

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

ДРОБОТ КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 575.222.7:581.1

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

03.00.20 – біотехнологія (091 – Біологія)

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ К.О. Дробот

Науковий керівник: Матвеева Надія Анатоліївна, доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Дробот К.О.* Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (091 – Біологія). Роботу виконано в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Захист відбудеться на засіданні вченої ради К 26.202.01 в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Київ, 2018.

### *Зміст анотації*

У роботі наведено результати досліджень з впливу *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації на накопичення біологічно активних сполук (БАС) у коренях рослин роду *Artemisia* (*A. vulgaris* L., *A. annua* L., *A. dracuncululus* L.), та розглянуто перспективу використання культури «бородатих» коренів цих рослин у якості джерела БАС. Оптимізовано методіку генетичної трансформації досліджуваних видів, визначено вміст БАС (флавоноїдів, фруктанів, цукрів та артемізиніну) та біологічну активність екстрактів «бородатих» коренів.

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

Рослини *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracuncululus* було введено в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння. Показано, що методика стерилізації за використання водного розчину хлорвмісного препарату «Білизна» була ефективною та дозволяла отримати проростки з 100% насіння. Було оптимізовано умови мікроклонального розмноження проростків та показано, що додавання регуляторів росту бензиламінопурина (БАП) та  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентрації 0,5 та 0,05 мг/л відповідно приводило до прискорення формування нових пагонів у рослинах всіх досліджуваних видів.

Було проведено генетичну трансформацію *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracuncululus* за допомогою *A. rhizogenes* (штам А4) дикого типу, а також таких, які містили вектори рСВ 161 або рСВ 124 з геном інтерферону *ifn- $\alpha$ 2b* людини, та отримано культуру «бородатих» коренів для рослин всіх трьох видів. Наявність перенесених генів було підтверджено методом ПЛР. Показано, що за описаних умов трансформації та використання оптимального типу експланту (листки) можна отримати «бородаті» корені полину з частотою до 100%. Здобувачем уперше було показано можливість отримання «бородатих» коренів полину, які містять ген синтезу інтерферону людини *ifn- $\alpha$ 2b* — гена, що кодує сполуку з лікувальними властивостями.

Було досліджено морфо-фізіологічні особливості культур «бородатих» коренів, зокрема, визначено швидкість росту коренів різних видів. Найбільш високими темпами росту відрізнялись трансгенні корені *A. vulgaris* та *A. annua*, у той час як для *A. dracuncululus* був притаманний повільний ріст. Внутрішньовидова варіабельність цього параметру була значною та не залежала від використаного вектора.

Визначено вплив регуляторів росту на ріст коренів. Виявилось, що для усіх досліджуваних «бородатих» коренів, застосування індолілоцтової (ІОК) або індоділмасляної кислот (ІМК) у концентрації 0,5 мг/л пришвидшувало ріст «бородатих» коренів та збільшувало приріст маси.

У «бородатих» коренях *A. annua* та *A. dracuncululus* було зафіксовано збільшення накопичення фруктанів у порівнянні з таким у контролі. Однак вміст

цих сполук у «бородатих» коренях *A. vulgaris* був нижчим, ніж у коренях нетрансформованих рослин. Відповідно, найвищий вміст флавоноїдів —  $183,1 \pm 1,05$  та  $160,8 \pm 2,81$  мг/г сухої речовини — було виявлено у трансгенних лініях *A. dracuncululus* та *A. annua* відповідно, а найменший —  $48,01 \pm 11,18$  мг/г сухої речовини — у трансгенних коренях *A. vulgaris*.

Уперше було досліджено вміст артемізиніну у «бородатих» коренях *A. dracuncululus* та *A. vulgaris*. Визначено, що після генетичної трансформації *A. vulgaris* у 40% ліній «бородатих» коренів відбувалося збільшення вмісту артемізиніну, у 40% генетична трансформація не впливала на вміст цієї сполуки, та у 20% випадків призводила до зменшення вмісту артемізиніну. У досліджуваних «бородатих» коренях *A. annua* та *A. dracuncululus* вміст артемізиніну був нижчий у порівнянні з таким у коренях нетрансформованих рослин.

Досліджено вміст флавоноїдів у «бородатих» коренях полину. Після трансформації спостерігали збільшення вмісту флавоноїдів в «бородатих» коренях *A. annua* та *A. vulgaris*, а також їх зменшення у коренях *A. dracuncululus*.

Вивчено вміст цукрів у «бородатих» коренях полину. Показано, що після генетичної трансформації відбувалися кількісні та якісні зміни у вмісті цукрів в екстрактах «бородатих» коренів. Вміст сахарози у «бородатих» коренях *A. vulgaris* в 1,3-1,6 рази перевищував такий у коренях нетрансформованих рослин, а «бородаті» корені *A. dracuncululus* накопичували фруктозу майже у тричі більшій кількості, ніж контроль. У трансформованих коренях також було виявлено сполуки, які не були притаманні нетрансформованим кореням. Наприклад, у трансгенних коренях *A. vulgaris* відбувався синтезу манітолу, а у трансгенних коренях *A. dracuncululus* — синтез галактози.

Визначено вміст інуліну у коренях *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracuncululus*. Встановлено зменшення вмісту інуліну у «бородатих» коренях порівняно з таким у контролі.

Окрім вмісту біологічно активних сполук у «бородатих» коренях, було також досліджено антиоксидантну та противірусну активності отриманих з них екстрактів. Здатність екстрактів з трансгенних коренів відновлювати DPPH

радикал коливалась у широкому діапазоні  $22 \pm 4,2$  –  $93 \pm 5\%$ . Найнижчу протирадикальну активність було виявлено в екстрактах, отриманих з трансгенних коренів *A. dracunculus*, а найвищу — в екстрактах *A. annua*. У ряді екстрактів, отриманих з трансгенних ліній, рівень протирадикальної активності виявився більшим порівняно з таким у кореневих екстрактах контрольних нетрансформованих рослин відповідних видів.

Показано, що екстракти трансгенних коренів, що несуть ген *ifn- $\alpha$ 2b*, проявляли також противірусну активність. Лінії «бородатих» коренів *A. vulgaris* та *A. annua* значно відрізнялися за рівнем інтерференоподібної активності, яка варіювала у межах 642 – 1414 МО/г маси. Високу активність мали екстракти з двох ліній трансгенних коренів *A. vulgaris* та двох ліній *A. annua* — на рівні 1414 та 1212 МО/г маси, відповідно.

Отже, було виявлено як зменшення, так і збільшення вмісту біологічно активних сполук у «бородатих» коренях *A. annua*, *A. vulgaris* та *A. dracunculus*. З огляду на результати морфо-фізіологічних та біохімічних досліджень для кожного з видів відібрано лінії «бородатих» коренів, які накопичували фруктани, флавоноїди та артемізинін у більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин.

Отримані нами результати свідчать про те, що *Agrobacterium*-опосередковану генетичну трансформацію можна використовувати як інструмент для підвищення вмісту цінних сполук у трансгенних коренях *Artemisia*. Зокрема, за допомогою генетичної трансформації *A. rhizogenes* було показано можливість збільшення вмісту фруктанів (*A. annua* та *A. dracunculus*), артемізиніну (*A. vulgaris*), флавоноїдів (*A. annua* та *A. vulgaris*); продемонстровано здатність трансформованих коренів до синтезу нехарактерних для контрольних коренів цукрів: манітолу (*A. vulgaris*) та галактози (*A. dracunculus*); встановлено збільшення рівня протирадикальної активності у трансформованих коренях полину; вперше показано можливість отримання «бородатих» коренів полину з геном синтезу інтерферону людини *ifn- $\alpha$ 2b* та визначено противірусну активність отриманих з них екстрактів.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було створено колекцію «бородатих» коренів полину, що можуть бути використані у якості джерел біологічно активних сполук.

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

## ANNOTATION

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

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

Defence of the thesis is to be held at the meeting of specialized academic council К 26.202.01 at the Institute of the Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences, Ukraine.

Kyiv, 2018.

