

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»**

МАТВЄЄВА НАДІЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК 575.222.7:581.1

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

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у лабораторії адаптаційної біотехнології відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кучук Микола Вікторович,
директор Інституту клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Дробик Надія Михайлівна,
декан хіміко-біологічного факультету Тернопільського
національного педагогічного університету імені
Володимира Гнатюка Міністерства освіти і науки України

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Тищенко Олена Миколаївна,
в.о. завідувача відділу генетичної інженерії Інституту
фізіології рослин та генетики НАН України

доктор біологічних наук, професор
Косаківська Ірина Василівна,
завідувач відділу фітогормонології Інституту ботаніки
імені М.Г. Холодного НАН України

Захист відбудеться «29» березня 2016 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського 2а. Тел./Факс: (044) 434 37 77.

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

Автореферат розіслано « » лютого 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Баєр Г.Я.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Завдяки безперервному прогресу у галузі молекулярної біології, генетики, клітинної біології на сьогодні широкого наукового та практичного вжитку набули технології генетичного удосконалення клітин рослин, мікроорганізмів, тварин. Розроблено ефективні методи культивування рослин у асептичній культурі, регенерації пагонів рослин, культивованих *in vitro*, а також ряд методів генетичної трансформації (Chilton et al., 1977; Klein et al., 1987; Liu et al., 2011; Ishigaki et al., 2012). Все ширшого розповсюдження набувають біотехнологічні прийоми перенесення генів до ядерної та хлоропластної ДНК (Chiyoda et al., 2014).

З кінця минулого століття було розпочато створення рослин, стійких до хвороб (Prins et al., 2008), шкідників (Yang et al., 2015) та природних стресових факторів (Alvarez-Gerding et al., 2015; Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Досягнення біотехнології рослин знайшли практичне застосування також і у медицині. Генно-інженерні підходи використовуються для створення рослин - продуцентів біологічно активних сполук (БАС) (Schillberg et al., 2003), які природно синтезуються у рослинах, а також рекомбінантних білків (Shaaltiel et al., 2007; Kim et al., 2008). Серед перших можна відзначити фруктозовмісні цукри, що мають пребіотичні, гепатопротекторні, протидіабетичні, протипухлинні властивості, регулюють обмін кальцію, нормалізують вагу (Kelly, 2008; Pool-Zobel, 2005; Dávila-Céspedes et al., 2014; Vogt et al., 2015). 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* (Griffin, 2001).

Трансгенні рослини можуть бути джерелом рекомбінантних білків медичного призначення. Зокрема, запропоновано використання рослин-продуцентів бактеріальних та вірусних антигенів для створення так званих «їстівних» вакцин (Mason et al., 2002). Практично спрямованим є отримання трансгенних рослин, які синтезують рекомбінантні БАС з імуномодельними та противірусними властивостями, а також створення рослин-продуцентів антигенів мікобактерій для використання у лікуванні туберкульозу. Так, розробляються нові підходи для створення більш ефективної вакцини нового покоління проти туберкульозу (Doherty et al., 2005), продуцентом складових якої можуть бути саме трансгенні рослини (Permyakova et al., 2015). Опубліковано результати експериментів щодо перенесення до геному рослин гена інтерферону- $\alpha 2b$ людини (Lia et al., 2007; Leede et al., 2008; Luchakivskaya et al., 2011). Однак, відома досить широка варіабельність як кількості, так і активності рекомбінантних сполук, синтезованих у рослинах різних видів. Отже, актуальними є розширення досліджень, спрямованих на

вивчення можливості синтезу інтерферону у рослинній системі, визначення видів рослин, які здатні синтезувати цю сполуку у біологічно активній формі, створення рослин-продуцентів інтерферону.

Використання у біотехнологіях лікарських рослин, які традиційно застосовують у медицині, дозволяє отримати суперпродуценти БАС та одночасно сприяти збереженню природних популяцій рослин (Brower et al., 2008). Більшість таких рослин досі не використовувалися як об'єкти генетичної інженерії. Разом з тим, перенесення до їх геному генів синтезу фармакологічних білків дозволяє отримати нові форми, які продукують як природні, так і рекомбінантні БАС. Увагу привертають також рослини, у яких синтезується протеїн у досить високих кількостях, наприклад, рослини ряски.

Серед рослин, які застосовуються у традиційній та народній медицині і становлять інтерес для досліджень, можна назвати їстівні *Cichorium intybus* L., лікарські *Ruta graveolens* L., *Bidens pilosa* L., *Artemisia tilesii* Ledeb, *Tragopogon porrifolius* L. Для трьох останніх досі не розроблено методики культивування та мікроклонального розмноження, а також генетичної трансформації. Разом з тим, виявлено цитостатичні властивості екстрактів з рослин причепи, протимікробну активність рути, гепатопротекторну у цикорію та козельців, антималярійну – у полину, що дозволяє використовувати ці рослини для створення засобів для лікування спектру захворювань.

Отже, нині ведуться дослідження з конструювання рослин з трансформованим геномом. Актуальним залишається вдосконалення методик та розроблення уніфікованих підходів, що дозволяють скоротити час отримання рослин із заданими властивостями та підвищити ефективність біотехнологічних досліджень. Важливим напрямком є 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 генами; відбір продуктивних ліній біотехнологічних рослин, які є джерелом отримання природних для рослин та рекомбінантних БАС для лікування вірусних, бактеріальних та інших захворювань. Розроблення універсальних високоефективних стратегій генетичної трансформації рослин, у тому числі лікарських, на основі цих розробок отримання лікарських рослин-продуцентів БАС, що синтезують рекомбінантні білки та інші сполуки медичного призначення, дозволить ефективно використати арсенал методів сучасної біотехнології для отримання трансгенних рослин з перспективою їхнього використання у медицині і 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 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 антимікробною дією.

У відповідності до мети роботи 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 *Lactuca sativa*, *Althaea officinalis*, *Cichorium intybus*, *Ruta graveolens*, *Artemisia tilesii*, *Bidens pilosa*, *Tragopogon porrifolius* (клас Дводольні) з генами, які кодують синтез інтерферону- $\alpha 2b$ людини або генами *esxA* та *fbpB* антигенів ESAT6 і Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*, або лише з генами агробактерій;

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

5. Визначити вплив генетичної трансформації на фізіологічні параметри росту отриманих ліній рослин та «бородатих» коренів;

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

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

8. Створити колекцію трансгенних рослин та коренів – продуцентів біологічно активних сполук.

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: культивування рослин *in vitro*; генетична трансформація за використання *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*; молекулярно-

біологічні методи (ПЛР, ЗТ-ПЛР); фізіологічні методи; біохімічні методи; метод високоефективної рідинної хроматографії; метод статистичної обробки.

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 отриманих результатів. Автором оптимізовано методику трансформації, що може бути використана для високоефективного створення біотехнологічних рослин і «бородатих» коренів різних видів, родів та родин – *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor*. 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 лікувальні 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, узагальненні експериментальних даних, формулюванні висновків, участі у написанні статей.

Апробація результатів 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 «Селекция, 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 «Агробіоразнообразие для улучшения питания, здоровья и качества жизни», 2015, Нітра, Словаччина та на семінарах відділу (2009-2015 р.р.).

Публікації. Оpubліковано 51 наукову роботу, що включають 34 статті у фахових, іноземних наукових журналах та монографіях, 16 тез у збірках матеріалів конференцій, один патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу та семи розділів (огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення), висновків та списку використаних джерел, що містить 854 посилання. Дисертація викладена на 361 сторінках комп'ютерного друку і містить 28 таблиць та 91 рисунок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ «Огляд літератури» присвячено детальному аналізу сучасного стану досліджень у напрямку біотехнології рослин, методів генетичної трансформації, у тому числі з використанням агробактерій, створенню рослин-продуцентів біологічно активних сполук, а також огляду останніх досліджень стосовно генетичної трансформації ряду їстівних та лікарських рослин, які становлять інтерес як продуценти біологічно активних сполук, зокрема таких як *Cichorium intybus* L., *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Lemna minor* L., *Artemisia tilesii* Ledeb., *Bidens pilosa* L., *Ruta graveolens* L.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вихідний матеріал. Для дослідження використовували рослини (рис. 1): *Cichorium intybus* L. Пала росска (а); *Lactuca sativa* L. Рубінове мереживо (б); *Althaea officinalis* L.(в); *Tragopogon porrifolius* L. (г); *Lemna minor* L. (д); *Artemisia tilesii* Ledeb (е); *Bidens pilosa* L. (ж); *Ruta graveolens* L. (з). Рослини полину було узято з колекції зародкової плазми Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Асептичні рослини салату, цикорію, алтеї, козельців, рути, причепи отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього його послідовно витримували у 70% етанолі (30 сек.), 25% розчині комерційного препарату “Білизна” (10 хв) та промивали тричі по 10 хв. у стерильній дистильованій воді; далі пророщували у чашках Петрі на агаризованому безгормональному середовищі 1/2МС (середовище Мурасіге та Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом мікроелементів, Murashige, Skoog, 1962) у темряві при 24°C. Асептичні рослини ряски отримано шляхом поверхневої стерилізації рослин, узятих з природної водойми озера Опечень (Київ). Їх витримували у 70% етанолі (30 сек.), 20% розчині препарату “Білизна” (10 хв) та промивали тричі по 10 хв. у стерильній дистильованій воді. Після стерилізації вирощували на агаризованому середовищі 1/2МС при 16-годинному світловому періоді та температурі +24°C.

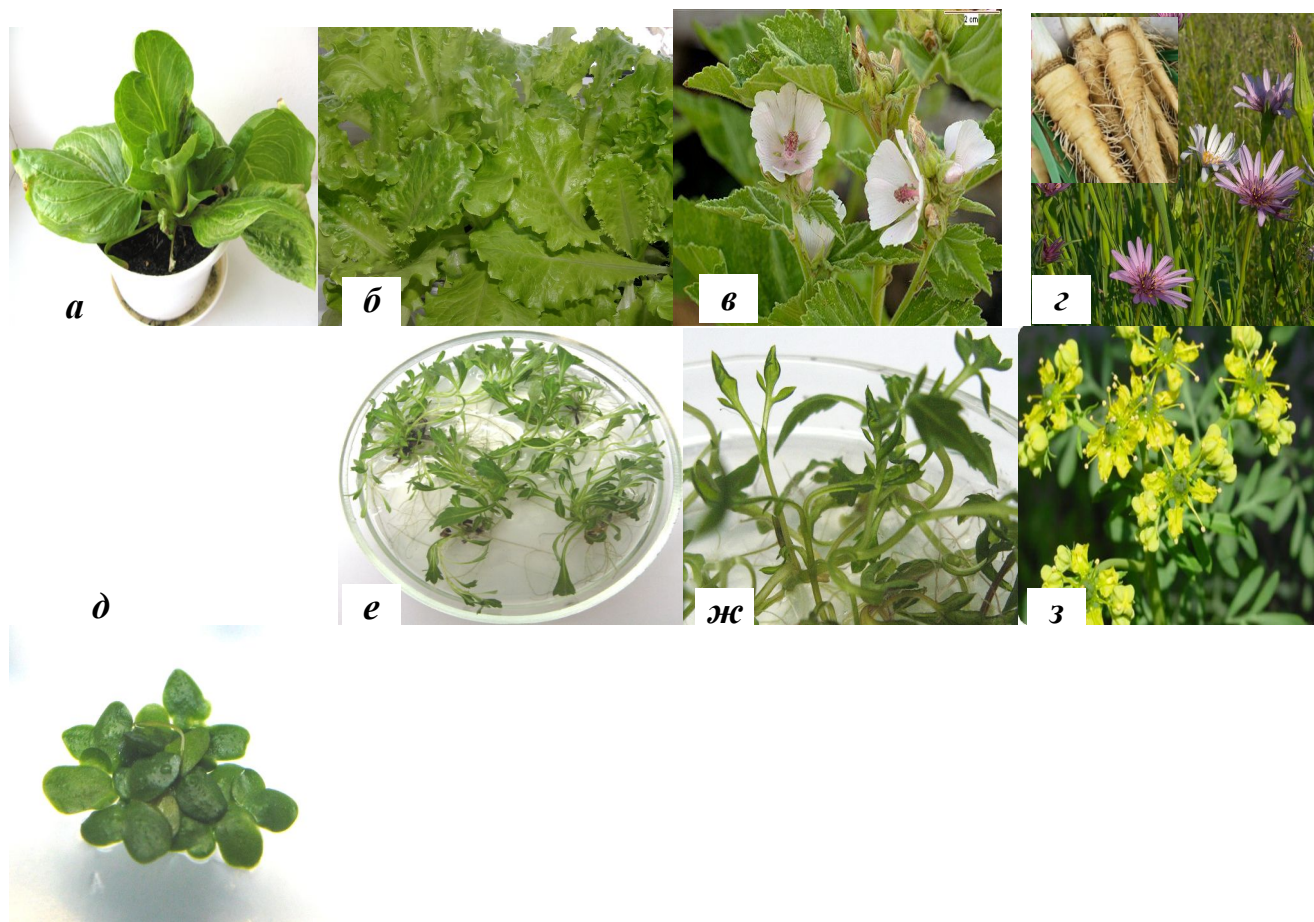


Рис.1 – Рослини, які використовували у дослідженнях (опис у тексті)

Агробактерії, які використовували для трансформації. Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 з векторними конструкціями pCB158, pCB124 та pCB161, дикого штаму *A. rhizogenes* A4; *A. tumefaciens* (штам GV3101) з векторними конструкціями pCB063, pCB124.

Вирощування агробактерій. Бактерії вирощували на шейкері (200 об./хв.) на середовищі LB (Маніатіс, 1984) з карбеніциліном (100 мг/л) та рифампіцином (50 мг/л) протягом 24-48 годин при температурі 28°C. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000g, 10хв.), осад ресуспендували у розчині 10мМ MgSO₄.

Векторні конструкції. Для трансформації рослин використовували векторні конструкції pCB063, pCB158, pCB124, pCB161 (рис. 2), створені в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

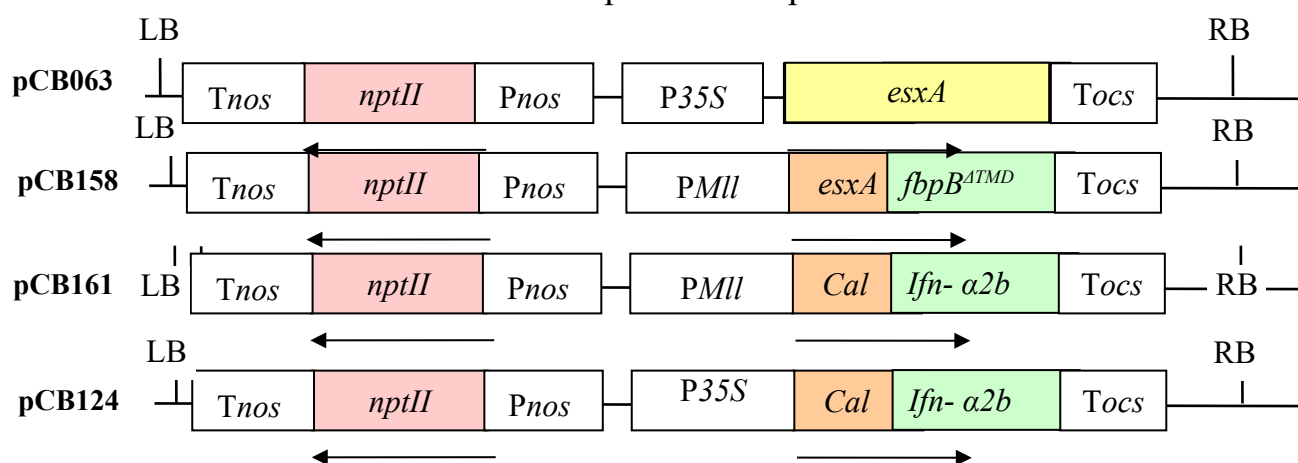


Рис. 2 – Схема Т-ДНК бінарних векторів: LB, RB – ліва і права межі Т-ДНК; *nptII* – ген *nptII* (NOS промотор і термінатор); *esxA* та *esxA:fbpBΔTMD* – гени, які кодують синтез антигенів ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD) (35S промотор і OCS термінатор), *ifn-α2b* – ген інтерферону-α2b (35S або MII промотори і OCS термінатор), *cal* – лідерна послідовність, що забезпечує транспорт цільового білка в апопласт.

