримент з генетичної трансформації, отримано «бородаті» корені, написано основну частину статті)*

14. Матвєєва Н.А. Противірусна активність екстрактів трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* / Н.А. Матвєєва, **К.О. Дробот**, О.П. Трохименко // Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості», 17-18 жовтня, 2017 р. – Харків, 2017. – С 68-71. *(Здобувачем підготовлено екстракти «бородатих» коренів полину для тестування противірусної активності)*

15. “Hairy” root cultures as a source of biologically active substances / N. Matvieieva, **К. Дробот**, A. Shakhovsky, A. Ostapchuk, Yu. Kudryavets // International Conference «Smart Bio», 18-20 May, 2017. – Каунас, 2017. – P. 38. *(Здобувачем підготовлено рослинний матеріал та екстракти «бородатих» коренів полину для проведення біохімічних досліджень)*

16. Пат. КМ № 116312 Україна. Спосіб отримання культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia dracunculus* L. / Н.А. Матвєєва, **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, В.П. Дуплій – Опубл. 20. 03. 2017. *(Здобувачем уведено в культуру рослини *Artemisia dracunculus*, проведено експеримент з оптимізації генетичної трансформації, отримано «бородаті» корені)*

АНОТАЦІЯ

Дробот К.О. Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2018.

У роботі наведено результати з оптимізації методики *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації рослин *Artemisia annua*, *A. dracuncululus* та *A. vulgaris*, отримання «бородатих» коренів цих рослин, визначення вмісту природних для рослин цих видів біологічно активних сполук (фруктанів, цукрів, інуліну, флавоноїдів) та визначено перспективу використання культури «бородатих» коренів цих рослин у якості джерела БАС.

Використані у роботі рослини було введено в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння. Генетичну трансформацію цих рослин було проведено за допомогою *A. rhizogenes*. Визначено вміст біологічно активних сполук (флавоноїдів, фруктанів, цукрів та артемізиніну) та біологічну активність (антиоксидантну та противірусну) екстрактів «бородатих» коренів та коренів нетрансформованих рослин.

Отримані результати свідчать про те, що генетична трансформація з використанням *A. rhizogenes* може бути використана для отримання культур «бородатих» коренів *A. annua*, *A. dracuncululus* та *A. vulgaris*, які є потенційними продуцентами біологічно активних сполук, у тому числі флавоноїдів, артемізиніну та фруктанів.

Було показано можливість збільшення вмісту фруктанів (*A. annua* та *A. dracuncululus*), артемізиніну (*A. vulgaris*), флавоноїдів (*A. annua* та *A. vulgaris*) у трансгенних коренях; виявлено здатність трансформованих коренів до синтезу нехарактерних для контрольних коренів цукрів: манітолу (*A. vulgaris*) та галактози (*A. dracuncululus*); встановлено збільшення рівня протирадикальної активності у трансформованих коренях полину; уперше показано можливість отримання «бородатих» коренів полину з геном синтезу інтерферону людини *ifn- α 2b* та визначено противірусну активність отриманих з них екстрактів.

Ключові слова: генетична трансформація, *Artemisia annua*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia dracuncululus*, *Agrobacterium rhizogenes*, культура «бородатих» коренів, біологічно активні сполуки, антиоксидантна активність, противірусна активність.

АННОТАЦИЯ

Дробот Е.А. Культура трансгенных корней растений рода *Artemisia* как источник биологически активных соединений. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2018.

В работе приведены результаты исследований по оптимизации методики *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной генетической трансформации растений *Artemisia vulgaris* L., *A. annua* L., *A. dracuncululus* L., получению «бородатых» корней этих растений, а также изучение накопления биологически активных соединений в корнях растений рода и оценено перспективу использования культуры «бородатых» корней этих растений в качестве источника БАС.

Использованные в работе растения были введены в асептическую культуру путем поверхностной стерилизации семян. Для генетической трансформации этих растений использовали *A. rhizogenes*. Определено содержание биологически активных соединений (флавоноидов, фруктанов, сахаров и артемизинина) и биологическую активность (антиоксидантную и противовирусную) экстрактов «бородатых» корней и корней нетрансформированных растений.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что *Agrobacterium*-опосредованную генетическую трансформацию можно использовать для получения культур «бородатых» корней *A. annua*, *A. dracuncululus* и *A. vulgaris*, которые являются потенциальными продуцентами биологически активных соединений, в том числе флавоноидов, артемизинина и фруктанов. В частности была показана возможность увеличения содержания фруктанов (*A. annua* и *A. dracuncululus*), артемизинина (*A. vulgaris*), флавоноидов (*A. annua* и *A. vulgaris*) в трансгенных корнях, определено способность трансформированных корней к синтезу нехарактерных для контрольных корней сахаров: маннитола (*A. vulgaris*) и галактозы (*A. dracuncululus*), зафиксировано увеличение уровня протирадикальной активности в некоторых линиях трансформированных корней полыни; впервые показана возможность получения «бородатых» корней полыни с геном синтеза интерферона человека *ifn- α 2b*, а также определена противовирусная активность полученных из них экстрактов.