### *Annotation*

This work presents results of the study devoted to *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation effect on accumulation of biologically active compounds in *Artemisia* (*A. vulgaris* L., *A. annua* L., *A. dracuncululus* L.) roots. The usage prospect of “hairy” root cultures as a source of biologically active compounds was also reviewed. The method of genetic transformation of studied species was optimized. The content of biologically active compounds (such as flavonoids, fructans,

inulin, sugars and artemisinin) in *Artemisia* “hairy” roots was determined, as well as the biological activity of their extracts.

Literature review contains generalized information regarding the use of *Artemisia* spp. representatives in *in vitro* culture and the biotechnological value of their “hairy” root cultures as well as of those of other genera. Modern studies regarding genetic transformation of dicots were also reviewed, particularly with an emphasis on the application of *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool to influence the metabolic characteristics of plants.

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

Genetic transformation of studied plants was carried out using *A. rhizogenes* A4 wild strain, as well as those which carried pCB 161 or pCB 124 vectors. As a result, the collection of “hairy” root cultures was established for all studied plants. The presence of agrobacterial genes in “hairy” roots was determined using PCR analysis. It was demonstrated, that used conditions of genetic transformation along with leaves as explants in some cases (*A. vulgaris*) could result in 100% transformation frequency. This is the first report of establishment of *Artemisia* “hairy” roots carrying the human *ifn- $\alpha$ 2b* gene — a gene for a compound with pharmaceutical value.

The morpho-physiological peculiarities (such as growth rate) of “hairy” root cultures were studied. It appeared, that some lines of *A. vulgaris* and *A. annua* “hairy” roots showed the highest growth rates, while *A. dracuncululus* “hairy” roots characterized by the slow growth rate. The variability of this parameter within each species was statistically significant and did not depend on the vector used.

The effect of exogenous growth regulators on root growth was determined. For all studied “hairy” root, the use of 0.5 mg/l of indolylacetic or indolylbutyric acids accelerates the root growth and increases the mass gain.

The increased accumulation of fructans in *A. annua* and *A. dracunculus* “hairy” roots as compared to the control ones was observed. However, the contents of these compounds in *A. vulgaris* “hairy” roots were lower than such in the roots of non-transformed plants. Accordingly, the highest fructans content —  $183,1 \pm 1,05$  and  $160,8 \pm 2,81$  mg/g of DW — was observed in *A. dracunculus* and *A. annua* transgenic lines respectively, and the lowest —  $48,01 \pm 11,18$  mg/g of DW — in *A. vulgaris* “hairy” roots.

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

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

We studied content of such sugars as glucose, fructose, sucrose, mannitol and galactose in *Artemisia* plants and “hairy” roots. It was shown that after genetic transformation there were quantitative and qualitative changes in the content of these compounds. The content of sucrose in the *A. vulgaris* “hairy” roots was 1,3-1,6 times higher than in the roots of untransformed plants. At the same time *A. dracunculus* “hairy” roots accumulated fructose almost three times more than control. Moreover, we observed the presence of extrinsic to control roots compounds in “hairy” roots extracts. For instance, accumulation of mannitol was found in the *A. vulgaris* transgenic roots. *A. dracunculus* transgenic lines, in contrast to roots of the non-transformed plants, accumulated a galactose.



All plants and “hairy” roots of *A. vulgaris*, *A. annua* and *A. dracunculus* were tested for inulin content. In most cases the decrease of this compound was found in extracts of transgenic roots as compared to the control.

Beside the biologically active compounds content we also determined the antioxidant and antiviral activities of extracts of *Artemisia* “hairy” roots. The ability of transgenic roots extracts to reduce DPPH<sup>+</sup> radical varied in the wide range from 22±4,2 up to 93±5%. The lowest anti-radical activity was found in extracts derived from *A. dracunculus* transgenic roots, while the highest one was observed in extracts of *A. annua*. The antiradical activity level was similar to one in the extracts of roots of non-transformed plants of the corresponding species in several cases.

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

Study of the biologically active compounds in *Artemisia* showed that both decrease and increase of their content in the “hairy” roots of *A. annua*, *A. vulgaris* and *A. dracunculus* are possible. According to the results of physiological and biochemical researches we selected “hairy” roots lines for each species, which accumulated fructans, flavonoids and artemisinin in a higher amount than the roots of non-transformed plants.

Our results suggest that *Agrobacterium*-mediated genetic transformation can be used as a tool for increasing the content of valuable compounds in *Artemisia* “hairy” roots. After *A. rhizogenes*-mediated genetic transformation we particularly observed the increase in the content of fructans (for *A. annua* and *A. dracunculus*), artemisinin (for *A. vulgaris*) and flavonoids (for *A. annua* and *A. vulgaris*). Moreover, we showed the ability of transformed roots to accumulate compounds, which were not typical for control roots. In case of *A. vulgaris* it was mannitol, while *A. dracunculus* accumulated galactose. We also observed increased antiradical activity of *Artemisia* “hairy” root extracts. This is the first report of the *Artemisia* “hairy” root culture, which was

established using agrobacteria with the human *ifn- $\alpha$ 2b* gene and which extracts possessed an antiviral activity.

Thus, we have created a collection of *Artemisia* spp. “hairy” root cultures, which can be used as sources of biologically active compounds.

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

*Список публікацій здобувача за темою дисертації:*

1. Study of artemisinin and sugars accumulation in *Artemisia vulgaris* and *Artemisia dracuncululus* "hairy" root cultures / **К. Дробот**, N. Matvieieva, A. Ostapchuk, M. Kharkhota // Preparative Biochemistry and Biotechnology – 2017. – Vol.47, №8. – P. 776-781.
2. **Дробот К.О.** Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини / **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, Н.А. Матвєєва // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2015. – Т.17. – С.145-147.
3. **Дробот К.О.** Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / **К.О. Дробот**, Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – Т. 19. – С. 117-120.
4. Вплив *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст біологічно активних сполук у трансгенних коренях *Artemisia vulgaris* / **К.О. Дробот**, А.М. Остапчук, В.П. Дуплій, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика. – 2016. – Т. 48, № 5. – С. 450-455.
5. Порівняльна оцінка вмісту поліфруктанів у бородатих коренях та рослинах роду *Artemisia* / В.П. Дуплій, **К.О. Дробот**, Я.І. Ратушняк, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика – 2017. – Т.49, №4. – С. 321-327.

6. **Drobot K. O.** Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) “hairy” root culture production / **K.O. Drobot**, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // *Biotechnologia acta*. – 2016. – Vol.9, №2. – P. 55-60.
7. **Дробот Е.А.** *In vitro* растения рода *Artemisia* как продуценты биологически активных соединений / **Е.А. Дробот**, Н.А. Матвеева // Scientific proceedings of the international network *AgroBioNet* of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2015. – № 1 – P.127-130.
8. **Drobot K.** Artemisinin content in *Artemisia vulgaris* L. *in vitro* cultivated plants and “hairy” roots / **K. Drobot**, A. Ostapchuk, N. Matvieieva // Scientific proceedings of the international network *AgroBioNet* of the institution and researcher of international research , education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2016. – № 1 – P. 518-520.
9. Artemisinin and total flavonoid content in *in vitro* cultivated *Artemisia annua* L. “hairy” root culture / **K. Drobot**, N. Matvieieva, M. Kharkhota, A. Shakhovsky, Ya. Ratushnyak // Scientific proceedings of the international network *AgroBioNet* of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2017. – № 1 – P. 91-94.
10. Some investigations of using of biostimulators for the activation of seeds germination and stimulation of roots growth / N. Matvieieva, S.P. Ponomarenko, **K.O. Drobot**, E. Maluszynska, A. Szydłowska // II Konferencja Naukowa “Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin”, 25-26 lutego 2015. –Warszawa, 2015. – P. 78.
11. Противірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2B$  людини / Є.В. Ісаєва, А.А. Лісняк, О.П. Трохименко, А.О. Потрохов, **К.О. Дробот**, Н.А. Матвеева // Тези доповідей ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття», 24 квітня 2015. – Київ, 2015. – С.45.