Визначення селективної концентрації антибіотика та відбір стійких трансгенних рослин. Для визначення селективної концентрації використовували канаміцин (Км) у концентрації 10, 25, 50, 100 мг/л. Для тестування експланти культивували на відповідних середовищах з антибіотиком у наведених концентраціях. Експерименти проводили у трикратній повторності. За селективну концентрацію вважали таку, при якій зелені проростки або пагони були відсутні.

Оптимізація методики генетичної трансформації. 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; час культивування без селективного тиску. Експланти з насінками інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв., далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2МС протягом 1-10 діб; переносили на середовище 1/2МС, до якого додавали 600 мг/л цефотаксиму (Цф). Селективний антибіотик у концентрації 25 мг/л додавали через 1-14 діб. Ефективність застосованого протоколу оцінювали за частотою регенерації зелених у селективних умовах пагонів, яку визначали як відношення кількості експлантів із зеленими пагонами до загальної кількості експлантів, виражене у

відсотках. За оптимальний вважали такий протокол, за використання якого частота утворення зелених пагонів була найвищою для даного виду рослин.

Генетична трансформація цикорію з використанням *A. tumefaciens* та регенерація трансгенних пагонів. Для трансформації використовували *A. tumefaciens* штам GV3101 з вектором pCB063. Після кокультивування з агробактеріями сім'ядолі переносили на агаризоване середовище С1 для регенерації пагонів з 2,5 мг/л кінетину, 0,5 мг/л α -нафтилоцтової кислоти, 25 мг/л канаміцину 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 за відсотком експлантів з регенерованими на селективному середовищі зеленими пагонами. 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 укорінювали на середовищі 1/2МС за таких самих умов.

Трансформація рослин салату з використанням *A. tumefaciens* та регенерація трансгенних пагонів. Використовували *A. tumefaciens* штаму GV3101 з вектором pCB124, який мав селективний ген *nptII* та цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$ людини *ifn- $\alpha 2b$* . Трансформацію проводили за наведеною вище методикою. Для отримання регенерованих пагонів експланти вирощували на живильному середовищі L1 (3 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК) протягом 1-1,5 місяців, далі переносили на середовище L2, у якому була нижча концентрація регуляторів росту (0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л НОК). Укорінення отриманих пагонів проводили, культивуючи їх на середовищі 1/2МС без регуляторів росту.

Оптимізація умов регенерації рослин рути. 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 (0,5–2,5 мг/л), α –нафтилоцтової кислоти (0,05–0,5 мг/л) та 6-бензиламінопурину (0,5–2,5 мг/л) – загалом 18 варіантів середовищ. Частоту регенерації визначали як відсоткове відношення кількості експлантів з регенерованими пагонами до загальної кількості експлантів.

Трансформація рослин салату, цикорію, алтеї, козельців, причепи, рути та полину з використанням *A. rhizogenes*. Для отримання культур «бородатих» коренів використовували суспензії бактерій *A. rhizogenes*, які мали вектори pCB161 або pCB124 з цільовим геном інтерферону людини (рис. 2), та дикий штам А4. Застосовували оптимізовану методику, описану вище.

Субкультивування трансгенних коренів. Після формування коренів їх відділяли від експлантів та вирощували на агаризованому середовищі 1/2МС. Для субкультивування термінальні частини коренів довжиною 20-30 мм відділяли та переносили на поверхню агаризованого середовища 1/2МС у чашки Петрі. Час між субкультивуванням трансгенних коренів варіював від 10 до 30 діб у залежності від виду рослин та швидкості росту коренів.

Трансформація рослин ряски з використанням *A. rhizogenes*. У дослідженнях використовували культивовані у стерильних умовах рослини *L.minor*.

Для трансформації застосовували *A. rhizogenes* A4 з вектором pCB158 з цільовими генами *esxA* та *fbpB* антигенів ESAT6 і Ag85B *M. tuberculosis*, з вектором pCB124 з геном інтерферону людини (рис. 2) та дикий штам *A. rhizogenes* A4. Рослини розділяли на окремі листочки, які інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв., промокали фільтрувальним папером та культивували на середовище 1/2МС, переносили на середовище 1/2МС, до якого було додано 25 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксиму для відбору зелених трансформованих рослин.

Виділення загальної ДНК рослин. ДНК екстрагували із зелених листків або «бородатих» коренів, застосовуючи ЦТАБ метод. До 100 мг листків у пробірки додавали екстрагуючий буфер (1:2 вага/об'єм), гомогенізували, інкубували 20-30 хв. при 56°C. До гомогенату додавали рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1). Центрифугували 5 хв. при 2500 g, відбирали рідку фазу і повторювали обробку сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт. Додавали 2 об'єми буферу для осадження та залишали до утворення преципітату на 1-3 год., далі осаджували при 1500-2500 g протягом 7 хв. Осад розчиняли в 100мкл 1М NaCl. Додавали 2 об'єми етанолу і залишали на 1 год. 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% та 85% етанолом для видалення залишків солей і ЦТАБ та розчиняли у 50-100 мкл ТЕ-буферу.

Аналіз трансформованих рослин та «бородатих» коренів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Сумарну ДНК екстрагували зі зразків ЦТАБ-методом. Послідовності раймерів та умови проведення ПЛР наведено у табл. 1 та 2.

Таблиця 1 –

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

№	Ген	Праймери
1-2	<i>nptII</i>	f 5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' r 5'-gctctagatccagagtcccgctcagaag-3'
3-4	<i>esxA</i>	f 5'-ctgacatggcagagcagcagtggaattcgc-3' r 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'
5-6	<i>fbpB^{ΔTMD}</i>	f 5'-tctacagcgactggtacagc-3' r 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'
7-8	<i>ifn-α2b</i>	f 5'-ttgatgctcctggcacag-3' r 5'-ttctgctctgacaacctc-3'
9-10	<i>rolB</i>	f 5'-atggatcccaaatgctattcctccacga-3' r 5'-ttaggtcttttctcaggttactgcagc-3'
11-12	<i>virD</i>	f 5'-atgtcgcaaggcagtaagccca-3' r 5'-ggagtctttcagcatggagcaa-3'

Таблиця 2 –

Умови та розміри продуктів реакції ампліфікації

№ праймера	Умови ампліфікації			Розмір ампліфікованого фрагмента, п.н.
	Температура реасоціації, C	Час синтезу, сек	Кількість циклів	
1-2	65	30	33	622
3-4	62	30	33	299
5-6	62	30	33	484
7-8	60	30	33	396
9-10	56	30	33	780

11-12	60	30	33	432
-------	----	----	----	-----

Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш (20 мкл) складалася з однократного ПЛР-буферу з сульфатом амонію (Fermentas), 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Taq-полімерази (Fermentas), 2,0 мМ хлориду магнію, 10-50 нг ДНК-проби. Продукти ПЛР аналізували електрофорезом в 1,5 %-ному агарозному гелі в Tris–боратній буферній системі. Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем слугувала ДНК відповідного плазмідного вектора.

Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга κ-ДНК. Сумарну РНК виділяли за методикою, описаною у Logemann (1987). Матеріалом були листки асептичних рослин або корені. Сумарна РНК використовувалася як матриця для синтезу першого ланцюга κДНК (зворотних транскриптів). Синтез проводили з набором «Fermentas» за інструкцією виробника. Для кожної проби РНК проводили дві реакції – у присутності і у відсутності (негативний контроль) зворотної транскриптази. ПЛР-ампліфікацію синтезованих зворотних транскриптів проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Taq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші 20 мкл. Використовували праймери, специфічні до кодуєчої частини генів *nptII*, *ifn-α2b*, *esxA*, *fbpB* (табл. 1).

Визначення наявності білка Ag85B. Для визначення наявності цільового білка з трансгенних рослин ряски готували екстракти (Peterson et al., 2015). Аналіз наявності білків-антигенів Ag85B *M. tuberculosis* в рослинному матеріалі проводили методом Western blotting. Застосовували методику, описану у статті (Peterson et al., 2015). Для отримання зразків позитивного контролю використовували екстракти рослинного матеріалу, для якого раніше була продемонстрована наявність білка ESAT6-Ag85(B)dTMD-6His.

Особливості росту трансгенних рослин ряски у присутності K₂CrO₄. Рослини ряски (по 100 листеців) вирощували у чашках Петрі діаметром 60 мм у 10 мл рідкого середовища з K₂CrO₄ у концентрації за Cr(VI) 1, 2, 4 та 8 мМ. Через 3, 6, 12 та 21 добу визначали приріст кількості листеців $\Delta N = N_i - N_0$, де N_i – кількість листеців через 3, 6, 14 та 21 добу (i), N_0 – початкова кількість листеців; коефіцієнт росту рослин $K_p = n_i/n_0$, де n_i – кількість листеців через певний проміжок часу (i = 3-21 доба), n_0 – початкова кількість листеців ($n_0 = 100$); середній коефіцієнт стійкості рослин до Cr(VI) за період культивування рослин $R_{сер} = \Delta N_c / \Delta N_0$, де ΔN_c – приріст кількості листеців у присутності Cr(VI) у певній концентрації, ΔN_0 приріст кількості листеців у контролі; концентрацію Cr(VI) у середовищі та у рослинах.

Концентрацію Cr(VI) визначали за допомогою дифенілкарбозиду (ДФК) фотоколориметричним методом (Лур'є, 1979) на спектрофотометрі Eppendorf bioPhotometer plus ($\lambda = 550$ нм). Калібрували за розчинами K₂CrO₄. Експерименти проводили у трьох повторностях, статистичну обробку результатів здійснювали за стандартними методиками ($p < 0,05$).

Культивування трансгенних та контрольних рослин ряски за різних температурних умов. Для порівняльного визначення впливу температурних умов трансгенні та контрольні рослини ряски вирощували на рідкому живильному середовищі 1/2МС за умов: загальний час культивування 30 діб, з них у варіантах №1 +24° С протягом 30 діб; №2 – 2 доби при температурі +3° С; №3 – 15 діб +3° С; №4 – 20 діб +3° С; №5 – 25 діб +3° С; №6 – 2 доби +36° С; №7 – 4 доби +36° С. Для визначення приросту маси рослини зважували до (m_0) та після закінчення терміну культивування (m_1). Приріст маси визначали за формулою: $\Delta m = m_1 - m_0$, де m_1 – маса через один місяць, m_0 – вихідна маса листеців.

Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів. Вміст хлорофілів та каротиноїдів визначали після екстрагування етанолом за методикою Єрмаков, 1987. Контролем слугували нетрансформовані рослини, які вирощувалися *in vitro* за однакових умов.

Визначення швидкості росту трансгенних коренів. Швидкість росту визначали за приростом маси коренів за один місяць. Термінальні ділянки коренів (20 мм) відокремлювали, зважували та культивували на середовищі 1/2МС, +24°С. Через 1 міс. корені вилучали з чашок, промокали фільтрувальним папером, зважували. У кожному експерименті використовували по 20 експлантів. Експерименти проводили у трьох повторностях.

Визначення вмісту поліфруктанів (ПФ). Вміст ПФ визначали за методикою, яка базується на здатності кетоцукрів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі (Єрмаков, 1987). Концентрацію фруктанів визначали за калібрувальною прямою (калібрування проводили за розчинами фруктози).

Визначення оптимальних умов екстрагування ПФ. Використовували «бородаті» корені *S.intybus*, які вирощували на середовищі 1/2MS при +24°С протягом 6 тижнів. Корені промивали, висушували до постійної маси, подрібнювали; по 50 мг коренів вміщували в епандорфи, додавали по 1 мл дистильованої води і витримували при кімнатній температурі (+22°С) протягом 0,5, 1 та 24 години. Після цього проводили теплову екстракцію фруктанів на водяній бані при температурі 70, 80 і 90°С 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 описаним вище методом.

Дослідження впливу регуляторів росту на ріст «бородатих» коренів. Використовували трансгенні корені *S. intybus* (Матвєєва та ін., 2011). Термінальні ділянки 10 мм культивували на середовищі 1/2 МС протягом 30 діб при t° +24°С. До живильних середовищ додавали НОК, ІМК (0,1-0,5 мг/л), регулятори росту Біолан та Чаркор, МНТЦ«Агробіотех» (0; 2,5; 5 та 10 мкл/л). Визначали: приріст маси коренів (Δm), питомий вміст поліфруктанів (мг/г маси коренів), загальний вміст ПФ (мг/загальну масу коренів).

Визначення вмісту інтерферону. Для визначення вмісту інтерферону рослинний матеріал зважували, розтирали з фосфатним буфером рН 7,4, центрифугували при 15000 g, +4°С протягом 15 хв, супернатант відбирали. 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 хв (+4°C), супернатант поєднували з попереднім супернатантом. Отриманий екстракт використовували для визначення вмісту інтерферону з використанням набору реагентів «ProCon IF2 plus» (ТОВ «Протеїновий контур», Росія) відповідно до інструкції виробника.

Визначення вмісту загального білка. Використовували листки або «бородаті» корені. Аліквоту супернатанту (фосфатний буфер рН7,4), отриманого після центрифугування протягом 25 хв при 16000g (+4°C), використовували для визначення концентрації білка за методом Bradford (1976) на спектрофотометрі Ерпендорф при довжині хвилі 595 нм. Концентрацію білка вираховували за калібрувальним графіком (БСА, 10-100 мкг/мл).

Визначення протівірусної активності екстрактів. Для приготування екстрактів матеріал зважували, гомогенізували з буфером. Використовували буфер на основі Трис НСІ або фосфатний буфер рН7,4; також використовували модифікації буферів – додавали до них 1мМ інгібітора протеаз PMSF та 1% ДСН. Матеріал переносили до центрифужних пробірок і центрифугували 5 хв при 10000g (+ 4°C). Надосадову рідину відбирали. До осаду додавали буфер і центрифугували 25 хв при 16000g (+ 4°C). Аліквоту об'єднаних супернатантів використовували для визначення концентрації білка та протівірусної активності. Активність екстрактів визначали за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС), використовуючи субстратзалежні клітини MDBK, які культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з 10% сироватки новонародженого теляти, 40 мкг/л гентаміцину у вологій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. Через 2-3 доби, після того, як клітини утворювали на субстраті суцільний моношар, здійснювали їх пересів. В лунки 96-лункового планшету вносили по 200 мкл суспензії клітин MDBK в середовищі DMEM з 5% сироватки новонародженого теляти з розрахунку $2,5 \cdot 10^6$ клітин/планшет. Через 24 години у лунки вносили вихідний розчин зразків і титрували п'ятикратними розведеннями. У якості стандарту використовували міжнародний стандарт інтерферону-альфа ВООЗ (70000 МО), титрований 5-кратними розведеннями. Через 24 год. вносили 100 ЦТД вірусу в середовищі DMEM. Аналогічне тестування проводили з використанням клітинних ліній ПТП (перевивна культура клітин тестикул поросят) та L41 (культура субстратзалежних клітин кісткового мозку людини). Результати реєстрували через 24 години при 100% цитопатичної дії в контролі вірусу.

Визначення антиоксидантної активності (АОА). АОА визначали методом DPPH. Для приготування екстрактів рослинний матеріал зважували, гомогенізували у дистильованій воді, центрифугували при 10000 g протягом 10 хв. Використовували 10⁻⁴ М розчин DPPH у 96% етиловому спирті, реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. У кожену лунку планшету додавали розчин DPPH та відповідні розведення досліджуваних екстрактів (10, 5, 2,5 мкл); кінцевий об'єм реакційної суміші у лунці становив 200 мкл. Реакційна суміш витримувалась при +20°C у темноті протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину суміші при $\lambda = 550$ нм. Крім цього, вимірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації у спирті (без додавання DPPH). Як контроль використовували водний розчин аскорбінової кислоти 1мг/мл. Кількісно поглинання вільного радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою:

$A(k) = A(e)/A(k) \cdot 100$, де $A(k)$ – оптична густина контрольного розчину; $A(e)$ – оптична густина досліджуваного екстракту.