Ключові слова: генетическая трансформация, *Artemisia annua*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia dracuncululus*, *Agrobacterium rhizogenes*, культура «бородатых» корней, биологически активные соединения, антиоксидантная активность, противовирусная активность.

SUMMARY

Drobot K.O. “Hairy” root culture of *Artemisia* spp. plants as a source of biologically active compounds — Qualification scientific work (Manuscript).

Dissertation for a degree of the Candidate of Biological Sciences (Ph.D) in specialty 03.00.20 – Biotechnology (091 – Biology). The study has been performed at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences, Ukraine.

This work presents results of the study devoted to optimization of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation and “hairy” roots obtaining of *Artemisia vulgaris* L., *A. annua* L., *A. dracunculus* L. plants. The accumulation of biologically active compounds in roots of these plants and the usage prospect of “hairy” root cultures as a source of biologically active compounds were also reviewed.

A. vulgaris, *A. annua* and *A. dracunculus* plants were introduced into aseptic culture via surface sterilization method using chlorine bleach. It was shown that this approach was effective and resulted in germination of up to 100% seeds. We optimized micropropagation conditions and have shown that cultivation of studied plants on MS medium supplemented with 0,5 mg/l BAP and 0,05 mg/l NAA have led to accelerated shoots formation.

Genetic transformation of studied plants was carried out using *A. rhizogenes* A4 wild strain, as well as those which carried pCB 161 or pCB 124 vectors. The morpho-physiological peculiarities (such as growth rate) of “hairy” root cultures were studied. The effect of exogenous growth regulators on root growth was determined. The content of biologically active compounds (such as flavonoids, fructans, inulin, sugars and artemisinin) in *Artemisia* “hairy” roots and biological activity (antioxidant and antiviral activities) of their extracts were determined.

Our results suggest that *Agrobacterium*-mediated genetic transformation can be used for *A. annua*, *A. dracunculus* and *A. vulgaris* “hairy” roots obtaining. The latter could be used as a source of biologically active compounds, including flavonoids, artemisinin and fructans. We particularly showed the possibility of the increase in the content of fructans (for *A. annua* and *A. dracunculus*), artemisinin (for *A. vulgaris*) and flavonoids (for *A. annua* and *A. vulgaris*) in transgenic roots.

We observed a content increase of flavonoids only in some *A. annua* and *A. vulgaris* transgenic lines. At the same time *A. dracunculus* “hairy” roots accumulated flavonoids less than control roots.

It was determined that after genetic transformation of *A. vulgaris*, 40% of the “hairy” root lines had higher content of this compound as compared to control, other 40% of lines didn't shown a significant change in its content, and in last 20% of lines a decrease in the content of artemisinin was observed. The contents of artemisinin in *A. annua* and *A. dracunculus* “hairy” roots were lower than in the roots of non-transformed plants.

The increased accumulation of fructans in *A. annua* and *A. dracunculus* “hairy” roots as compared to the control ones was observed. However, the contents of these compounds in *A. vulgaris* “hairy” roots were lower than such in the roots of non-

transformed plants. Accordingly, the highest fructans content — 183,1±1,05 and 160,8±2,81 mg/g of DW — was observed in *A. dracuncululus* and *A. annua* transgenic lines respectively, and the lowest — 48,01±11,18 mg/g of DW — in *A. vulgaris* “hairy” roots.

Moreover, we showed the ability of transformed roots to accumulate compounds, which were not inherent for control roots, such as mannitol (in *A. vulgaris*) and galactose (in *A. dracuncululus*).

We also observed increased antiradical activity of *Artemisia* “hairy” root extracts. The ability of transgenic roots extracts to reduce DPPH⁺ radical varied in the wide range from 22±4,2 up to 93±5%.

It has been shown that extracts of transgenic roots, which were carrying the human *ifn-α2b* gene also possessed antiviral activity. *A. vulgaris* and *A. annua* “hairy” root lines were significantly different in their interferon-like activity, which varied in range 642-1,414 IU/g of fresh weight. The highest activity was observed in extracts from two lines of *A. vulgaris* transgenic roots and two lines of *A. annua* — 1414 and 1212 IU/g of fresh weight, respectively.

It appeared, that some lines of *A. vulgaris* and *A. annua* “hairy” roots showed the highest growth rates, while *A. dracuncululus* “hairy” roots characterized by the slow growth rate. The variability of this parameter within each species was statistically significant and did not depend on the vector used. For all studied “hairy” root, the use of 0.5 mg/l of indolylacetic or indolylbutyric acids accelerates the root growth and increases the mass gain.

This is the first report of the *Artemisia* “hairy” root culture, which was established using agrobacteria with the human *ifn-α2b* gene and which extracts possessed an antiviral activity.

Key words: genetic transformation, *Artemisia annua*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia dracuncululus*, *Agrobacterium rhizogenes*, “hairy” root culture, biologically active compounds, antioxidant activity, antiviral activity.