12. Flavonoids content in sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) “hairy” root culture / **K.O. Drobot**, N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky // Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June, 2017 – Kyiv, 2017. – P.67.
13. **Drobot K.O.** Transgenic *Artemisia dracunculus* L. “hairy” root culture construction / **K.O. Drobot**, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Тези доповідей Міжнародної наукової конференція «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології», 11-13 жовтня, 2015 р. – Львів, 2015. – С. 110.
14. Матвеева Н.А. Противірусна активність екстрактів трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* / Н.А. Матвеева, **К.О. Дробот**, О.П. Трохименко // Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості», 17-18 жовтня, 2017 р. – Харків, 2017. – С 68-71.
15. “Hairy” root cultures as a source of biologically active substances / N. Matvieieva , **K. Drobot** , A. Shakhovsky , A. Ostapchuk , Yu. Kudryavets // International Conference «Smart Bio», 18-20 May, 2017. – Каунас, 2017. – P. 38.
16. Пат. КМ № 116312 Україна. Спосіб отримання культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia dracunculus* L. / Н.А. Матвеева, **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, В.П. Дуплій – Опубл. 20. 03. 2017.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АК – аскорбінова кислота

АОА – антиоксидантна активність

АФК – активні форми кисню

БАП – 6-бензиламінопурин

БАС – біологічно активні сполуки

ВВС – вірус везикулярного стоматиту

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією

ІМК – індолілмасляна кислота

ІОК – індолілоцтова кислота

КоА – ацетил-кофермент А

МО – міжнародні одиниці

МС – живильне середовище Мурасіге-Скуга

НОК – нафтилоцтова кислота

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п. н. – пара нуклеотидів

ПТП – перевивна культура клітин тестикул поросят

РЕ – рутиновий еквівалент

РНК – рибонуклеїнова кислота

Т-ДНК – ділянка плазмід агробактерій, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації

АСТ – artemisinin combination therapy

*cal* – лідерна послідовність, що забезпечує транспорт цільового білка в апопласт

СНІ – халконізомерази

СНС – халконсинтази

DRPH – дифеніл-пікрил-гідразил радикал

*FDS* – ген фарнезилдифосфат синтази

*FLS* – флавонолсинтаза

*F3H* – флаванон-3-гідроксилаза

*HCMV* – цитомегаловірус людини

*HSV1* – вірус герпесу людини

*HPLC* – High-performance liquid chromatography (високоєфективна рідинна хроматографія)

*ifn- $\alpha$ 2b* – ген інтерферону- $\alpha$ 2b людини

*LB* – живильне середовище Бертані (*lysogeny broth*) для культивування мікроорганізмів

*mAU* – одиниці поглинання (milli-Absorbance Units)

*NOS* – промотор нопалінсинтази

*nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II

*PAL* – фенілаланін аммоній-ліаза

*rb, lb* – правий та лівий повтори, які обмежують T-ДНК

*SST* – сахарозо:сахарозо-1-фруктозилтрансфераза

*SFT* – сахарозо:фруктан-6-фруктозилтрансфераза

*TPIC* – тріс-(гідроксиметил)-амінометан

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	18
<b>РОЗДІЛ 1</b> .....	26
<b>ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	26
1.1. Використання біотехнології для створення рослин з корисними ознаками.	26
1.2. Методи уведення генетичного матеріалу у рослинну клітину .....	28
1.2.1. Генетична трансформація: пряме та опосередковане перенесення генів .....	29
1.2.2. Ґрунтові бактерії <i>Agrobacterium tumefaciens</i> і <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	31
1.2.3. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація як інструмент біотехнології рослин. ....	32
1.3. Використання культури «бородатих» коренів у біотехнології.....	32
1.4. Біологічно активні сполуки, синтезовані у «бородатих» коренях.....	34
1.4.1. Біологічно активні сполуки рослинного походження .....	35
1.4.2. Рекомбінантні біологічно активні сполуки. ....	51
1.5. Рослини роду <i>Artemisia</i> як об'єкт біотехнологічних досліджень .....	57
1.5.1. Біологічні особливості рослин. ....	58
1.5.2. Лікувальні властивості.....	58
<b>РОЗДІЛ 2</b> .....	65
<b>МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	65
2.1. Вихідний матеріал .....	65
2.2. Уведення в культуру <i>in vitro</i> .....	65
2.3. Мікроклональне розмноження рослин <i>Artemisia</i> .....	65
2.4. Оптимізація умов вирощування рослин <i>Artemisia</i> .....	67
2.5. Культивування агробактерій для генетичної трансформації .....	67
2.6. Генетична трансформація з використанням <i>A. rhizogenes</i> .....	68
2.7. Субкультивування культури «бородатих» коренів <i>Artemisia</i> .....	68
2.8. Виділення загальної ДНК.....	69
2.9. Молекулярно-біологічний аналіз .....	70
2.10. Дослідження швидкості росту трансгенних коренів.....	71

2.11. Дослідження впливу регуляторів росту рослин на швидкість росту трансгенних коренів .....	71
2.12. Підготування рослинного матеріалу для біохімічних досліджень .....	72
2.13. Визначення вмісту поліфруктанів у трансгенних коренях <i>Artemisia</i> .....	73
2.14. Визначення вмісту цукрів та інуліну .....	74
2.15. Визначення вмісту артемізиніну в трансгенних коренях <i>Artemisia</i> .....	75
2.16. Визначення вмісту флавоноїдів в трансгенних коренях <i>Artemisia</i> .....	75
2.17. Визначення антиоксидантної активності екстрактів трансгенних коренів <i>Artemisia</i> .....	76
2.18. Визначення противірусної активності екстрактів трансгенних коренів <i>Artemisia</i> .....	77
2.19. Статистична обробка результатів.....	76
<b>РОЗДІЛ 3</b> .....	78
<b>РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	78
3.1. Культивування <i>Artemisia</i> spp. <i>in vitro</i> та ініціювання культури «бородатих» коренів.....	78
3.1.1. Уведення рослин <i>Artemisia</i> в культуру <i>in vitro</i> та мікроклональне розмноження .....	78
3.1.2. Оптимізація умов вирощування рослин <i>Artemisia</i> .....	79
3.1.3. Генетична трансформація рослин <i>Artemisia</i> spp. ....	82
3.1.4. Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів <i>Artemisia</i> .....	88
3.2. Дослідження впливу генетичної трансформації на морфо-фізіологічні параметри «бородатих» коренів .....	93
3.2.1. Фенотипові особливості отриманих ліній трансгенних коренів <i>Artemisia</i> . .....	93
3.2.2. Порівняння швидкості росту отриманих ліній трансгенних коренів <i>Artemisia</i> .....	94
3.2.3. Вплив регуляторів росту на приріст маси трансгенних коренів. ....	97
3.3. Визначення вмісту біологічно активних сполук та біологічної активності у «бородатих» коренях <i>Artemisia</i> .....	102



3.3.1. Визначення вмісту поліфруктанів. ....	102
3.3.2. Визначення вмісту цукрів.....	106
3.3.3 Визначення вмісту інуліну .....	109
3.3.4. Визначення вмісту артемізиніну.....	111
3.3.5. Визначення вмісту флавоноїдів у трансформованих коренях.....	114
3.3.6. Визначення антиоксидантної активності (АОА) .....	116
3.3.7. Визначення протівірусної активності .....	121
3.4. Відбір ліній-продуцентів біологічно активних сполук.....	126
<b>АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>128</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>132</b>
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>133</b>

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Біотехнологія – одна з міждисциплінарних галузей сучасної біологічної науки, головною метою якої є покращення якості природної сировини для забезпечення потреб людини. Біотехнологія рослин охоплює цілий ряд напрямків, серед яких є мікроклональне розмноження рослин, збереження генофонду рідкісних видів, прискорення селекційного процесу, генетична модифікація рослин. З розвитком біотехнології та методів генетичної інженерії з'явилася можливість коригувати біосинтетичні процеси в рослинах та змінювати їх метаболічні параметри. Використання трансгенних (біотехнологічних) рослин у сільському господарстві зростає щороку [1]. Біотехнологічні рослини стають невід'ємною складовою сільськогосподарської політики розвинутих країн. Це надихає вчених до створення нових рослин з цінними споживчими якостями шляхом генетичної інженерії.