Визначення ДНК-протекторної активності екстрактів. Використовували метод кометного електрофорезу, який дозволяє кількісно оцінити ступінь пошкодження ДНК після дії УФ-опромінення. Рослини вирощували на агаризованому середовищі 1/2МС при температурі +24°C та 16-годинному освітленні. Для приготування екстрактів матеріал 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 ($\lambda=280$ нм, 40 Дж/м², 1 хв) для індукції тимінових димерів, витримували при 37°C для їх вирізання і появи розривів 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% 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°C, занурювали у лізуючий буфер (2,5 M NaCl, 100 m EDTA, 10 m Tris-HCl (рН 8,0), 1% Triton X-100). Лізис проводили 2 години при +4° С. Препарати витримували в ТВЕ буфері (0,089M Tris, 0,089M H₃BO₃, 0,002M EDTA, рН 7,5) 10 хв і проводили нейтральний електрофорез (4°C, 1 В/см, 300 мА). Аналіз препаратів проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії, використовуючи барвник DAPI. Фотографували, аналіз зображення проводили у програмі Comet Score, визначаючи відсоток ДНК у хвостах комет.

Визначення протимікробної активності екстрактів. Використовували водні, етанольні та ДМСО екстракти. Визначали активність на бактеріях *Micrococcus luteus* 3201, *Sporosarcina aquimarina* 188n2, *Microbacterium trichothecenolyticum* 3208 (о. Галіндез, Антарктика, ґрунт), *Bacillus simplex* 3s2 та *Bacillus mojavensis* 2s1 (Крим, Україна, гіперсолоне озеро), *Kocuria carniphila* Н7, *Micrococcus luteus* Н8 (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), *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B918 з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Інгібуючий ефект визначали диск-дифузним методом (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993). Рослинні екстракти (по 0,02 мл) вносили на стерильні диски (6 мм) з фільтрувального паперу і залишали для випаровування екстрагентів. Диски з нанесеними на них розчинниками (по 0,02 мл) використовували у якості негативного контролю. Диски з антибіотиками тетрацикліном, оксациліном, гентаміцином, ципрфлоксацином були використані як позитивний контроль. Бактерії культивували протягом 24 год при 28°C або 37°C. Антимікробну активність визначали за діаметром зони інгібування росту через 24-48 год.

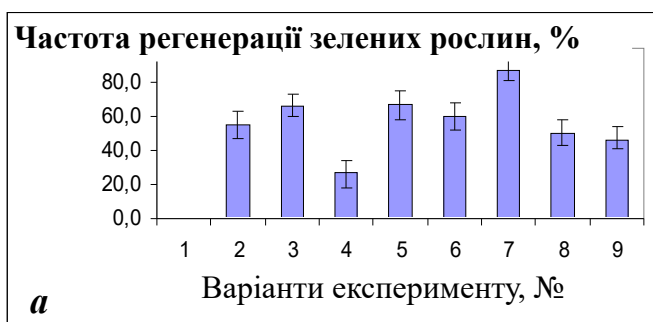
Методи статистичної обробки. Для аналізу експериментальних даних застосовували стандартні методи статистичної обробки (Лакін, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІСТИВНИХ РОСЛИН - ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

Трансформація рослин цикорію з використанням *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Для трансформації, яку здійснювали шляхом кокультивування експлантів з *A. tumefaciens*, використовували сім'ядолі 10-12-денних проростків. Векторна конструкція pCB063 мала селективний ген неоміцинфосфотрансферази II *nptII*, що визначає стійкість до канаміцину (nos промотор), та цільовий ген *esxA* антигена ESAT6 *M. tuberculosis* під контролем промотора гена 35S-білка з геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Селекцію трансгенних рослин проводили на середовищі з 25 мг/л канаміцину. Для визначення умов, які дають можливість з максимальною ефективністю проводити трансформацію. Після культивування у бактеріальній суспензії експланти переносили на середовище без цефотаксиму на 1, 2 та 3 доби, потім на середовище без канаміцину – на першу, сьому або чотирнадцяту добу (варіанти № № 1-9). При збільшенні часу вирощування без Км 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. 3а, стовп. 2, 3, 5, 6).

Збільшення часу вирощування у відсутності Цф, який пригнічує ріст бактерій, з 1 до 3 діб (варіант № 7) приводило до підвищення частоти регенерації до 86%. При збільшенні тривалості періоду відсутності селективного тиску частота регенерації зменшувалася, причому спостерігалася збільшення білих (чутливих до канаміцину) рослин. Аналогічна тенденція спостерігалася і у варіюванні кількості зелених рослин (рис.3б).



Кількість зелених рослин

б Варіанти експерименту, №

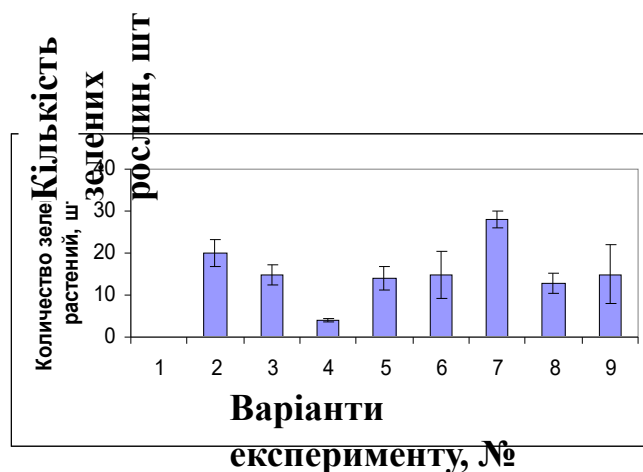


Рис. 3 – Залежність частоти регенерації (а) та кількості (б) зелених рослин від тривалості росту (доба) на середовищі без Цф/Км: стовпчики 1– 1/1доба; 2– 1/ 7 діб; 3–1/14 діб; 4–2/1 доба; 5–2/7 діб; 6–2/14 діб; 7–3/1 доба; 8–3/7 діб; 9–3/17 діб

Отже, оптимальними умовами трансформації, що дозволили з високою частотою отримати трансформовані рослини, виявилися такі: культивування три доби на середовищі без антибіотиків; далі додавання до середовища Цф; ще через добу – додавання селективного антибіотика. Використання такої оптимізованої схеми дало можливість отримати зелені у селективних умовах рослини з частотою до 86%. Методом ПЛР підтверджено, що усі аналізовані рослини мали як цільовий, так і селективний гени. Ген *nptII* транскрибувався в усіх аналізованих рослинах, в той час як у 37,5% аналізованих рослин транскрипцію цільового гена не детектувати (рис. 4).

Для отримання культури «бородатих коренів» цикорію трансформацію проводили за допомогою дикого агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 або з векторними конструкціями pCB158 та pCB161 з цільовими генами *esxA::fbpB^{ATMD}* або *ifn-α2b*. Трансформування проводили згідно з оптимізованою методикою. Частота отримання коренів (рис. 4) для pCB161 становила 42,3 %, для pCB158 – 5,9%, при використанні дикого штаму агробактерій A4 – 76%.

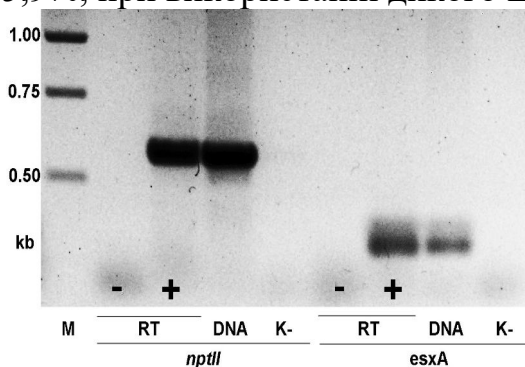


Рис. 4 – Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу зворотних транскриптів та геномної ДНК рослин цикорію, трансформованих pCB063: М – маркер O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas; DNA – ДНК трансгенної рослини; К – ДНК контролю; RT- и RT+ – ЗТ-ПЛР у відсутності ревертази та з ревертазою; *esxA* – ген антигена ESAT6; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферазиII

Після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації цикорію для регенерації пагонів (рис.5) не виникала необхідність у використанні регуляторів росту, їх утворення відбувалося спонтанно на середовищі 1/2МС. Процес регенерації пагонів з «бородатих» коренів цикорію був гормонезалежним, але світлозалежним. Отримані трансгенні корені мали високий регенераційний потенціал та не втрачали здатності до регенерації навіть при тривалому культивуванні в оптимальних для регенерації умовах (на світлі). Регенеровані рослини як в культурі *in vitro*, так і в умовах теплиці, не відрізнялися від контрольних. Разом з тим, вони швидше формували корені, для яких був характерний плагіотропний ріст. Для рослин, трансформованих *A. rhizogenes* з вектором з геном *ifn-α2b*, спостерігалось швидке (через 2-3 місяці після трансформації) *in vitro* формування квітконоса, що відрізняло їх від контрольних рослин, які мали типову для цикорію розеткову форму (рис. 6).

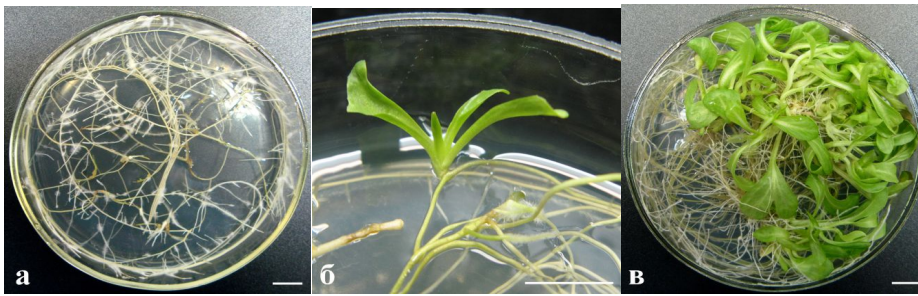


Рис. 5 – «Бородаті» корені цикорію (а) та регенерація рослин (б, в); масштабний відрізок - 1 см

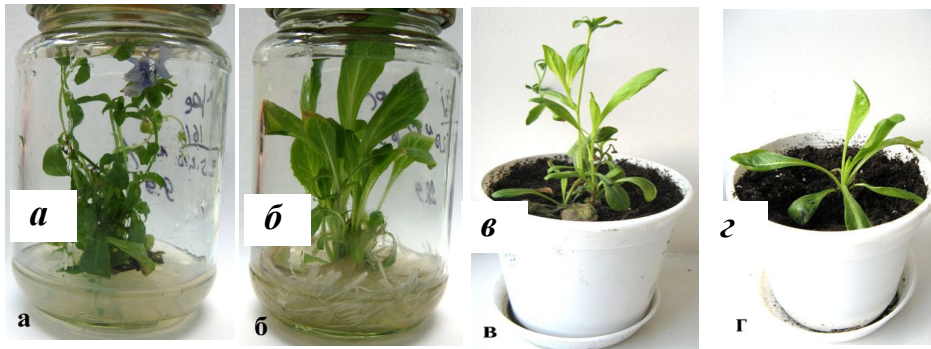


Рис. 6 – Формування квітконоса у трансгенних рослин з геном *ifn-α2b* (а, в) та розеткова форма (б, г) контрольної рослини в культурі *in vitro* (а, б) та у ґрунті (в, г)

T_L фрагмент Т-ДНК плазмиди pRi агропінового типу містить гени *rolA*, В, С, D, які задіяні у процесі коренеутворення і відповідають за фенотип «бородатих коренів» (Nilsson et al., 1997). При ПЛР аналізі отриманих коренів та регенованих рослин з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*, фрагмент ДНК розміром 780 п.н., а також фрагменти, що відповідають гену *nptII* та цільовим генам, знайдено в усіх аналізованих зразках (рис. 7, 8).

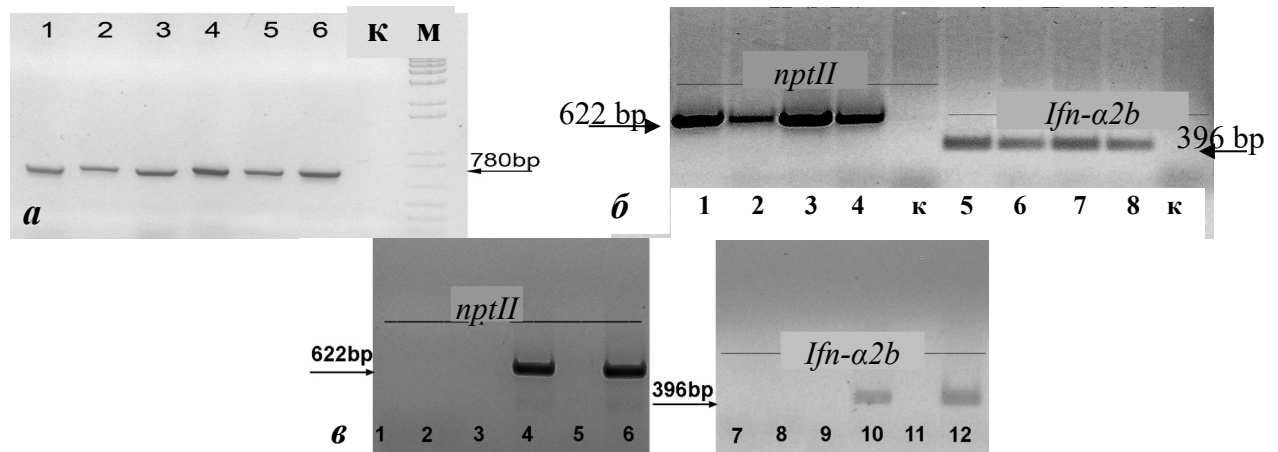


Рис. 7 – Електрофореграма продуктів ПЛР(а, б) та ЗТ-ПЛР(в) («бородаті» корені цикорію) з праймерами, специфічними до генів *rolB* (а), *ifn-α2b* та *nptII* (б); М – маркер GibcoBRL; к – ДНК контрольної рослини

У аналізованих лініях «бородатих» коренів та регенованих рослин відбувалася транскрипція селективного та цільового генів (рис. 8) та не детектували явище «мовчання» генів, яке було виявлено нами при аналізуванні трансгенних рослин цикорію, отриманих за використання *A. tumefaciens*.

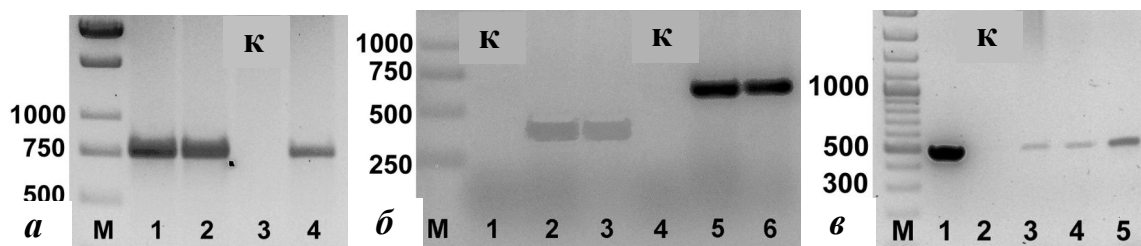


Рис. 8 – Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу рослин, регенованих з «бородатих» коренів цикорію, з використанням праймерів до генів *rolB*(а), *ifn-α2b* (б, 1-3), *nptII* (б, 4-6), та *fbpB^{ΔTMD}* (в): М– маркер; к – ДНК контрольних рослин

Використання *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes* для трансформування рослин салату. Трансформацію сім'ядоль культивованих *in vitro* 10-14 денних проростків здійснювали, використовуючи *A. tumefaciens* з вектором pCB124 з цільовим геном *ifn-α2b*. Використовували методику, оптимізовану при трансформації рослин цикорію. Це дозволило перевірити, чи є така методика достатньо універсальною та чи може бути використана для отримання трансгенних рослин іншого виду з високою ефективністю. Регенерацію пагонів ініціювали на живильному середовищі з додаванням 25 мг/л Км. Регенерація пагонів на експлантах починалася через 2-3 тижні після кокультивування з агробактеріями (рис. 9а). Частота регенерації становила до 81%±5,11. Після проведення ПЛР наявність на електрофореграмах продуктів відповідного розміру (622 п.н та 396 п.н.) свідчила про присутність цільового та селективного генів у всіх аналізованих рослинах. ЗТ-ПЛР аналіз підтвердив активність перенесених генів, оскільки в усіх аналізованих рослинах детектували мРНК цільового та селективного генів (рис. 9 б, в).