Порівняно з тваринними та мікробними системами експресії білків, рослини є зручною та безпечною системою для продукування цінних метаболітів [2-3]. Зокрема, рослинні рекомбінантні білки характеризуються рядом переваг: відсутністю домішок, що мають алергенну, канцерогенну активність; відсутністю небажаних вірусів, легкістю очищення цільових білків; окрім того, рослинний процесинг здійснює глікозилування білків, що забезпечує їх повноцінне функціонування [4]. Рослинну їжу не обов'язково піддавати термічній обробці, що дозволяє зберегти нативну структуру синтезованих білків-вакцин. За допомогою рослинних систем синтезують широке коло речовин з лікувальними властивостями, зокрема гормони [5-6], ферменти [7-8], білки імунної системи людини [9-13].

Для зміни природних якостей рослин застосовують методи генетичної інженерії, які дозволяють керовано впливати на геном рослин. Генетична трансформація за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* належить до таких методів.

*A. rhizogenes* — це фітопатоген, який інфікує рослини у природніх умовах [14]. У результаті інфікування рослини відбувається ріст так званих «бородатих» коренів [15]. Ця природна здатність агробактерій використовується у біотехнологічних дослідженнях для створення так званих «бородатих» коренів.

Культура «бородатих» коренів — це культура трансгенних органів, отримана шляхом *Agrobacterium rhizogenes* опосередкованої трансформації [16]. «Бородаті» корені мають характерний фенотип: негативний геотропізм, високий ступень галуження, вони здатні до росту на живильному середовищі без екзогенних регуляторів росту [17]. Такі корені можуть бути використані для оцінки ефективності застосування генетичної трансформації та перенесення тих чи інших генів до рослин різних видів, для визначення ступеню вірулентності штамів агробактерій та для синтезу цінних сполук.

Найбільша перевага «бородатих» коренів полягає у тому, що їх можна використовувати як джерело біологічно активних сполук. У культурі «бородатих» коренів так само синтезуються продукти вторинного метаболізму, як і у вихідних рослинах [18]. Інтенсивність вторинного метаболізму у «бородатих» коренях може перевищувати таку у інтактних рослинах цього ж виду [19].

У «бородатих» коренях було синтезовано ряд біологічно активних сполук, серед яких алкалоїди [20], антрахінони [21], антоціани [22], флавоноїди [23], сапоніни [24], терпени [25], тощо.

Окрім сполук, які природньо синтезуються у рослинах, «бородаті» корені можуть синтезувати сполуки, не притаманні рослинам певного виду, або такі, які притаманні бактеріям, вірусам, тваринам, людині. Перше застосування культури «бородатих» коренів для повноцінного синтезу рекомбінантних білків датується 1997 роком [26]. У «бородатих» коренях було здійснено синтез моноклональних антитіл IgG мишей. У наступні роки було показано можливість продукування у «бородатих» коренях ряд рекомбінантних білків,

включаючи інші антитіла, антигени, імуномодулятори, репортерні білки та ферменти. Гени синтезу цих білків переносять до геному рослин за допомогою *A. rhizogenes*, до Т-ДНК якої передусім вносять чужорідні гени інтересу. Це робить можливим створення так званих «їстівних» вакцин — рослин, які вживаються безпосередньо у їжу та можуть бути застосовані для імунізації людей та тварин [27-28].

Задля таких цілей менш затратним та економічно вигідним може бути використання лікарських рослин, які природно синтезують сполуки, що застосовують для лікування та профілактики ряду захворювань [29-30]. Отже, лікарські рослини є перспективними об'єктами робіт з генетичної трансформації. До таких рослин належать і рослини полину (*Artemisia*, Asteraceae).

Полин здавна використовується у народній медицині. Зокрема, це обумовлено наявністю у його хімічному складі ефірних олій, аскорбінової кислоти, флавоноїдів та сесквітерпенових сполук [31-32]. Ефірні олії, екстраговані з надземних частин *A. absinthium*, пригнічують ріст *Candida albicans* і *Saccharomyces cerevisiae* [33], екстракти з цієї рослини проявляють протирадикальну, антигельмінтну [34] та нейропротекторну дії [35]. Суміш ефірних олій та флавонолідів з *A. abrotanum* можна використовувати для профілактичного та терапевтичного лікування пацієнтів з алергічним ринітом. [36]. Крім того, метанольні екстракти *A. abrotanum* проявляли *in vitro* антимікробну активність проти видів *Malassezia* spp., *Candida albicans* [37] та *Staphylococcus aureus* [38-39]. Полин однорічний — *A. annua* — занесений до національної фармакопеї Китаю та використовується як протизапальний засіб ще з стародавніх часів [40] Також відомо, що рослини роду *Artemisia* продукують артемізинін, цінну сполуку з антималярійними властивостями, за дослідження якого у 2015 році було присуджено Нобелівську премію у галузі медицини та фізіології [41]. У зв'язку з цим, за останні роки кількість робіт з дослідження

вмісту артемізиніну у різних видах полину значно виросла, здійснюються спроби інтенсифікації його біосинтезу [42-46].

Незважаючи на підвищений інтерес до *A. annua* як рослини з антималарійними властивостями, нині є лише поодинокі дослідження інших біологічно активних сполук у рослинах цього роду. Разом з тим, рослини полину синтезують ефірні олії (особливо у листі та суцвітті), у складі яких переважають терпенові спирти евгенол, борнеол та каріофілен, у фітохімічному складі полину ідентифіковано більше 4500 сполук фенольної природи та флавоноїдів [47], кумарини (скополин, ескулетин) та фенолокислоти (хлорогенова, хінна кислоти). Окрім цього, рослини родини Asteraceae, до яких і належить *Artemisia*, відомі своєю здатністю синтезувати та накопичувати фруктозозвмісні цукри [48-50]. Такі цукри проявляють імуномодулюючу, протипухлинну [51], пребіотичну [52], гепатопротекторну та протизапальну активності [53-54], що робить їх цінним рослинним метаболітом з точки зору біотехнології та медицини.

Попри широке використання рослин роду *Artemisia* у медицині, ці рослини залишаються досі недостатньо вивченими з біотехнологічної точки зору. У численних дослідженнях головна увага була зосереджена на рослинах *A. annua*, проте на даний час існують лише декілька публікацій з генетичної трансформації інших видів полину [55-56]. Так, досі не було проведено генетичну трансформацію полину-естрагону, до геному рослин цього виду раніше не переносили гени білків медичного призначення, зокрема гена інтерферону, а також не визначали зміну у вмісті біологічно активних сполук та біологічній активності у екстрактах коренів цих рослин після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації. З огляду на багатий фітохімічний склад представників роду *Artemisia*, трансгенні корені, отримані з цих рослин, можуть бути зручною біотехнологічною системою для синтезу та накопичення БАС.

Отже, актуальним є створення культури «бородатих» коренів лікарських рослин роду *Artemisia* та вивчення впливу генетичної трансформації на фізіологічні та біохімічні процеси у цих рослинах. Дослідження в цій сфері

можуть бути поштовхом для створення рослинної біотехнологічної платформи для продукції біологічно активних сполук, а також використання цих сполук в косметології, а також в харчовій та медичній промисловостях.

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

**У завдання входило:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Наукова новизна.** В результаті виконання завдань дисертаційної роботи, Дробот К.О. були отримані наступні результати:

1) Було оптимізовано протокол *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації *A. dracuncululus* та уперше отримано «бородаті» корені цього виду.

2) Уперше було показано можливість отримання «бородатих» коренів *A. vulgaris* з використанням *A. rhizogenes*, яка несе не тільки селективні та репортерні гени, але й ген рекомбінантного білка, зокрема, інтерферону людини *ifn- $\alpha$ 2b* – сполуки, яка має лікувальні властивості.