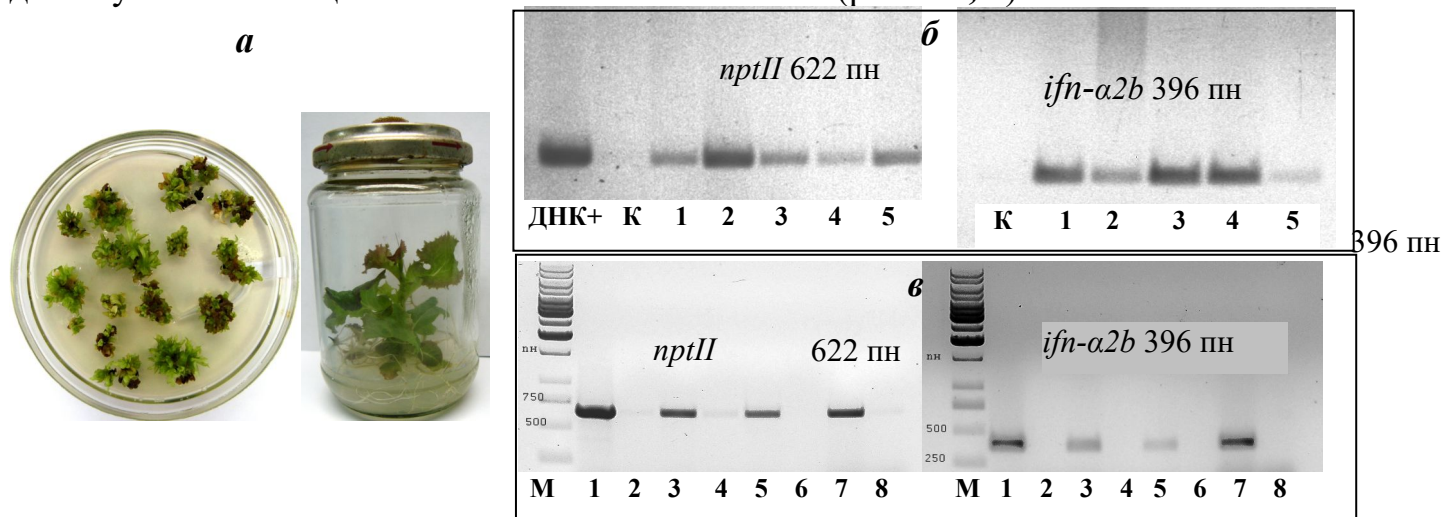


Рис. 9 – Регенерація пагонів салату (а) у селективних умовах після трансформування *A. tumefaciens* та електрофореграма продуктів ПЛР (б) та ЗТ-ПЛР (в) аналізу з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII* та *ifn-α2b*

Для отримання «бородатих» коренів салату трансформацію здійснювали кокультивуванням сім'ядоль або листків з суспензією *A. rhizogenes* з векторами pCB124, pCB161 (гени *nptII* та *ifn-α2b* людини) та штамом *A. rhizogenes* A4. Ріст коренів на експлантах на безгормональному живильному середовищі починався через 10-14 діб (рис. 10). Частота утворення коренів відповідно становила

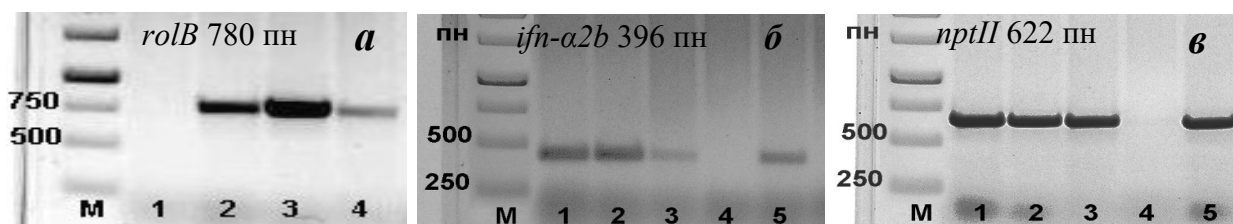
74,60±5,5%, 83,33±3,70 та 82,60±6,4%. Вони мали характерні ознаки – значне розгалуження, гормонезалежний ріст, негативний геотропізм. Для отримання трансгенних рослин з цих коренів використовували живильне середовище МС з кінетином і НОК (3.0 та 0.5 мг/л відповідно), оскільки на безгормональному середовищі пагони не формувалися. За результатами ПЛР-аналізу усі отримані після трансформації лінії мали як селективний, так і цільовий гени (рис. 11).

Хоча ЗТ-ПЛР аналіз визначив, що проаналізовані лінії регенерованих з «бородатих» коренів рослин салату мали ген *rolB*, проте їх фенотип не мав особливостей, характерних для *A. rhizogenes*-трансформованих рослин. Разом з тим, ці рослини відрізнялися від контрольних за раннім витягуванням стебла і формуванням квітконоса (рис.11 з). Такий фенотип ми також спостерігали у рослин цикорію, трансформованих *A. tumefaciens* з геном інтерферону- $\alpha 2$ в людини. Оскільки і рослини салату, і рослини цикорію, які мали змінений фенотип однакового характеру, отримано з використанням вектора з геном *ifn- $\alpha 2b$* , можна припустити вплив наявності саме цього гена.

Отже, показано можливість використання *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes* для отримання трансгенних рослин або культури «бородатих» коренів їстівних рослин цикорію та салату з геном *ifn- $\alpha 2b$* , генами мікобактерій або лише з генами агробактерій з частотою трансформації до 86% (цикорій, *A. tumefaciens*), 76% (цикорій, *A. rhizogenes*), 81% (салат, *A. tumefaciens*), 83% (салат, *A. rhizogenes*). В усіх аналізованих лініях методом ПЛР та ЗТ-ПЛР підтверджено наявність і активність перенесених генів, однак у ряді ліній цикорію було відсутнє транскрибування цільового гена. Регенеровані з трансгенних коренів рослини мали селективний і цільові гени, а також ген *rolB* *A. rhizogenes*. Отримані лінії можуть становити практичний інтерес як джерело природних (фруктани) та рекомбінантних (інтерферон) біологічно активних сполук.



Рис. 10 – Формування коренів салату після кокультивування з суспензією *A. rhizogenes* (а), ріст «бородатих» коренів (б), регенерація пагонів (в), формування квітконосу у трансгенної рослини (г) та розеткова форма контрольної рослини (д)



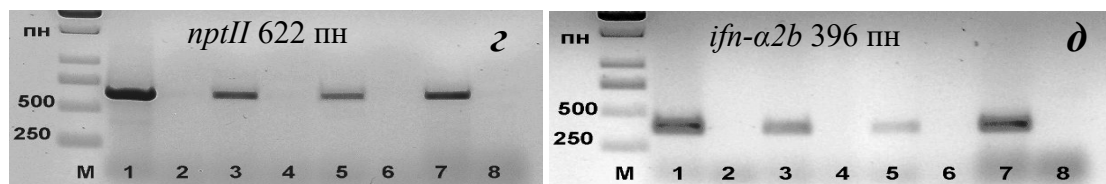


Рис. 11 – Електрофореграма продуктів ПЛР загальної ДНК (**а-в**) та ЗТ-ПЛР (**з, д**): *rolB* (**а**), *ifn-α2b* (**б, д**) та *nptII* (**в, з**); **а**: 1 – ДНК контрольної рослини; 2-4 – ДНК трансгенних рослин; **б, в**: 1-3 – ДНК трансгенних рослин; 4 – ДНК контрольної рослини; 5 – плазмідна ДНК; **з, д**: 1-8 – ДНК трансгенних рослин; непарні треки – синтез зворотних транскриптів у присутності ревертази, парні – ЗТ-ПЛР без ревертази; М –Gene Ruler SM1163 Fermentas

РОЗРОБЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН – ПРОДУЦЕНТІВ БАС

Генетична трансформація рослин ряски з використанням *A. rhizogenes*.

Lemna minor L. – водна рослина, яка швидко розмножується вегетативним шляхом та містить багато білка; використовується у народній медицині як спазмолітичний, жарознижувальний, сечогінний, антимікробний засіб завдяки наявності флавоноїдів, каротиноїдів, полісахаридів та інших сполук. З ряски виділено полісахарид лемнан, який має імуномодельюючі властивості (Хасина, 2003).

Культивовані *in vitro* рослини ряски трансформували за допомогою *A. rhizogenes* за описаною вище методикою. 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. 12а), що становило 2 % від загальної кількості експлантів. За використання дикого штаму агробактерій отримати рослини або корені не вдалося (рис. 12б). Після кокультивування листеців з агробактеріями, що несли вектор pCB124, відмічено появу листеців з частковим зеленим забарвленням (рис. 12в), однак при подальшій селекції спостерігали побіління рослин.

Аналіз ДНК рослин ряски показав наявність селективного і цільових генів. Відсутність коренів специфічного фенотипу можна пояснити тим, що не відбулося перенесення *rol* генів *A. rhizogenes* до рослинного геному, що і було підтверджено ПЛР-аналізом (відсутність фрагменту 780 п. н., рис. 12, трек 3).

Раніше (Yamamoto, 2001) було створено трансгенні рослини ряски з використанням *A. tumefaciens*. Нами уперше визначено можливість трансформування цих рослин за використання *A. rhizogenes* та отримано біотехнологічні рослини з генами антигенів ESAT6 та Ag85В мікобактерій, наявність та активність яких у підтверджено результатами ПЛР та ЗТ-ПЛР. Доведено, що трансгенні рослини ряски можна отримати за допомогою *A. rhizogenes* шляхом прямої регенерації без проміжної стадії калусоутворення. Створені 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.

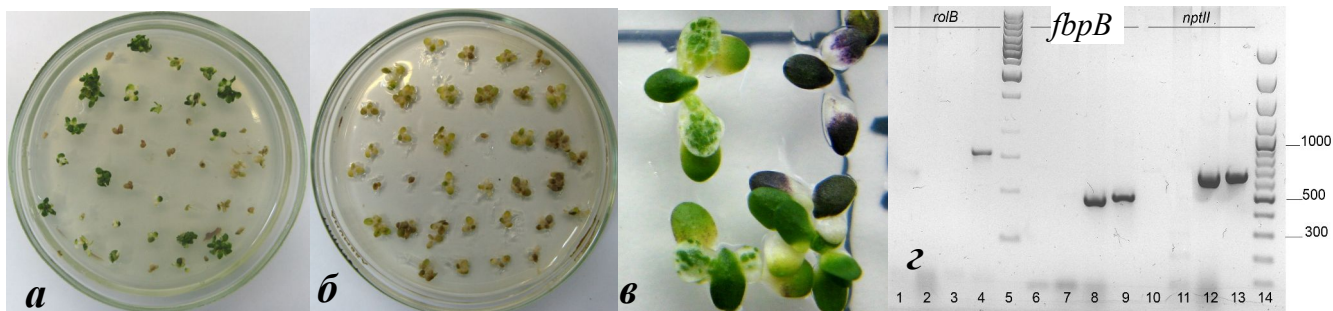


Рис. 12 – Ріст зелених рослин ряски після трансформування вектором pCB158 (а); відсутність стійких рослин (*A. rhizogenes* A4, б); часткове зелене забарвлення (pCB124, в); електрофореграма продуктів ПЛР сумарної ДНК рослин з праймерами до генів *rolB* (1-4), *fbpB*^{ATMD} (6-9) та *nptII* (10-13) (г): 1, 6, 10 – негативний контроль без ДНК; 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

Отримання культури трансгенних коренів лікарських рослин *T. porrifolius*, *A. officinalis*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *R. graveolens*. Усі досліджувані види рослин є лікарськими та синтезують БАС. Так, *T. porrifolius* накопичує сполуки з гепатопротекторними та антиоксидантними властивостями (Zidorn et al., 2005; Sareedenchai et al., 2009), *A. officinalis* відома як відхаркувальний, імуностимулюючий протизапальний засіб (Alihah et al., 2011), *R. graveolens* синтезує ефірні олії та сполуки з антимікробними властивостями (Harish Kumar et al., 2014). Рослини *A. tilesii* та *B. pilosa*, які не зустрічаються в Україні, мають антималярійну, протипухлинну і противірусну активність (Yang et al., 2006; Harish Kumar et al., 2014; Lee et al., 2013). Перенесення до геному цих рослин гена інтерферону людини дозволяє визначити принципову можливість їх трансформації; можливість накопичення біологічно активного інтерферону та одночасно природних БАС (зокрема, ПФ або артемізиніну).

Частота коренеутворення у козельців становила при *A. rhizogenes* A4-, pCB161- та pCB124-опосередкованій трансформації відповідно: $59,4 \pm 3,54\%$, $37,5 \pm 2,83\%$ та $38,3 \pm 3,51\%$; у алтеї (листові експланти) 100% незалежно від використаних бактерій; у причепи (стеблові експланти) – $84,4 \pm 5,8\%$, $70,0 \pm 8,0\%$ та $65,7 \pm 11,1\%$; полину (листові експланти) – 100%, 100% та $65 \pm 5,65\%$. Частота коренеутворення рути виявилася значно нижчою, ніж при трансформуванні рослин інших видів, лише $3 \pm 0,47\%$ після трансформації *A. rhizogenes* A4. Як з'ясували, це пов'язано з наявністю протимікробної активності у екстрактах, які пригнічували ріст агробактерій. Разом з тим, при збільшенні часу кокультивування до 7 діб вдалося отримати «бородаті» корені рути (рис.13).

При культивуванні «бородатих» коренів козельців та рути на середовищі 1/2МС було отримано регеновані пагони, які фенотипово не відрізнялися від контрольних рослин (рис.13). Регенерація пагонів у інших видів не відбувалася навіть при використанні живильних середовищ, що містили регулятори росту.

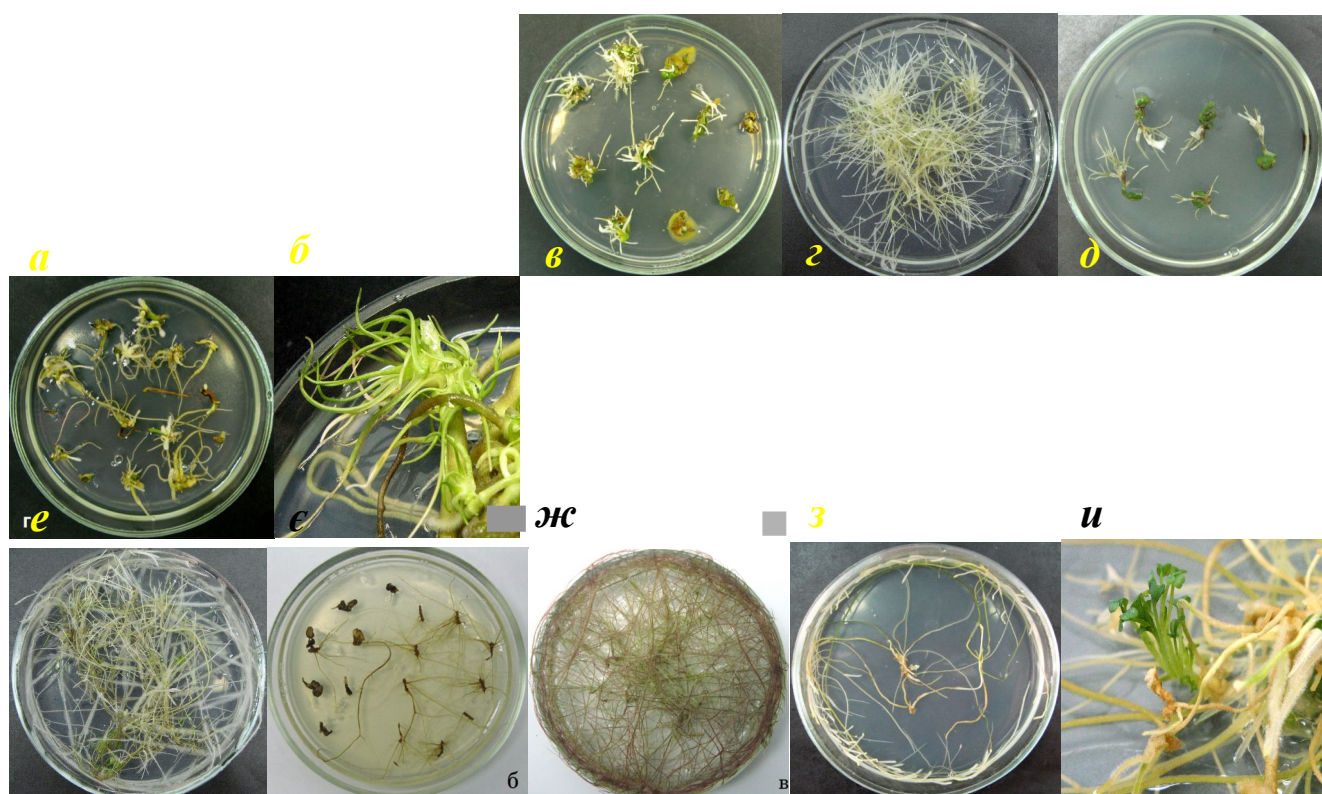
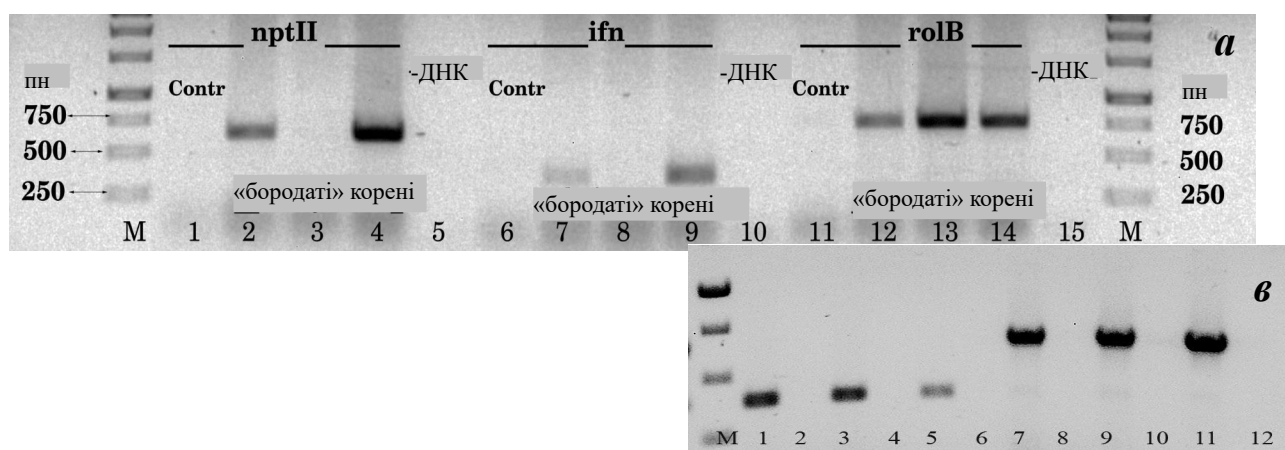


Рис.13 – «Бородаті» корені (а, в-з) та регенерація з них пагонів (б, и): *T. porrifolius* (а, б), *A. officinalis* (в, г), *A. tilesii* (д, е), *B. pilosa*(е, ж), *R.graveolens* (з, и)

Методом ПЛР (рис. 14) було підтверджено наявність фрагментів, відповідних генам *rolB* (780 п.н.), *ifn-α2b* (396 п.н.) та *nptII* (622 п.н.), причому ці гени мали також і регеновані рослини. ЗТ-ПЛР аналіз виявив, що ген інтерферону транскрибувався не у всіх досліджуваних лініях. У той же час ген *nptII* закономірно транскрибувався, оскільки селекцію проводили у присутності канаміцину. Транскрибування гена *ifn-α2b* відбувалося у 100% аналізованих ліній «бородатих» коренів *T. porrifolius*, 100% ліній *A. officinalis*, 55% *A. tilesii* та 50% ліній *B. pilosa*.

Раніше *A. rhizogenes* використовували для трансформації лише рослин алтеї (Drake et al., 2013, перенесення гена ціановірину) та рути (Sidwa-Goryuska et al., 2009, дикі штамми), причому у останній роботі використовували проростки, а не зрілі рослини. Будь-які дослідження стосовно трансформації причепи волосистої, козельців, алеутського полину досі відсутні. Отже, нами уперше розроблено систему трансформації рослин *T.porrifolius*, *A.tilesii* та *B. pilosa*, а також отримано «бородаті» корені полину, козельців, причепи, алтеї з геном інтерферону-α2b людини. Трансгенну природу цих коренів підтверджено методом ПЛР та визначено транскрибування цільового гена *ifn-α2b* у більшості аналізованих зразків.



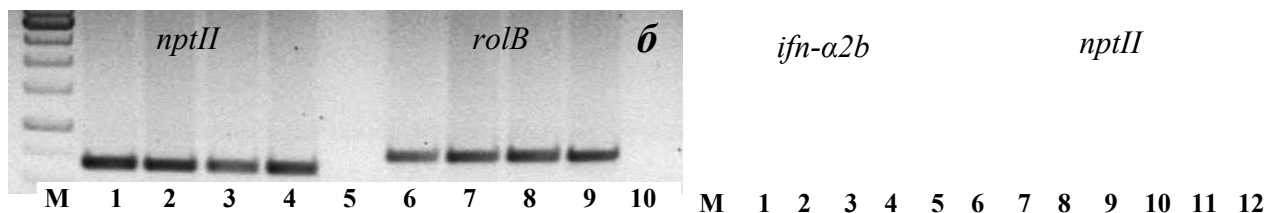
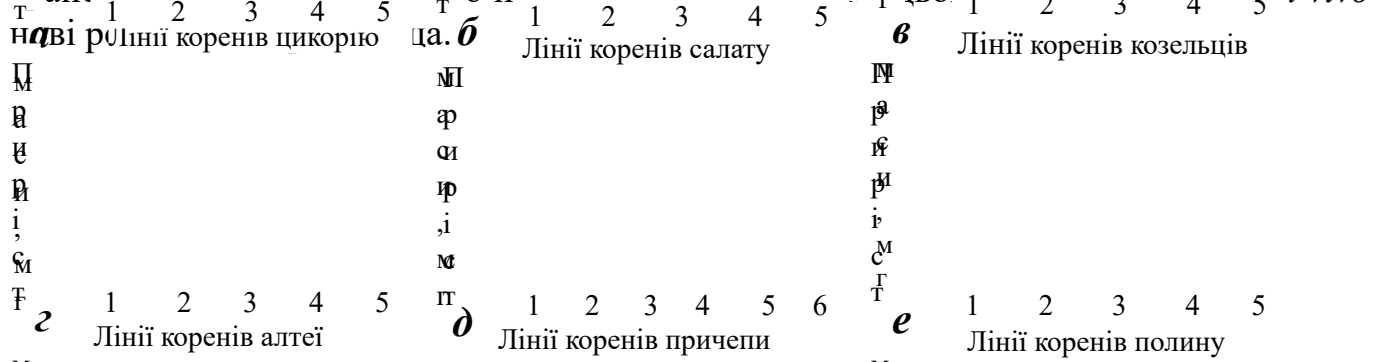


Рис. 14 – Електрофореграма продуктів ПЛР загальної ДНК «бородатих» коренів (**а**, *A. tilesii*; **б**, *A. officinalis*) та ЗТ-ПЛР (**в**, *A. officinalis*) з використанням праймерів, специфічних до генів *nptII*, *ifn-α2b* та *rolB*: **а** – ДНК контрольної рослини (1, 6, 11); клони, трансформовані *A. rhizogenes* A4 (3, 8, 13), *A. rhizogenes* pCB124 (2, 7, 12), *A. rhizogenes* pCB161 (4, 9, 14); -ДНК – без ДНК; *nptII*, *ifn* та *rolB* – використано праймери до *nptII* (622 пн), *ifn-α2b* (396 пн), *rolB* (780 пн); **б** – використано праймери до *nptII*(1-5) та *rolB* (6-10); **в** – непарні з ревертазою, парні без ревертази; М –маркер GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ НА МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ

Фенотипові відмінності ліній «бородатих» коренів. До ознак, які були притаманні усім культурам коренів, незалежно від виду трансформованих рослин, належать такі: значне галуження, негативний геотропізм, гормононезалежний ріст. Трансгенні корені різних ліній відрізнялися за швидкістю росту (рис. 15). Так, приріст маси коренів цикорію за 30 діб у перерахунку на одну точку росту коливався від $21,67 \pm 1,72$ до $221,67 \pm 25,52$ мг. Такі відмінності, можливо, пов'язані з ефектом положення генів, що може бути причиною особливості накопичення ендогенних фітогормонів і призводить до відмінностей у регенераційній здатності, а також швидкості росту коренів різних ліній, причому цей феномен не є видоспецифічним.

Для усіх досліджуваних видів рослин визначено відмінності між лініями, які виявлялися в різниці: швидкості росту (для усіх видів рослин); товщині коренів (особливо для козельців, алтеї); наявності значної опушеності (у полину); ступеню галуження (невисокий у козельців); наявності специфічного забарвлення коренів (причепа); позеленінні (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 (алтея, причепа, полин). Виявлені фенотипові та фізіологічні особливості не залежали від того, які гени додатково (крім власних пнів агробактерій) були перенесені при трансформції до рослин. Разом з тим, виявлено і видоспецифічні фенотипові особливості, що, вірогідно, пов'язано з характерними рисами рослин того чи іншого виду. Наприклад, значне потовщення 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.



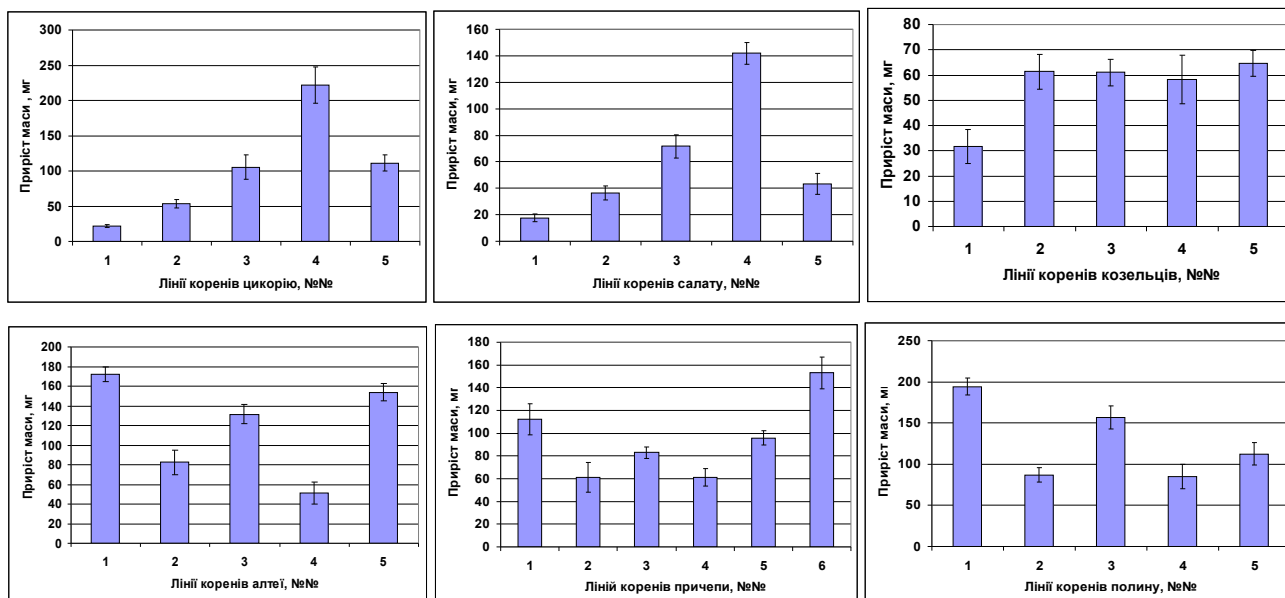


Рис. 15 – Приріст маси «бородатих коренів цикорію (а), салату (б), козельців (в), алтеї (г), причепи (д), полину (е) за 30 діб

Порівняння дії абіотичного стресу на трансгенні і контрольні рослини. У якості модельного об'єкту використовували культивовані *in vitro* трансгенні та контрольні рослини ряски. Тенденції росту трансгенних рослин при різних температурних умовах практично не відрізнялися від таких для контрольних. Так, культивування при температурі $+3^{\circ}\text{C}$ призводило до зменшення приросту маси як трансгенних, так і контрольних рослин. Збільшення терміну вирощування при зниженій температурі з двох до п'ятнадцяти діб однаково пригнічувало ріст контрольних та трансгенних рослин, що виявлялося у зменшенні приросту маси. Аналогічним чином впливало і короткострокове культивування при підвищеній температурі (рис. 16).

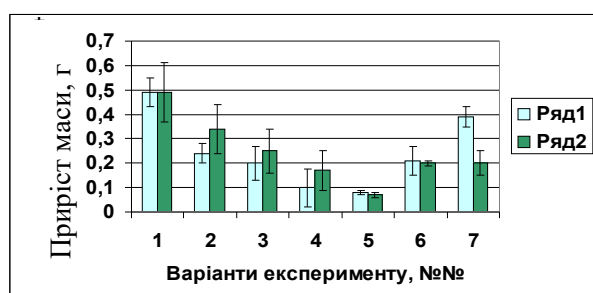


Рис. 16 – Залежність росту трансгенних (ряд 1) та контрольних (ряд 2) рослин ряски від температури: 1 – $+24^{\circ}\text{C}$; 2 – 2 доби $+3^{\circ}\text{C}$; 3 – 15 діб $+3^{\circ}\text{C}$; 4 – 20 діб $+3^{\circ}\text{C}$; 5 – 25 діб $+3^{\circ}\text{C}$; 6 – 2 доби $+36^{\circ}\text{C}$; 7 – 4 доби $+36^{\circ}\text{C}$

Порівняно також особливості впливу на трансгенні та контрольні рослини ряски абіотичного стресу, дію якого моделювали, додаючи до живильного середовища сполуку токсичного Cr(VI) у формі хромат-аніона CrO_4^{2-} . У дослідженнях використовували ряску, оскільки ці рослини вважають маркером забруднення води токсичними сполуками. Показано, що динаміка росту трансгенних і контрольних рослин була подібною, хоча трансформовані рослини були дещо більш чутливими до Cr(VI) (рис. 17 а-в). Для них Cr(VI) у високих концентраціях (4 та 8 мМ) був більш токсичним, загибель листеців становила 39,3% та 68,7%. Разом з тим, трансгенні рослини, так само як і нетрансформовані,

зменшували концентрацію Cr(VI) у живильному середовищі, відновлюючи Cr(VI) до нерозчинного Cr(III) у вигляді сіро-блакитного осаду $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, а також накопичували Cr(VI) у клітинах (рис. 17 з).