3) Кількісно визначено накопичення природних для рослин БАС (артемізиніну, флавоноїдів, цукрів), та порівняно їх вміст у *in vitro* культивованих рослинах та трансгенних коренях.

4) Показано, що екстракти трансгенних коренів, які містять ген *ifn- $\alpha$ 2b*, проявляють противірусну активність. Створено колекцію «бородатих» коренів *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracuncululus* — продуцентів ряду БАС.

**Практичне значення одержаних результатів.** Здобувачем оптимізовано протокол *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації для отримання культури «бородатих» коренів *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. dracuncululus*, що може бути використаним для створення ліній-продуцентів БАС. Було порівняно вміст

біологічно активних сполук у коренях інтактних рослин та «бородатих» коренях *Artemisia*, та виявлено зміни у накопиченні БАС. Створена культура «бородатих» коренів є джерелом біологічно активних сполук, зокрема, артемізиніну, фруктозовмісних цукрів,; флавоноїдів, а також сполук з антиоксидантними та противірусними активностями. Отримані «бородаті» корені *Artemisia* можуть бути використані для потреб фармацевтичної промисловості та косметології.

### **Особистий внесок здобувача.**

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

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

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



Шупика. У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментів з трансформації, проведенні пробопідготовки до аналізів, участі у обговоренні результатів, формулюванні узагальнень та висновків, написанні статей.

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

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 15 наукових робіт, серед яких 9 статей, 5 з яких у виданнях, що є у переліку ДАК, одна стаття у виданні, що має індекси Scopus та Web of Science, та 6 тез у матеріалах міжнародних конференцій.

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

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### ***1.1. Використання біотехнології для створення рослин з корисними ознаками***

Розробка біотехнологічних методів та їх використання для покращення природної сировини є надбанням минулого століття. У 70-х роках було встановлено можливість перенесення чужорідних генів до геному рослин за допомогою ґрунтових бактерій *Agrobacterium*, і це надало суттєвий поштовх розвитку біотехнології рослин — міждисциплінарної галузі на межі науки та техніки. Завдяки біотехнології нині є можливим створення рослин з необхідними властивостями задля потреб людства.

Одним з напрямків біотехнології є збільшення продуктивності рослин з метою накопичення у них біологічно активних сполук. Відомо, що рослини здатні синтезувати речовини різної природи — алкалоїди, терпени, феноли, цукри та інші продукти рослинного метаболізму [57]. Вони захищають рослину від шкідників і патогенів, надають колір та запах квітам і плодам, сприяючи розмноженню, забезпечують взаємодію рослин між собою і з іншими організмами в екосистемі. Окрім того, рослинні метаболіти можуть проявляти біологічну активність і тому здавна використовуються людством у практичних цілях [29]. Зокрема, рослини є джерелами цінних лікарських речовин (фунгіцидів, засобів з антибіотичними властивостями), інсектицидів [58], натуральних ароматизаторів та барвників, вітамінів, цукрів, ефірних олій [59-60], які є незамінними у фармацевтичній, косметичній, харчовій промисловостях та у сільському господарстві.

Однак, використання природних популяцій рослин в якості джерел біологічно активних сполук не завжди є можливим та доцільним, а також не дозволяє отримати велику кількість рослин за короткий проміжок часу. Окрім

цього, масове вилучення рослин шкодить природнім популяціям [61]. Цінні сполуки часто накопичуються лише у певних частинах рослин (наприклад, лише у суцвітті, або у коренях) та в незначній кількості. Подолати ці обмеження дозволяють інструменти біотехнології рослин. Отже, метою біотехнології рослин є максимальне забезпечення потреб людства продуктами рослинного походження, зокрема, біологічно активними сполуками, при збереженні навколишнього середовища.

Методи біотехнології рослин дозволяють створювати безвірусні рослини, підвищувати врожайність та мінімізувати витрати у сільськогосподарському секторі [62]. Генетична інженерія є одним з інструментів біотехнології рослин, який дозволяє надавати нові ознаки рослинам, а також покращувати вже наявні. Біотехнологічні рослини також можна використовувати в якості біореакторів для продукування вторинних метаболітів [63-66].

Перелічені переваги біотехнологічних рослин є передумовою для розробки нових стратегій отримання цінних сполук з рослинної сировини. Одним із розповсюджених способів продукування біологічно активних метаболітів рослин є технологія культури клітин. Основна перевага цієї технології полягає в тому, що вона може забезпечити безперервне надійне джерело лікарських препаратів рослин і може використовуватися для широкомасштабної продукції метаболітів [13, 67]. Вдосконалення методів генної інженерії, зокрема генетичної трансформації, відкриває нові шляхи для виробництва фармацевтичних препаратів, харчових добавок та інших цінних сполук [68]. Використання рослин для виробництва природних або рекомбінантних сполук привертає увагу протягом останніх десятиліть.

Альтернативою культурі клітин є культура органів, серед переваг якої є більш висока генетична стабільність [69], що не є притаманною культурі клітин. Це дозволяє виробництву не залежати від генетичної мінливості культури і робить процес більше ефективним.

Біоактивні сполуки, які отримують в даний час з рослин, використовуються для отримання лікарських препаратів, агрохімікатів, ароматизаторів, харчових

добавок та пестицидів [70-71]. Такими сполуками можуть бути ті, що природньо синтезуються у рослинах (антиоксиданти, вітаміни, цукри), вміст яких можна збільшити біотехнологічними методами. Застосування таких методів має декілька переваг над методами традиційної селекції, зокрема, потребує менше часу та є більш контрольованим. Так, наприклад, за використання генноінженерних підходів значно збільшили рівень вітаміну Е у сої, кукурудзи та ріпаку [72-73] отримали рослини рису, збагачені попередником вітаміну А,  $\beta$ -каротином. [74] Sévenier et al. [75] вдалось отримати цукровий буряк, який був продуцентом фруктанів. Показано можливість збільшення вмісту заліза у *Lactuca sativa* [76] та фолатів у *Lycopersicum esculentum* [77].

Іншими цінними сполуками, що отримуються з трансгенних рослин, є білки тваринного чи мікробного походження, непритаманні рослинам. Однак, їх гени можуть бути перенесені шляхом генетичної трансформації. Таким чином отримують рослини, що синтезують рекомбінантні сполуки. Зокрема, було показано можливість синтезу та накопичення інтерферону [78] колагену [79], інсуліну [80], лактоферрину [81], соматотропіну [82], казеїну [83] та десятків інших білків. Для накопичення невластивих рослинам білків використовують різні види рослин, у тому числі тютюн, картоплю, томат, салат, ріпак, тощо [84-89]. Інструментом для перенесення генів таких білків є генетична трансформація.

## ***1.2. Методи уведення генетичного матеріалу у рослинну клітину***

У якості важливого інструмента змін рослинного геному застосовують технологію рекомбінантних ДНК. Вона полягає у перенесенні ДНК в складі вектору до рослинних клітин. Цей метод дозволяє отримати трансгенні рослини завдяки тотипотентності рослинних клітин. Отже, з однієї трансформованої клітини можна регенерувати цілу рослину, всі клітини якої будуть містити один або декілька чужорідних генів [15, 90]

Основними інструментами перенесення чужорідних генів у рослинні клітини є соматична гібридизація та генетична трансформація.

Метод соматичної гібридизації базується на створенні гібридних клітин рослин шляхом злиття протопластів. Соматична гібридизація відрізняється від інших методів у багатьох відношеннях. Соматична гібридизація дозволяє розширювати базу зародкової плазми, дозволяє пропускати етап клонування генів, а також дає змогу переносити як моно-, так і полігенні ознаки [91]. Перевагою соматичної гібридизації є можливість отримання гібридів, які неможливо отримати при звичайному статевому схрещуванні.

Найчастіше злиття протопластів проводять між клітинами споріднених видів рослин для надання нових ознак клітинам-реципієнтам [92]. Широко представлені у літературі роботи з гібридизації родини Brassicaceae, Poaceae, Solanaceae та Rutaceae [93-95]. Так, наприклад, було створено лінії тютюну *N. tabacum* x *N. stocktonii*, які містили гени стійкості до вірусу тютюнової мозаїки [96] або декілька генів стійкості тютюнового бражника [97], хоча ці гени притаманні лише деяким диким видам тютюну. Було отримано гібрид *Arabidopsis thaliana* та *Triticum aestivum* та показано можливість отримання гібридів муж дво- та однодольними рослинами [98].

Хоча метод соматичної гібридизації було розроблено близько п'ятидесяти років тому, він і досі застосовується з метою створення гібридів з підвищеною стійкістю до біотичних та абіотичних стресових факторів. Іншим інструментом змін рослинного генома є метод генетичної трансформації.

**1.2.1. Генетична трансформація: пряме та опосередковане перенесення генів.** Генетична трансформація — метод біотехнології, що дозволяє проводити направлене перенесення та вбудовування чужорідної ДНК в клітину-реципієнт. Цей метод дозволяє вирішувати різноманітні задачі, зокрема, створювати рослини з підвищеною сільськогосподарською цінністю, резистентністю до багатьох біотичних та абіотичних стресових факторів, тощо [99]. Отримані шляхом генетичної трансформації трансгенні рослини можуть слугувати біореакторами для синтезу цінних білків та метаболітів [100].

Ефективність генетичної трансформації може залежати від способу перенесення чужорідної ДНК. Методи введення ДНК у рослинну клітину можна поділити на прямі та опосередковані.

При прямому перенесенні генів чужорідний ген, який становить інтерес, безпосередньо вводять до клітини ролин-реципієнта. Методами прямого перенесення ДНК до рослинних клітин є хімічно-індуковане перенесення генів, мікроін'єкція, електропорація, біолістична трансформація та упаковка ДНК в ліпосоми або ліпофекція.

При хімічно-індукованому перенесенні гена використовують хімічні сполуки, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ) або декстрансульфат, які роблять клітинну стінку більш сприйнятливою до поглинання ДНК у протопласт [101]. При мікроін'єкції ДНК безпосередньо вводять у протопласти (в ядро або цитоплазму), використовуючи тонкі голки (0,5-1,0 мкм у діаметрі) або мікропіпетки [102]. Цей метод переносу генів використовується для введення ДНК у великі клітини, такі як ооцити та клітини ембріонів. Електропорація полягає у подачі імпульсів високої напруги до протопластів/клітин/тканин, для створення тимчасових каналів у плазматичній мембрані, які полегшують поглинання клітиною чужорідної ДНК [103]. Біолістична трансформація — це спосіб доставки ДНК у рослинні клітини під високим тиском за допомогою гелієвої гармати, яка бомбардує експлант-реципієнт частинками вольфраму або золота з нанесеною на них чужорідною ДНК [104]. При ліпофекції чужорідну ДНК заключають у ліпосоми, які здатні зливатись з клітинними мембранами, вивільняючи всередину протопластів свій вміст з чужорідним генетичним матеріалом. Ліпосоми інкапсулюють фрагменти ДНК, а потім приклеюються до клітинних мембран і зливаються з ними для передачі фрагментів ДНК. Таким чином, ДНК потрапляє в клітку, а потім до ядра. Ліпофекція — це дуже ефективна методика, що використовується для перенесення генів у бактеріальні, тваринні та рослинні клітини [105].

До непрямих методів переносу генів належить генетична трансформація за допомогою бактерій роду *Agrobacterium*. Серед її переваг можна відзначити

відносно дешевизну і досить високу ефективність трансформації. Ось чому *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація є історично першим способом трансформації і досі використовується у біотехнологічних дослідженнях [14, 106].

**1.2.2. Ґрунтові бактерії *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium rhizogenes*.** *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium rhizogenes*, які здатні переносити частину свого геному до клітин рослин, відносяться до ґрунтових бактерій родини Rhizobiaceae [15]. В ділянках, де відбулось інфікування рослин, ці бактерії викликають ріст новоутворень: відповідно «корончастих галлів» і «бородатих коренів». Якщо факт зараження відбувся, то ріст галлів або коренів може тривати і за відсутності бактерії, а пухлинна тканина здатна рости без екзогенних ауксинів і цитокінінів, які в нормі необхідні для стимуляції її росту [14].

Як індукція пухлин, так і їх ріст, обумовлені бактеріальними мегаплазмідами — Ті-плазмідною (від англ. “tumour inducing”) при інфікуванні *A. tumefaciens* або Рі-плазмідною (від англ. “root inducing”) у разі взаємодії з *A. rhizogenes*. Це відбувається завдяки вбудовуванню ділянки плазмід бактерій — Т-ДНК — у рослинний геном під час інфікування [107-108].

Сприйнятливість до агробактеріальної інфекції у природних умовах була знайдена у багатьох культурних рослинах, таких як картопля, бавовник, люцерна, олійний ріпак, тощо. Дводольні рослини легко вражаються агробактеріями у природних умовах на відміну від однодольних, для яких трансформація *Agrobacterium* є більш складним процесом [109-110]. Здатність *Agrobacterium* інфікувати однодольні рослини у природних умовах обмежується невеликою кількістю видів. Власне методика генетичної трансформації однодольних також може ускладнюватися фактом відсутності протоколів індукування каллусу і регенерації для цих рослин [111]. Відмінності у чутливості до агробактерій між одно- та дводольними рослинами можуть бути пов'язані з особливостями синтезу цими рослинами сполук, необхідних для запуску процесу трансформації [112].

**1.2.3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація як інструмент біотехнології рослин.** Відкриття явища перенесення генів агробактеріями стало революційним і надало суттєвий поштовх розвитку біотехнології рослин. Сьогодні *Agrobacterium*-опосередкована трансформація є одним з найрозповсюдженіших способів для отримання трансгенних рослин [113]. Використання *Agrobacterium* у якості вектора дозволяє переносити до геному рослин-реципієнтів гени інтересу та створювати трансгенні рослини з новими ознаками.

Головною практичною метою генетичної трансформації є створення рослин з корисними ознаками. Наприклад, за допомогою *Agrobacterium*- опосередкованої трансформації було створено рослини, стійкі до абіотичних стресових факторів [114] та фітопатогенів [115], продуцентів рекомбінантних білків та біологічно активних сполук [116-117].

Для *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації рослин розроблений простий і зручний метод «листочкових дисків» [118]. Цей метод використовують для генетичної трансформації Дводольних, зокрема, таким чином було створено трансгенні рослини картоплі [119], моркви [120], рапсу [121], тютюну [122], томату [123], ряски [124], полуниці [125], та низки лікарських рослин — шавлії [126], календули [127], алтеї [128], тощо.

### **1.3. Використання культури «бородатих» коренів у біотехнології**

*Особливості культури «бородатих» коренів.* Культура «бородатих» коренів — це культура трансгенних органів, отримана шляхом *A. rhizogenes* опосередкованої трансформації [16]. Такі корені відрізняються характерним фенотипом: їм притаманні негативний геотропізм, висока ступінь галуження, здатність до росту на живильному середовищі без екзогенних регуляторів росту [129-130]. «Бородаті» корені, так само як і вихідні рослини, можуть синтезувати біологічно активні сполуки (БАС) [131]. Крім того, трансгенні



корені можуть накопичувати ці сполуки у кількості, що перевищує таку у вихідних рослинах [132].

«Бородаті» корені становлять інтерес не тільки як джерело БАС, їх отримання є способом оцінки можливості застосування генетичної трансформації для перенесення тих чи інших генів до рослин різних видів, а також для оцінки ступеню вірулентності штамів агробактерій. [133-134]. У результаті генетичної трансформації зазвичай отримують велику кількість ліній трансгенних коренів, які відрізняються за параметрами росту та накопиченням сполук вторинного метаболізму [135-137].