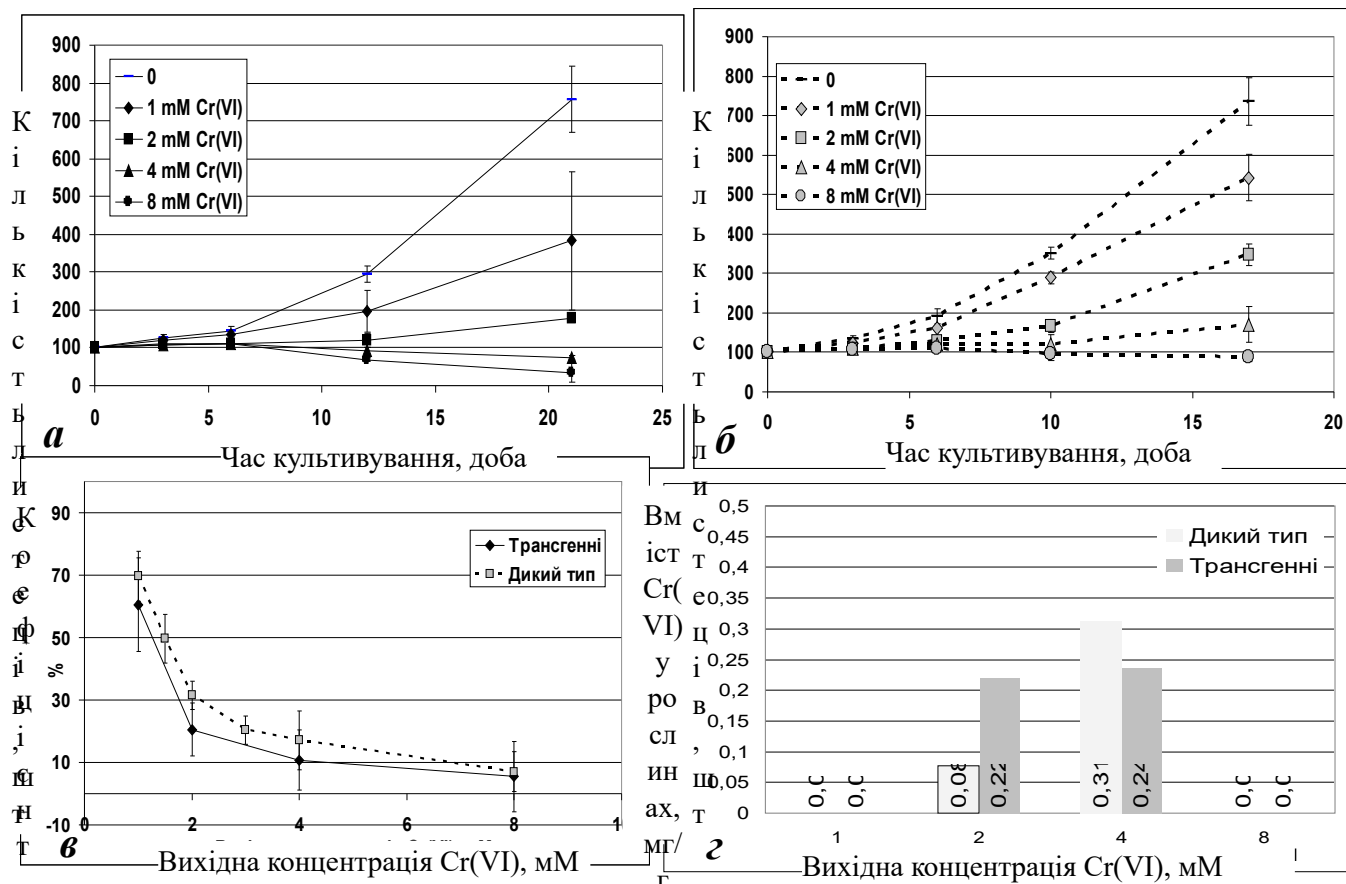


Рис. 17 – Порівняння впливу на ріст (а-в) і накопичення Cr(VI) (г) у трансгенних і контрольних рослинах ряски

Таким чином, генетична трансформація не призвела до змін адаптивних можливостей трансформованих рослин у порівнянні з контролем: не спостерігали суттєвих відмінностей у рості трансгенних і контрольних рослин за умов стресу, модельованого наявністю у середовищі K_2CrO_4 ; усі рослини були здатні до виживання при відносно невеликій концентрації Cr(VI) у середовищі (1 мМ) та відновлювали Cr(VI) до Cr(III).

СИНТЕЗ ПРИРОДНИХ ТА РЕКОМБІНАНТНИХ БАС У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ І «БОРОДАТИХ» КОРЕНЯХ

Накопичення рекомбінантних білків. Накопичення рекомбінантного злитого білка-аналога секреторних білків AG85B та ESAT6 *M. tuberculosis* у трансгенних рослинах ряски. Аналіз присутності білкових продуктів експресії гена, що кодує злитий білок-аналог секреторних антигенів ESAT6 та AG85B *M. tuberculosis*, проводили методом Western blotting. Визначено, що отримані трансгенні рослини ряски, які мали перенесені гени *esxA::fbpB* мікобактерій, дійсно накопичували рекомбінантний білок (рис. 18) у кількості до 0,4-0,5 мкг/г сирової маси

(0,036 мкг/мг ЗРБ). Зберігання ліофілізованих листеців протягом 1,5 років без охолодження чи заморожування не призводило до повної деградації досліджуваних білків, хоча їх вміст знижувався. Отже, 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).

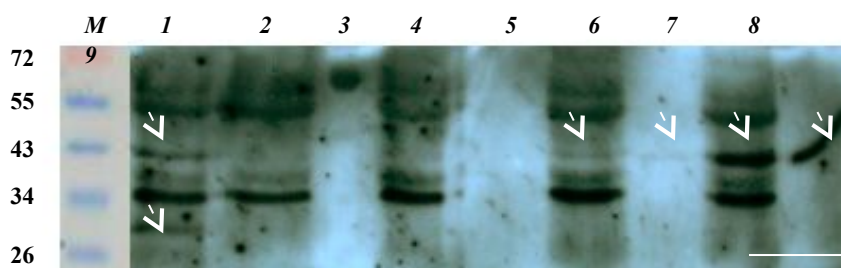


Рис. 18 –Western blotting аналіз наявності рекомбінантного білка у екстракті з трансгенних рослин *L. minor*: 1 – екстракт з біомаси трансформованих рослин; 2 – екстракт з біомаси рослин дикого типу; 3 – трек маркерів молекулярних мас (представлені у вигляді відбитків на мембрані, позначений "М"); 4 – 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, 200 пкг/трек; 8 – екстракт з біомаси рослин дикого типу із додаванням очищеного білка, 1 нг/трек; 9 – очищений білок, 1 нг/трек.

Накопичення інтерферону у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях.

Вміст інтерферону визначали у трансгенних рослинах та «бородатих» коренях, отриманих після агробактеріальної трансформації векторами з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини. Проведене дослідження виявило значні відмінності у рівні накопичення сполуки у біотехнологічних рослинах та коренях. Разом з тим, не спостерігали видоспецифічності рівня накопичення інтерферону у досліджуваних зразках при наявності варіабельності за цим параметром між лініями трансгенних зразків одного виду. Найбільший вміст інтерферону виявлено у трансгенних коренях *A.officinalis* – до 2766,66 пг/г маси, *S.intybus* – до 2654,89 пг/г маси. 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 вектором pCB161 (M11 промотор гена *ifn- $\alpha 2b$*), 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 pCB161.

Противірусна активність екстрактів з трансгенних коренів з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини. Нами було оптимізовано методику екстрагування, визначено наявність противірусної активності екстрактів цикорію, салату, причепи, полину, алтеї, порівняно рівень такої 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).

При оптимізації методики екстрагування виявлено токсичність Tris-екстрактів, що, вірогідно, і є причиною відсутності їх противірусної активності. Доекстрагування осаду, отриманого з фосфатним буфером pH7,4, з використанням того самого буферу з 1% ДСН та 1мМ PMSF дозволяє значно підвищити ступінь екстрагування білка та збільшити рівень противірусної активності екстрактів. За таких умов концентрація екстрагованого білка збільшувалася з 910,962 до 1542,723 мкг/г, а противірусна активність екстракту – з 5625 до 14062 МО/г маси.

Тестування противірусної активності екстрактів здійснювали за пригніченням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) у клітинних системах, специфічних до α -інтерферону людини. Рівень противірусної активності мав широку варіабельність, як міжвидову, так і між лініями одного виду. Так, екстракти з трансгенних коренів одного з досліджуваних видів їстівних рослин, цикорію, мали противірусну активність проти ВВС у межах до 270...2250 МО/г сирової маси рослин або 291...1203 МО/мг ЗРБ. Разом з тим, у рослин однієї лінії, незважаючи на наявність мРНК за даними ЗТ-ПЛР аналізу, активність проти ВВС була відсутня, що може бути результатом порушення процесу трансляції, посттрансляційних змін та ін. Висока противірусна активність виявлена у екстрактах з трансгенних коренів *L.sativa* (до 14062 МО/г маси або 11545 МО/мг ЗРБ), *B.pilosa* (до 19396 МО/г маси або 3821,60 МО/мг ЗРБ), *A.officinalis* (до 40760 МО/г маси або 12453,44 МО/мг ЗРБ). Високу противірусну активність виявлено і у трансгенних коренях полину – до 98437 МО/г маси або 28065,89 МО/мг ЗРБ, що свідчить про вірогідний великий біотехнологічний потенціал рослин цього виду.

Раніше у ряді робіт (Jarosinski et al., 2001; Ohya et al., 2005) було показано, що інтерферон- $\alpha 2b$ людини не тільки може синтезуватися в рослинних клітинах, але й має відповідну біологічну активність. Рівень противірусної активності екстрактів трансгенних рослин коливається у досить широких межах, що, можливо, пов'язано як з видоспецифічністю синтезу, так і з відмінностями у способах екстрагування та тестування на різних культурах клітин. Наприклад, в рослинах салату з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини активність проти ВВС становила 448 МО/г (Шелудько та ін., 2009), активність екстрактів з рослин картоплі – 560 МО/г (Ohya et al., 2001), 923-3029 МО/г (Sawahel et al., 2002), алое – 625 МО/г загального розчинного білка (Lowther et al., 2012), трансгенного рису – до 30000 – 45000 МО/г маси насіння (Masumura et al., 2006). Активність залежала від типу досліджуваного матеріалу – корені, листки, насіння (Masumura, 2006), віку матеріалу, наприклад, молоді або зрілі листки (Luchakivskaya et al., 2011). Високий рівень активності рослинних екстрактів виявлено у трансгенних рослинах жень-шеню – 60000 МО/мл (Qi et al., 2010). Проведене нами дослідження визначило, що 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. Результати експериментів показали, що використані нами рослини є ефективною біотехнологічною системою та можуть бути джерелом біологічно активного рекомбінантного інтерферону.

Було порівняно противірусну активність екстрактів з ряду ліній «бородатих» коренів рослин *A.tilesii*, *A.officinalis*, *L.sativa*, *B.pilosa* та *C.intybus* при використанні для тестування трьох ліній клітин – культури перещеплюваних субстратзалежних

клітин тестикул поросят ПТП, культури субстратзалежних клітин нирки бика (MDBK) та культури епітеліоподібних перещеплювальних субстратзалежних клітин кісткового мозку людини 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.

Слід зазначити, що досі не порівнювали особливості противірусної активності екстрактів з трансгенних рослин у системі різних клітинних ліній. Наприклад, Luchakivskaya et al. (2011) противірусну активність екстрактів з трансгенних рослин моркви тестували лише на клітинах ПТП, у роботах Qi et al. (2010) та Ohya et al. (2001) дослідження проводили тільки на амніотичних клітинах людини, Lowther et al. (2012) використовували лише альвеолярні базальні епітеліальні клітини карциноми A549. За нашими даними, 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, 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 BBC на клітинах MDBK, ПТП та L41 відповідно до 33112, 3548 та 1408 МО/г маси; *S.intybus* 124/11/5 – відповідно до 4320, 1884 та 942 МО/г маси. Екстракти з трансгенних коренів *A.tilesii* 124/23/5, *L.sativa* 161/6 були активними лише на клітинах MDBK та ПТП – відповідно до 98437 та 6285 МО/г маси для *A.tilesii*, до 14062 та 2287 МО/г маси для *L.sativa*. Екстракти з трансгенних коренів *B.pilosa* лінії 124/28/3 демонстрували активність на клітинах MDBK та L41 до 19396 та 5761МО/г маси.

Визначено, що екстракти з контрольних рослин цикорію, салату, полину та алтеї не містили сполук з противірусною активністю. 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 причеви при тестуванні на клітинах MDBK та L41 відповідно. Отже, нетрансформовані рослини причеви синтезували природні сполуки з противірусною активністю, що робить ці рослини, досі практично не використовувані у біотехнологічних дослідженнях, особливо перспективними як джерело природних та рекомбінантних БАС.

Накопичення природних БАС у трансгенних рослинах.

Ми використовували створені трансгенні рослини і корені як модель для дослідження впливу перенесених генів на синтез природно синтезованих у рослинах досліджуваних видів БАС – фруктозовмісних цукрів (поліфруктанів) та вторинних метаболітів (артемізиніну).

Накопичення поліфруктанів. Визначено умови для ефективної екстракції фруктанів з досліджуваних трансгенних коренів (рис.19). Оптимальним режимом є екстракція при температурі +90° С (T₂) протягом 30 хв.; час попереднього замочування (T₁= 0,5 – 24 год) не впливав на ефективність такої екстракції.

Виявлено значну варіабельність вмісту фруктанів у трансгенних коренях рослин різних видів. Як видно з наведених діаграм (рис.20), серед ліній коренів 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 причеви, у 4,2 рази у «бородатих» коренях козельців. 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, причеви, полину вміст ПФ становив відповідно $55,85 \pm 14,12$ – $144,11 \pm 14,12$; $32,29 \pm 5,34$ – $152,73 \pm 29,11$; $70,59 \pm 15,56$ – $136,99 \pm 28,12$ мг/г сухої маси.

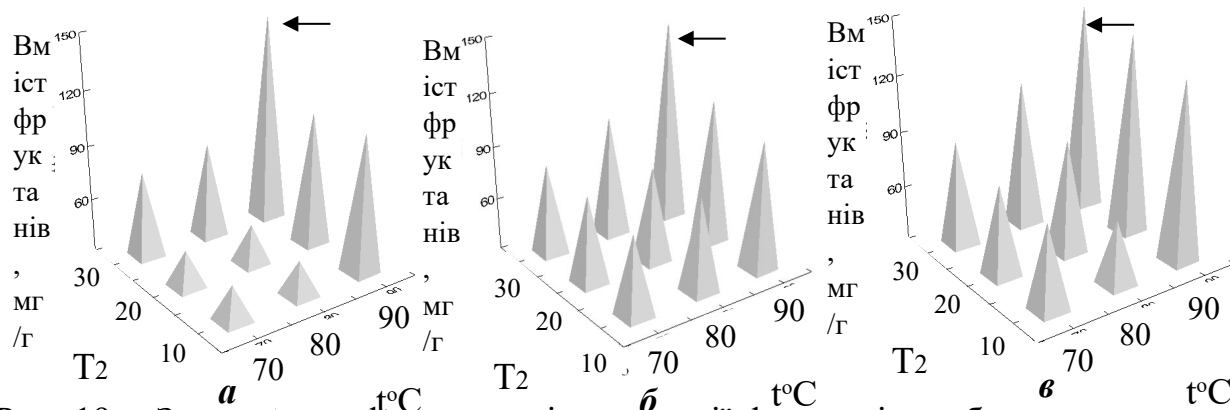


Рис. 19 – Залежність ефективності екстракції фруктанів з «бородатих» коренів цикорію від тривалості (T_2) та температури (t°) екстрагування; тривалість попередньої екстракції (T_1) при $+22^\circ\text{C}$: *а* – 0,5 год; *б* – 1 год; *в* – 24 год (достовірна імовірність $P_{0,95}$). Стрілкою вказано оптимальний варіант екстрагування.