Щороку кількість робіт з генетичної трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes* неупинно зростає. Серед рослин, для яких були розроблені протоколи генетичної трансформації, є ряд рослин сільськогосподарського призначення (диня [138], буряк [139], морква [140], картопля [141]) та лікарських рослин (женьшень [142], календула [143], шавлія [144], тощо). На основі рослин створюють так звані «їстівні» вакцини — трансгенні рослини, що можна їсти (салат, томат), які продукують сполуки медичного призначення, зокрема, антигени. Вживання таких вакцин супроводжується виробленням організмом людини антитіл, відбувається імунізація [145]. У якості антигенів до ядерної ДНК рослин переносили гени капсидних білків вірусу Норуолк (NVCP) [146] та ротавірусу, а також субодиницю термолабільного токсину В *Eschericia coli* (LTB) [147].

Показано можливість перенесення генів багатьох білків ссавців до ядерної ДНК рослин. За допомогою цього способу отримано рекомбінантні фактор росту епідермісу [148], сироватковий альбумін [149], інтерферони, інтерлейкіни [150], лізоцим [151], лактоферрин [152], тощо. Визначено, що рослини здатні синтезувати рекомбінантні білки мікобактерій, а білки-антигени з *M. tuberculosis* рослинного походження вже були протестовані у клінічних випробуваннях, де підтвердили наявність імуностимулюючої дії [153]. Досить давно було створено трансгенні рослини салату, що можуть бути використані як їстівні вакцини проти вірусу гепатиту В [154].

Рівень синтезу таких антигенів при перенесенні відповідних генів до ядерної ДНК рослин як правило низький. Щоб вирішити цю проблему, використовують трансформацію хлоропластної ДНК. У такому випадку кожна трансформована клітина може містити більше 10 000 копій трансгена завдяки багатокопійності хлоропластного генетичного матеріалу [155-157]. Сьогодні відомо більше 20 антигенів проти 16 різних хвороб, а також 11 білків медичного призначення, які було отримано після трансформації хлоропластної ДНК [158-162].

Лікарські рослини є перспективними об'єктами робіт з генетичної трансформації. Їх використання у генетичній інженерії може бути менш затратним, економічно вигідним, оскільки вони природно синтезують сполуки, які використовуються для лікування та профілактики ряду захворювань [29-30].

#### ***1.4. Біологічно активні сполуки, синтезовані у «бородатих» коренях***

Трансформовані корені, які синтезують біологічно активні сполуки, можуть бути використані для потреб фармацевтичної промисловості та косметології. Існують комерційні компанії (RootLinesTechnology та Green2Chem), які пропонують рекомбінантні білки та широкий спектр вторинних метаболітів, синтезованих у культурах «бородатих» коренів. Однією з таких культур є культура «бородатих» коренів *Plumbago zeylanica*, яка здатна синтезувати плюмбагін — сполуку класу хінонів, яка використовується в якості консерванту [163]. Також отримано трансгенні корені *Isatis tinctoria* [63], які продукують флавоноїди та інші сполуки з антиоксидантними властивостями. Ціановірин-N, сполука, яка проявляє активність проти вірусу імунодефіциту людини, було синтезовано у трансгенних коренях алтеї [128].

Серед сполук, синтезованих у «бородатих» коренях, є такі, що притаманні рослинам (продукти вторинного метаболізму, запасні речовини), а також такі, що мають бактеріальне чи тваринне походження (рекомбінантні білки). Останні можуть бути синтезовані у культурі «бородатих» коренів після перенесення

трансгенів до геному вихідних рослин та зміни біосинтетичних шляхів шляхом генетичної трансформації.

#### **1.4.1. Біологічно активні сполуки рослинного походження.**

Використання біотехнологічних підходів, зокрема генетичної трансформації, дозволяє впливати на метаболізм клітин рослин, впливаючи таким чином на вміст та накопичення притаманних цим рослинам біологічно активних сполук. Зокрема, при *A.rhizogenes*-опосередкованій трансформації відбувається перенесення до геному клітини-реципієнта генів агробактеріальної Т-ДНК, дія яких часто є плейотропною [164]. Тому окрім синтезу фітогормонів та опінів, гени яких містяться у Т-ДНК агробактерій, та росту «бородатих» коренів у місці інфікування, спостерігаються також зміни у синтезі сполук вторинного метаболізму та запасних речовин: полісахаридів, вітамінів, антиоксидантів, тощо [165-166].

**Фруктани як біологічно активні метаболіти рослин.** Фруктани – це полісахариди, полімери D-фруктози, які в основному накопичуються у коренях рослин. Вперше подібна речовина була знайдена в екстрактах кореневищ *Inula helenium* [167]. У 1818 році ця сполука отримала назву інулін. У подальшому почали проводити комплексне вивчення фруктанів, яке продовжується і сьогодні.

Фруктани поділяють на три групи: фруктани типу інуліна, в яких фруктозильні залишки приєднані один до одного  $\beta$ -(2,1)-зв'язками; фруктани типу левана (флеїна), в яких фруктозильні залишки приєднані один до одного  $\beta$ -(2,6)-зв'язками; фруктани змішаного типу, в яких присутні як  $\beta$ -(2,1)-, так і  $\beta$ -(2,6)-зв'язки [168]. Фруктани солодкі на смак та можуть розчинятися холодній або гарячій у воді. Лідерами з накопичення фруктанів є рослини родини Айстрових (цикорій *Cynhorium intybus*, топінамбур *Helianthus tuberosus* та вже згаданий оман *Inula helenium*) [169], хоча деякі однодольні рослини також накопичують фруктани усіх трьох типів (прикладом слугує пирій лісовий) [170]. Перелічені рослини мають сильно розвинену кореневу систему, у якій і відбувається накопичення запасних сполук [171]. Найбільш вивченим є інулін, який виділяють з георгіна та топінамбура, у бульбах яких ця сполука складає 50% від сирової маси.

Інулін у цих рослин присутній також у колоїдному стані у тканинах стебла, в той час як у листках, які містять сахарозу та крохмаль, інулін відсутній. У зернових злаків, навпаки, листя, як правило, не містять крохмалю, однак у них присутні сахароза та фруктани [172-174].

*Біосинтез та функції фруктанів у рослинах.* Фруктани синтезуються двома специфічними фруктозилтрансферазами і власне синтез проходить у два етапи. На першому етапі з двох молекул сахарози утворюється глюкоза та трисахарид 1-кестоза. Каталізатором цього процесу слугує сахарозо:сахарозо-1-фруктозилтрансфераза (SST). Сахароза є і донором, і акцептором фруктозильних залишків. На наступному етапі біосинтезу фруктанів відбувається реакція між утвореним олігосахаридом, що виконує функцію донора фруктозила, та молекулою сахарози або коротколанцюгового фруктана з 2,1-зв'язками у ролі акцептора. У результаті багаторазового трансфруктозилювання відбувається утворення високомолекулярних фруктанів. Реакцію синтезу фруктанів з 2,6-зв'язками каталізує фермент сахарозо:фруктан-6-фруктозилтрансфераза (SFT). У якості акцепторів цей фермент може використовувати сахарозу, 1-кестозу, 6-кестозу [175].

У клітинах рослин фруктани накопичуються у вакуолях та виконують роль резервного матеріалу (джерело фруктози), осморегулятора та антифризу. Вміст фруктанів доходить до 30% від сухої маси у листі, а в спеціалізованих запасуючих органах (кореневищах, бульбах, цибулинах) може перевищувати 60% [176].

Фруктани беруть участь у адаптації рослин до дії абіотичних стресових факторів завдяки їх високій розчинності у воді, відсутності кристалізації, що пошкоджує мембрани при дії низьких температур, та стабільності біосинтетичних шляхів фруктанів навіть за дії низьких температур.

*Стрес як спосіб підвищення вмісту фруктанів у рослинах.*

Вміст фруктанів у рослинах може змінюватися після дії стресових факторів різного характеру. Зокрема, зниження чи підвищення температури може призводити до активізації синтезу цих сполук. Їх накопичення у періоди пригнічення росту переважно співпадає зі зростанням стійкості до заморожування

та посухи [177]. Існує багато експериментальних даних, які свідчать про те, що фруктани активно накопичуються у різних тканинах за низьких температур та дії інших стресових факторів, що пригнічують ріст рослин [178].