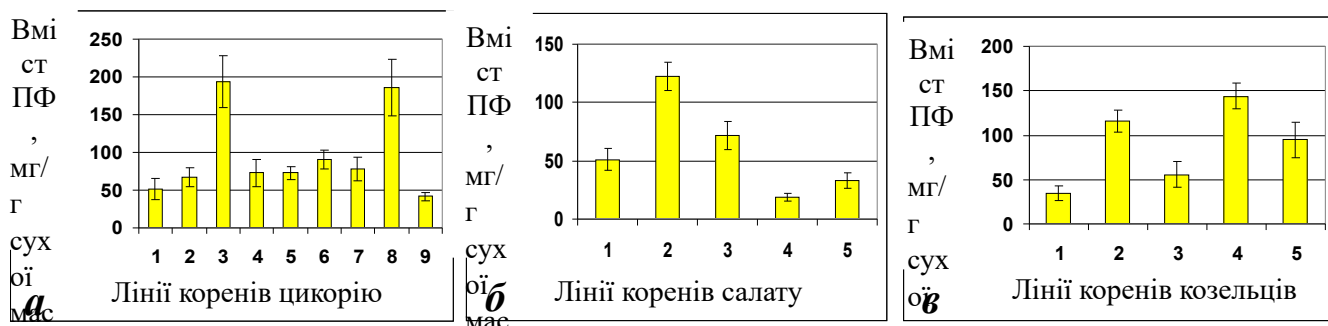


Рис. 20 – Відмінності у вмісті фруктанів у культурах «бородатих» коренів рослин *C. intybus* (*а*), *L. sativa* (*б*), *T. porrifolius* (*в*): 1 – контроль, далі – трансгенні корені.

Високий вміст фруктанів виявлено у одній з ліній «бородатих» коренів цикорію, $193,31 \pm 34,47$ мг/г сухої маси, що є очікуваним, оскільки рослини цього виду відомі як такі, що синтезують ці сполуки у значній кількості. Досить високий вміст сполук був і у одній з ліній трансгенних коренів причеви волосистої – $152,73 \pm 29,11$ мг/г. 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. Зміни рівня 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 змінювати природну експресію тих чи інших генів, впливаючи таким чином на клітинний метаболізм. Такий феномен дії трансформації може бути використаний для підвищення вмісту цінних біологічно активних сполук у трансгенних коренях, зокрема, для збільшення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів.

Підвищення рівня накопичення ПФ у «бородатих» коренях за використання регуляторів росту. Виявлено можливість прискорення росту «бородатих» коренів та підвищення вмісту ПФ за використання хімічних – НОК та ІМК, а також природних регуляторів росту (Біолан та Чаркор, розробка МНТЦ «Агробіотех»). Додавання цих сполук призводило до пришвидшення росту «бородатих» коренів, збільшення їх маси за контрольований період часу (рис. 21). 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. 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. Виявлений ефект стимулювання росту та підвищення рівня накопичення фруктанів може бути використано при біотехнологічному отриманні сполуки з «бородатих» коренів.

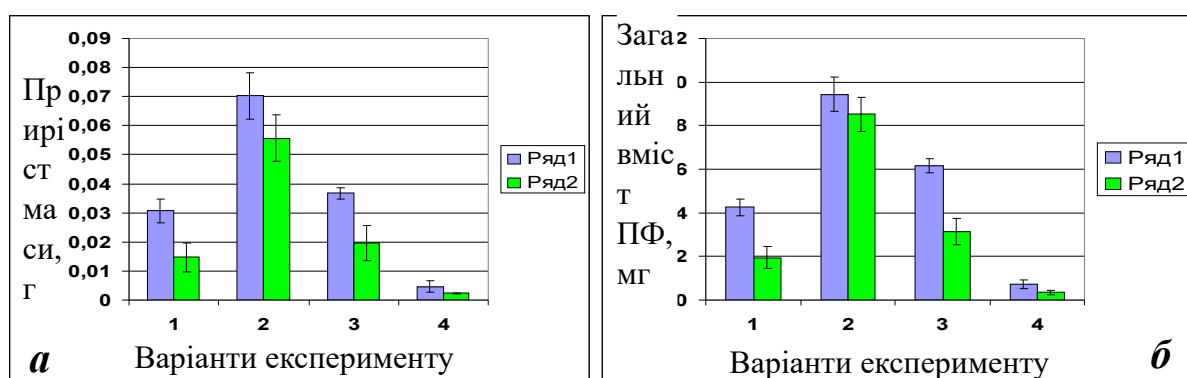


Рис. 21 – Вплив синтетичних регуляторів (1, 2) та регулятора росту Чаркор (3) на приріст маси (а) та загальний вміст ПФ (б) у «бородатих» коренях цикорію (30 діб культивування): 1 – 0,5 мг/л НОК; 2 – 0,5 мг/л ІМК; 3 – 5 мкл/л Чаркору; 4 – контроль; ряди 1 та 2 – лінії «бородатих» коренів

Вміст артемізиніну. Відомо, що рослини роду *Artemisia* синтезують сполуку з протималарійними властивостями. Підвищений інтерес до артемізиніну пов'язаний з його високою ефективністю при лікуванні малярії (Weathers et al., 2011). Нами було досліджено можливість накопичення артемізиніну у отриманих трансгенних коренях практично невивченого виду полину *A. tilesii*. Трансгенні корені дійсно містили вторинний метаболіт у кількості 0,016-0,03% сухої маси (рис. 22). У коренях контрольних рослин вміст артемізиніну становив 0,039 % сухої маси, у листках – 0,03% сухої маси.

Раніше *A. rhizogenes*-опосередковану трансформацію рослин *A. dubia*, *A. indica*, *A. vulgaris*, *A. absinthium*, *A. annua* (Mannan et al., 2010; Patra et al., 2014; Ali et al., 2012) використовували з метою можливого отримання ліній полину з підвищеним вмістом артемізиніну. За літературними даними вміст сполуки у

коренях *in vivo* культивованих рослин полину різних видів становив: у *A. annua* – близько 0,025, *A. vulgaris* – 0,015, *A. indica*, *A. dracunculus* та *A. dubia* – 0,01% сухої маси (Mannan et al., 2010). Вміст артемізиніну у *A. tilesii* досі не визначали. Отримані нами дані свідчать про те, що у рослинах цього виду також синтезується досліджувана сполука, причому у досить великій кількості, до 0,03% сухої маси, а «бородаті» корені зберігають здатність до синтезу цієї сполуки.

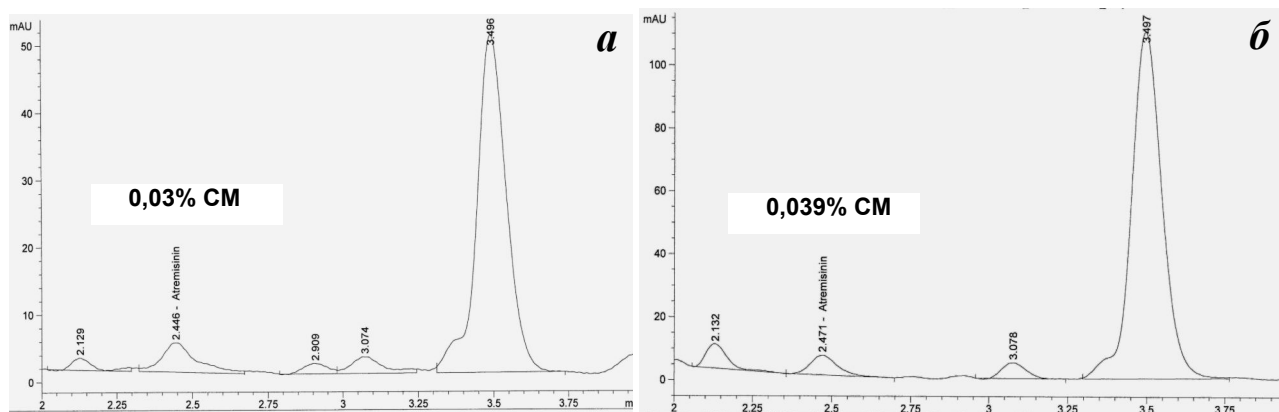


Рис. 22 – Хроматографічне визначення вмісту артемізиніну у трансгенних коренях (а) та коренях культивованих *in vitro* контрольних рослин *A. tilesii* (б)

Біологічна активність екстрактів з трансгенних коренів.

Протимікробна активність. Порівнювали протимікробну активність етанольних та ДМСО екстрактів з трансгенних коренів та контрольних рослин рути (0,4 г/1,5 мл). Тестування проводили диск-дифузним методом. У якості тестових використовували бактерії, ізольовані з різних природних ґрунтових та водних біотопів – помірної зони (Крим, Україна; оз. Байкал, Росія), екстремальних (Антарктика; пустеля Негев та Мертве море, Ізраїль. Використовували також бактерії *Escherichia coli* B906 та *Staphylococcus aureus* B918.

Отримані дані свідчать про те, що генетична трансформація не призвела до зникнення протимікробної активності. Екстракти з трансгенних коренів пригнічували ріст Грам-позитивних та були неактивними проти Грам-негативних бактерій так само, як і екстракти з контрольних рослин рути, культивованих *in vitro* (рис. 23).

Культури *E. coli*, *C. shigense*, *C. freundii*, *M. trichothecenyolyticum* були нечутливими до усіх досліджуваних екстрактів. Екстракти з асептично вирощуваних рослин та з трансгенних коренів виявили активність проти *S. aureus*, *M. luteus*, *S. aquimarina*, *B. simplex*, *K. carniphila*, *B. 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 *M. luteus* Н8 (Негев) при використанні екстрактів з трансгенних коренів склав до 37 і 45 мм, а при використанні екстрактів з контрольних рослин – до 26 і 35 мм (відповідно етанольний і ДМСО екстракти). Дуже чутливими до екстрактів були також бактерії *A. oryzae*, діаметр зони відсутності росту становив до 37-39 мм та 35 мм відповідно при тестуванні екстрактів з трансгенних коренів та контрольних рослин. Для *B. simplex* ці показники склали відповідно 19 і 23 мм (екстракти з коренів), 13 і 13 мм

(екстракти з рослин). Оскільки екстракти з отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації коренів рути духмяної проявили протимікробну активність, «бородаті» корені *R. graveolens* можуть бути джерелом антимікробних сполук.

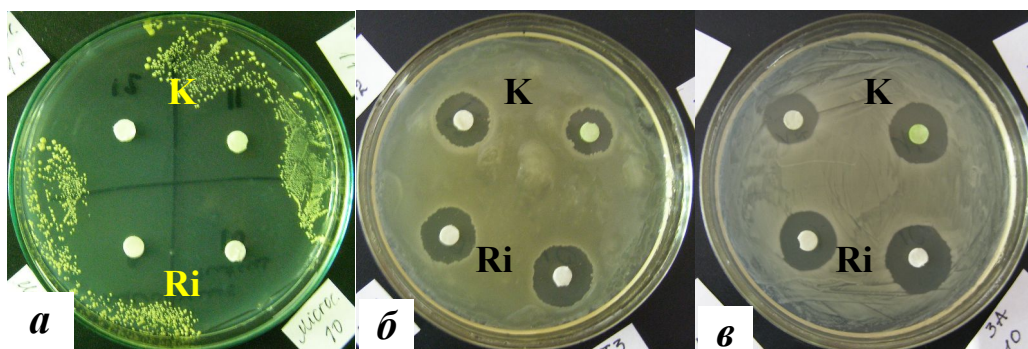


Рис. 23 – Протимікробна активність екстрактів з рослин та «бородатих» коренів рути духмяної: **а** – *Micrococcus luteus*, **б** – *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*, **в**– *Kocuria* sp.; Ri та K – екстракти з трансгенних коренів та контрольних рослин

Антиоксидантна активність. Екстракти, отримані з трансгенних коренів різної видової приналежності, відрізнялися за здатністю відновлювати DPPH радикал. Рівень активності екстрактів з ліній трансгенних коренів одного виду також значно варіював (рис. 24).

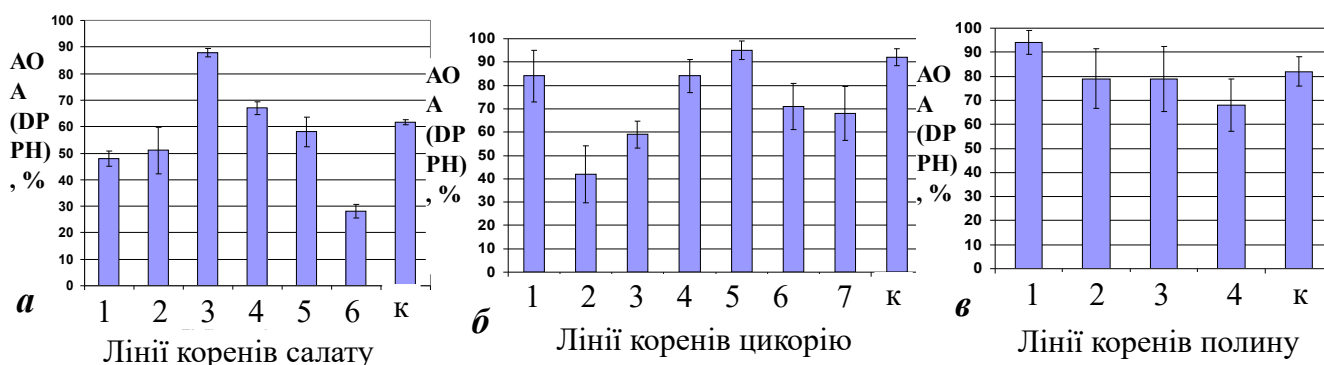


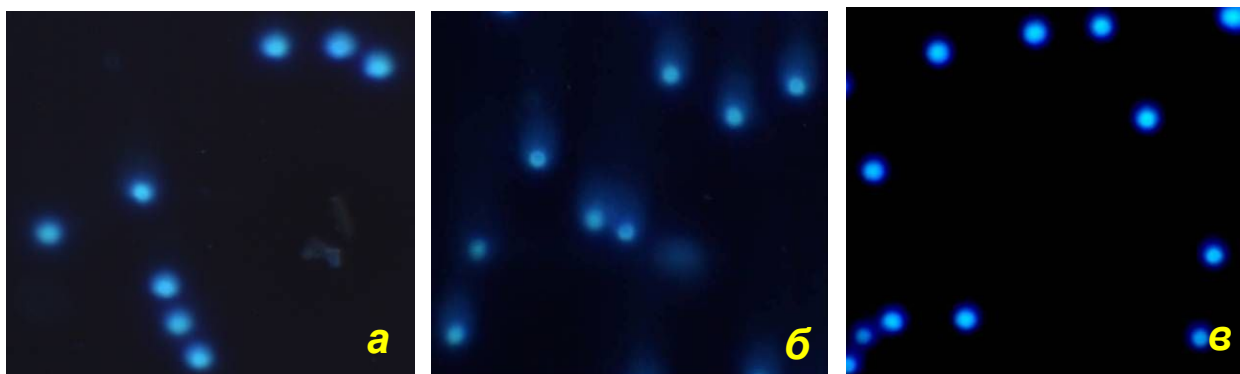
Рис. 24 – Антиоксидантна активність екстрактів з трансгенних коренів салату (**а**), цикорію (**б**), полину (**в**); К – АОА екстрактів з коренів контрольних рослин

DPPH активність екстрактів з трансгенних коренів лікарських рослин у більшості випадків не перевищувала таку активність екстрактів у контролі, хоча у однієї лінії коренів салату була вище за контроль. DPPH активність екстрактів з «бородатих» коренів козельців не відрізнялася від активності екстрактів з коренів контрольних рослин або була меншою за АОА у контролі та становила $37 \pm 5,34\%$ – $82 \pm 12,09\%$. У екстрактах з трансгенних коренів полину та причепи рівень антиоксидантної активності достовірно не відрізнявся від активності екстрактів з контрольних коренів та становив відповідно $68 \pm 10,96\%$ – $94 \pm 6,96\%$ і $49 \pm 16,00\%$ – $72 \pm 10,40\%$. Екстракти з трансгенних коренів алтеї проявляли DPPH активність у границях $28 \pm 4,2\%$ – $81 \pm 13,8\%$, салату – $28 \pm 2,56\%$ – $88 \pm 1,60\%$. Активність екстрактів з «бородатих» коренів цикорію становила $42 \pm 12,16\%$ – $95 \pm 3,94\%$ у залежності від лінії коренів.

Отже, генетична трансформація у ряді випадків призвела до зміни (підвищення або зниження) рівня антиоксидантної активності. Слід відзначити, що такі зміни не є детерміновані перенесеними генами, оскільки не виявлено залежності від того, які агробактерії (дикого типу або такі, що несли вектор з геном *ifn-α2b*) було використано, а також від застосованого для трансформації вектора (відрізнялися, зокрема, промоторами гена *ifn-α2b*). Отже, отримані дані щодо відмінностей у рівні АОА є результатом саме процесу трансформації, а відмінності у рівні АОА екстрактів з різних ліній коренів, очевидно, є наслідком неконтрольованості місця вбудовування трансгенів. Отримання ліній «бородатих» коренів з високим рівнем АОА свідчить про можливість підвищення природної активності після генетичної трансформації; такі рослини/корені є джерелом природних антиоксидантів рослинного походження.

УФ-протекторна активність. Метою досліджень було визначення наявності УФ-протекторної активності у екстрактів з рослин цикорію та порівняння з відповідною активністю екстрактів з трансгенних рослин та «бородатих» коренів. Вивчаючи УФ-протекторну активність екстрактів з трансгенних рослин та коренів цикорію, мотивувалися даними щодо такої активності екстрактів з рослин близького виду, *C. endivia* (Enk, 2004). Тестування на ізольованих лімфоцитах людини проводили методом кометного електрофорезу, який дозволяє аналізувати пошкодження молекул ДНК на рівні окремих клітин (Afanasieva, 2010) (рис.25).

У позитивному контролі (без опромінення, без обробки екстрактом) відсоток ДНК у хвості комети становив 6,0-9,8%. У негативному контролі без екстрактів та з УФ-опроміненням становив 13,7 – 16%, що свідчить про наявність індукції розривів, тобто про ефективний вплив УФ-опромінення. У оброблених екстрактом і опроміненіх клітинах відсоток ДНК у хвості комети становив 3,4-4,0%. Отже, отримані результати вказують на те, що використані екстракти виявляли захисні властивості, знижуючи ступінь пошкодження ДНК у опроміненіх ультрафіолетом клітинах у 3,6-4,0 рази. Не було достовірних відмінностей при використанні екстрактів з трансгенних та контрольних коренів. Попереднє інкубування екстрактів при температурі +60°C не призводило до достовірних відмінностей відсотку ДНК у хвості комет. Можливо, виявлений ефект обробки пов'язаний з відомими антиоксидантними властивостями фруктозовмісних цукрів (Pasqualetti et al., 2014), а також з участю фруктанів у регуляції генів, що активуються у відповідь на оксидативний стрес (El-Sayed et al., 2015). Очевидно, що у даному випадку у захисті клітин від пошкоджуючої дії УФ-опромінення, вірогідно, брали участь сполуки небілкової природи, причому їх синтез відбувався не тільки у контрольних рослинах, але й у трансгенних коренях.



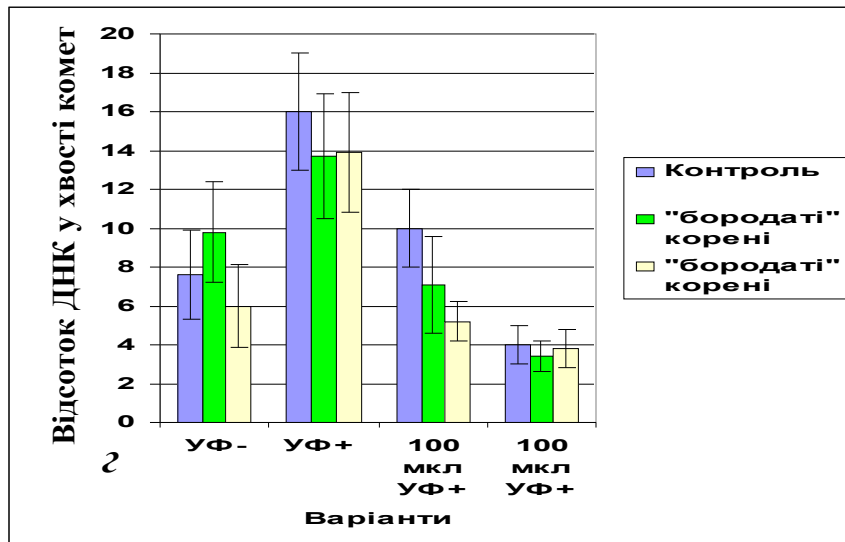


Рис. 25 – Результати кометного електрофорезу: *а* – контроль без УФ-опромінення; *б* – УФ-опромінення, без обробки екстрактом; *в* – УФ-опромінення, обробка екстрактом; *г* – відсоток ДНК у хвості комет

Створення колекції трансгенних рослин та «бородатих» коренів – продуцентів БАС. За результатами проведених експериментів створено колекцію трансгенних рослин і «бородатих» коренів. Вона включає трансгенні рослини п'яти видів (*C. intybus*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *L. minor*, *R. graveolens*), а також також «бородаті корені рослин семи видів – *C. intybus*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *A. tilesii*, *B. pilosa*, *A. officinalis*, *R. graveolens*. Колекція нараховує 96 зразків, у тому числі 27 ліній трансгенних рослин та 69 ліній «бородатих» коренів.

Отже, у результаті досліджень доведено можливість використання бактерій роду *Agrobacterium* для трансформування їстівних та лікарських рослин видів *C.intybus*, *L. sativa*, *A. officinalis*, *T. porrifolius*, *L. minor*, *A. tilesi*, *B. pilosa*, *R.graveolens* векторами з генами, що кодують синтез білків медичного призначення. Визначено оптимальні умови, які дозволили отримати трансгенні рослини або «бородаті» корені з частотою до 100% (за виключенням трансформування рослин рути та ряски). Низька частота генетичної трансформації останніх пов'язана з їх фізіологічними особливостями.

Визначено особливості впливу 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, ступінь галуження), появі неспецифічного забарвлення, індукованій або спонтанній регенерації пагонів.

Доведено, що у отриманих трансгенних лініях синтезуються рекомбінантні білки (інтерферон та антигени мікобактерій). Трансгенні рослини та «бородаті» корені були здатні також синтезувати притаманні їм природні сполуки (фруктани, артемізинін), а екстракти з біотехнологічних ліній виявляли антиоксидантну, УФ-протекторну, антимікробну активності, причому у ряді випадків навіть більшу за таку активність контрольних рослин. Таким чином, оптимізована методика

генетичної трансформації може бути застосована для ефективного отримання біотехнологічних їстівних та лікарських рослин, а створені трансгенні лінії є джерелом рекомбінантних та природних біологічно активних сполук.

Практичні рекомендації. Оптимізована методика трансформації може бути застосована для отримання трансгенних рослин і коренів різних видів. У результаті досліджень було створено колекцію біотехнологічних рослин, яка налічує 96 зразків восьми видів рослин. Екстракти з колекційних зразків виявляють пребіотичну (*C. intybus*), УФ-протекторну (*C. intybus*), антимікробну (*R. graveolens*), противірусну (*C. intybus*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *L. sativa*, *A. tilesii*) активність. Наявність такої активності дає підстави вважати отримані зразки потенційним джерелом біологічно активних сполук з антимікробними, противірусними, антиоксидантними та іншими лікувальними властивостями.

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 синтезували 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-α2b*, здатні накопичувати інтерферон-α2b 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-α2b* людини виявляють противірусну активність. Рівень такої активності є видо-, тканино- та лінійспецифічним 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 лінійспецифічні 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 фруктанів 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* 1t3, *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).

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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**, O.M. Kishchenko, A.O. Potrochov, A.M. Shakhovsky, M.V. 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**, M.Y. Vasylenko, A.M. Shahovsky, M.O. Bannykova, O.Y. 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 висновки 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 методику 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. – Р. 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. Матвієєва**, 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. **Матвієєва Н.А.** Накопичення фруктозовмісних вуглеводів в культурі трансгенних коренів лікарських рослин / **Н.А. Матвієєва**, 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. **Матвієєва Н.А.** Отримання та культивування «бородатих» коренів рослин *Bidens pilosa* L. / **Н.А. Матвієєва**, 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. **Матвієєва Н.А.** Вплив трансформації на накопичення біологічно активних сполук у «бородатих» коренях *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* // **Н.А. Матвієєва**, 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. Антимікробная активность экстрактов из трансгенных корней *Ruta graveolens* L./ **Н. Матвеева**, Г. Гладка, В. Говоруха, Е. Прекрасная, О. Суслова, 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**, O. Kvasko, A. Shakhovsky, K. Afanasieva, M. 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 корней цикория с геном интерферона 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 цикория *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**, О.Кvasko, А.Shachovsky, N.Kuchuk // Abstr. of International conference «Biotechnology and plant breeding. Perspectives towards food security ans 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. **Матвєєва Н.А.** Растения экваториального высокогорья: перспективы использования в биотехнологических исследованиях/ **Н.А.Матвєєва**, 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. **Матвєєва Н.А.** Растения Эквадора как новые объекты биотехнологии и для получения биологически активных соединений/ **Н.А.Матвєєва**, 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. **Матвєєва Н.А.** Определение антиоксидантной активности экстрактов из трансгенных корней *Althaea officinalis* L. / **Н.А.Матвєєва**, 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-2b* людини / Дробот К.О., **Матвєєва Н.А.**, Шаховський А.М. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – Київ, 2014. – С. 59-63.

АНОТАЦІЯ

Матвєєва Н.А. Створення рослин - продуцентів біологічно активних сполук шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2016.

У дисертації визначено умови для ефективної генетичної трансформації *Cichorium intybus* L., *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Lemna minor* L., *Artemisia tilesii* Ledeb, *Bidens pilosa* L. та *Ruta graveolens* L. з генами, що кодують синтез інтерферону- $\alpha 2b$ людини або антигенів ESAT6-Ag85B мікобактерій за використання *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*. У отриманих рослин та «бородатих» коренів синтезувалися як природні біологічно активні сполуки (фруктани, артемізинін), так і рекомбінантні білки. Екстракти з біотехнологічних зразків мали УФ-протекторну, протимікробну, антиоксидантну та противірусну активність.

Ключові слова: *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, артемізинін, фруктани, інтерферон- $\alpha 2b$ людини, антигени ESAT6-Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*

АННОТАЦІЯ

Матвеева Н.А. Создание растений - продуцентов биологически активных соединений путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2016.

В диссертации определены условия для эффективной генетической трансформации растений *Cichorium intybus* L., *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Lemna minor* L., *Artemisia tilesii* Ledeb, *Bidens pilosa* L. и *Ruta graveolens* L. Оптимизированный метод *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации позволяет получить «бородатые» корни или трансгенные растения с частотой трансформации до 100%. Наиболее важными факторами, которые влияют на частоту трансформации, являются время культивирования на среде без цефотаксима, продолжительность роста без селективного давления и наличие противомикробной активности у растений.

Доказано, что биотехнологические подходы могут быть применены для получения «бородатых» корней или биотехнологических растений класса двудольных *C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius* и однодольных *L. minor* с генами, кодирующими синтез интерферона- $\alpha 2b$ человека или антигенов ESAT6-Ag85B микобактерий. Определено, что для получения трансгенных растений *L. minor* можно использовать бактерии *A. rhizogenes*, причем таким путем можно создать растения, которые несут целевые гены, напрямую, без получения культуры «бородатых» корней. Экспериментально подтверждена возможность накопления рекомбинантного интерферона и антигенов микобактерий в трансгенных растениях и «бородатых» корнях *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, *L. minor*. В частности, «бородатые» корни растений *C. intybus*, *L. sativa*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*, в

которые был перенесен ген *ifn-α2b*, накапливали интерферон-α2b человека в количестве до 2766, 66 пг/г массы; трансгенные растения ряски с геном *esxA::fbpB* синтезировали соответствующий рекомбинантный белок в количестве 0,5 мкг/г сырой массы. Экстракты трансгенных растений и корней с геном *ifn-α2b* обладали противовирусной активностью. Уровень такой активности был видо-, ткане- и линиеспецифичным и составлял, в частности, у *A.tilesii* до 98437 МЕ/г массы, *A.officinalis* – до 40760 МЕ/г массы, *L.sativa* – до 14062 МЕ/г массы, *C.intybus* – до 2250 МЕ/г массы.

Показано, что трансгенные растения и «бородатые» корни синтезируют не только рекомбинантные белки, но и одновременно соединения, которые накапливаются в этих растениях в природных условиях, в частности, запасные фруктозосодержащие сахара до 190 мг/г массы (в трансгенных корнях *T. porrifolius*) и вторичный метаболит артемизинин до 0,03% сухой массы в «бородатых» корнях *A.tilesii*. Определено, что существуют видовые и линиеспецифичные различия в накоплении фруктанов в «бородатых» корнях растений *C. intybus*, *A. officinalis*, *L. sativa*, *T. porrifolius*, *B. pilosa*. Трансгенные корни растений всех исследуемых видов, полученные с использованием как дикого штамма *A. rhizogenes* A4, так и *A. rhizogenes*, которые несли векторы с целевыми генами, в 33% случаев накапливали в 2.8-4.2 раза (в зависимости от линии) больше фруктанов по сравнению с контролем.

Экспериментально подтверждено, что экстракты из трансгенных растений или культуры «бородатых» корней обладают УФ-протекторной (*C.intybus*), противомикробной (*R. graveolens*), пребиотической (*C. intybus*) и антиоксидантной (*C. intybus*, *L. sativa*, *R. graveolens*, *A. tilesii*, *A. officinalis*, *B. pilosa*, *T. porrifolius*) активностью, причем в некоторых линиях уровень такой активности был выше, чем в контроле. Определено, что линии трансгенных корней всех исследуемых видов растений отличаются по физиологическим параметрам, в частности по скорости роста, наличием специфической окраски, степенью ветвления, что позволяет использовать эту особенность для отбора наиболее ценных образцов.

При использовании разработанных подходов для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации создана коллекция биотехнологических растений и «бородатых» корней – продуцентов спектра природных и рекомбинантных биологически активных соединений. Эта коллекция включает 96 коллекционных образцов восьми видов растений, 27 линий трансгенных растений и 69 линий «бородатых» корней. Экстракты из этих растений являются биологически активными, что может быть использовано в косметологии (как УФ-протекторы, антиоксиданты), медицине, ветеринарии (экстракты с антимикробными и противовирусными свойствами).

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, артемизинин, фруктаны, интерферон-α2b человека, антигены ESAT6-Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*

SUMMARY

Matvieieva N.A. Construction of plants - producers of biologically active compounds by *Agrobacterium*-mediated transformation. – Manuscript.

Thesis for a Doctor of Science degree in Biology on the speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the development of efficient method of transformation of *Cichorium intybus* L., *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Lemna minor* L., *Artemisia tilesii* Ledeb, *Bidens pilosa* L. and *Ruta graveolens* L. plants with human *ifn- α 2b* or *Mycobacterium tuberculosis* *esxA-fbpB* genes using *Agrobacterium tumefaciens* or *A. rhizogenes*. An ability to synthesize natural biologically active compounds (artemisinin, fructans) and recombinant proteins (human interferon- α 2b and *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6-Ag85B antigens) has been demonstrated in biotechnology plants and "hairy" roots. Extracts of transgenic lines demonstrated UV-protective, antimicrobial, antioxidant, antiviral activities.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, medicinal plants, artemisinin, fructans, human interferon- α 2b, *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6-Ag85B antigens