Процес генетичної трансформації є також стресовим чинником для рослин. Перш за все, це пояснюється власне процедурою трансформації, під час якої здійснюється пошкодження рослинної тканини, контакт з патогенним мікроорганізмом, а також перенесення чужорідного гена до геному рослини-реципієнта. Стресовим чинником може стати навіть культивування *in vitro* або синтез рекомбінантного білка [179]. Внаслідок вищеперелічених подій у рослинах можуть змінюватись деякі фізіологічні та біохімічні параметри.

Таким чином, генетична трансформація та дія інших стресових факторів можуть призводити до змін у синтезі запасних сполук, зокрема, його активізації і, таким чином, збільшення накопичення вторинних метаболітів. Ця особливість може бути використана у біотехнології рослин як інструмент інтенсифікації синтезу біологічно активних сполук, зокрема фруктанів.

У рослинах інулін знайдено в листках, але переважна кількість його накопичується в коренях рослин [173]. Нині інулін застосовують у харчовій та фармацевтичній промисловості та отримують із цикорію та топінамбуру. Однак, незважаючи на те, що цикорій є досить продуктивною платформою для виробництва фруктанів, у зв'язку з обмеженнями, пов'язаними зі збором рослин (збір цикорію відбувається восени, коли низька температура індукує деструкцію інуліну у коренях цикорію), вчені досі шукають альтернативні джерела його синтезу. Потенційними кандидатами для продукування інуліну є рослини, яким синтез та накопичення цієї сполуки не є природньо притаманними: цукровий буряк, цукрова тростина і рис, до яких переносять гени синтезу фруктанів. Актуальним залишається і визначення вмісту фруктанів, і, особливо, інуліну у трансгенних коренях рослин — представників родини Asteraceae, до яких належить і полин.

*Біологічна активність фруктанів.* Рослинна сировина, яка багата на фруктани, може слугувати джерелом отримання D-фруктози. Рослинні фруктани

виявляють імуномодулюючу, протипухлинну та протизапальну активність [180-185, 54]. У фармацевтичних цілях запропоновано використовувати, зокрема, фруктани, отримані з рослин агави. Зважаючи на  $\beta$ -конфігурацію C2 в мономерах фруктози, фруктани не гідролізуються ферментами шлунково-кишкового тракту людини і можуть бути використаними мікроорганізмами нормофлори для утворення коротколанцюгових жирних кислот. Це обумовлює їх пребіотичну дію [186].

Фруктани впливають на фізіологічні та біохімічні процеси у клітинах людини та тварин, сприяють підтриманню гомеостазу, зменшують ризик виникнення багатьох захворювань, стимулюють імунну систему [187], пригнічують ріст патогенних бактерій у кишківнику [53], збільшують абсорбцію мінеральних речовин, що позитивно відбивається на профілактиці остеопорозу, а також зменшують ризик виникнення атеросклерозу, пригнічуючи синтез тригліцеридів у печінці. Окрім переліченого, фруктани корегують рівень інсуліну та беруть участь у регуляції метаболізму карбогідратів і ліпідів [182, 189].

Фруктани є антиоксидантами, оскільки здатні відновлювати вільні радикали у клітинах тканин не лише рослинного, але й тваринного походження. Оскільки фруктани здатні проникати у клітинні мембрани, припускається, що вони можуть виконувати свою захисну функцію, попереджуючи перекисне окиснення мембранних ліпідів, перетворюючись при цьому у безпечні фруктан-радикали [190].

Отже, фруктани являють собою фармакологічно цінні вторинні метаболіти, які є корисною дієтичною добавкою при порушеннях вуглеводного обміну, дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях, тощо.

***Артемізинін – сполука з антималярійними властивостями.***

Прикладом природньої сполуки, яка синтезується у «бородатих» коренях, є артемізинін – сесквітерпеновий лактон з антималярійною активністю. Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, протягом 2015 року у світі було зареєстровано 212 мільйонів випадків захворювання на малярію. Однак, з 2010 до 2015 року відмічено зменшення цього показника на 21% у зв'язку з розробкою

дієвих протималярійних препаратів на основі артемізиніну [191]. Вчені не зупиняються на досягнутому і продовжують оптимізувати методи отримання цієї сполуки з антималярійними властивостями, роблячи лікування (artemisinin combination therapy, АСТ) більш доступним для населення.

Артемізинін отримують з рослинної сировини, а також шляхом синтезу артемізинової кислоти (попередника артемізиніну) у генетично модифікованих мікроорганізмах.

*Біотехнологічне виробництво артемізиніну.* Розроблено мікробіологічні системи синтезу артемізиніну, які дозволяють отримувати до 25 мг попередника артемізиніну – артемізинової кислоти – на літр живильного середовища. Для отримання культури трансформованих дріжджів до їх геному перенесли п'ять генів синтезу артемізинової кислоти – гени *CYP71AV1*, *CPR1*, *CYB5*, *ADH1* та *ALDH1* з одночасним інгібуванням гена *GAL80*. Результати цих досліджень було опубліковано в журналі *Nature* у 2013 році [192]. Однак, за допомогою *S. cerevisiae* можна отримувати лише попередник артемізиніна, що потребує подальшого хімічного синтезу кінцевої сполуки. Хімічний синтез артемізиніну з артемізинової кислоти досі є затратним.

Незважаючи на те, що достатньо ефективною системою напівсинтезу артемізиніну є бактеріальна система на основі дріжджів, артемізинін також отримують з рослин *A. annua* [193]. Разом з тим, однією з нагальних проблем є удосконалення методів стимулювання накопичення артемізиніну у рослинному матеріалі як *in vivo*, так і *in vitro*.

*Способи підвищення вмісту артемізиніну у рослинах роду Artemisia.* Було показано, що при генетичній трансформації за допомогою *A. tumefaciens* можна отримати трансформовані рослини *A. annua* з посиленою експресією генів синтезу артемізиніну (табл. 1.1). Так, у 2013 році вчені Шанхайського університету Джао Тонга за допомогою *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації збільшили вміст артемізиніну у трансгенних рослинах в 15 разів у порівнянні з нетрансформованими рослинами, показавши при цьому посилення експресії генів *ADS*, *CYP71AV1* та *CPR* [44].

**Гени, які використовують для генетичної інженерії *A. annua* L., з метою отримання трансгенних рослин та «бородатих» коренів з високим вмістом артемізиніну**

<b>Бактерії, використані для трансформації</b>	<b>Функції генів</b>	<b>Назва генів</b>	<b>Вміст артемізиніну після трансгенезу</b>	<b>Посилання</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain LBA4404	<b>Гени біосинтезу артемізиніну</b>	<i>HMGR</i> (from <i>Catharanthus roseus</i> L.)	0,6 мг/г сухої речовини	[194]
<i>A. tumefaciens</i> strain LBA 4404		<i>HMGR</i>	1.7 мг/г сухої речовини	[195]
<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105		<i>FPS</i>	13 мг/г сухої речовини	[196]
<i>A. tumefaciens</i> strain LBA4404		<i>ADS</i>	Вміст до 3.48 разів вищий, ніж у нетрансформованих рослинах	[197-198]
<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105		<i>CYP71AV1/CPR</i>	0.98 мг/г сухої речовини	[42-43]
<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105,		<i>ADS, CYP71AV1, CPR</i>	15,1 мг/г сухої речовини	[44]



Продовження таблиці 1.1

<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105	Гени, які беруть участь у шляху конкуруючому з біосинтетичним шляхом атемізиніну	<i>SQS</i>	31,4 мг/г сухої речовини	[45]
		<i>CPS</i>	3,56 мг/г сухої речовини	[46]
<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105	Транскрипційні фактори	<i>AaWRKY</i>	24,5 мг/г сухої речовини	[199]
<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105		<i>AaORA</i>	11,9 мг/г сухої речовини	[200]
<i>A. tumefaciens</i> strain GV3101	Агробактеріальні гени	<i>rol B and rol C</i>	Вміст до 9,2 разів вищий, ніж у нетрансформованих рослинах	[201]
<i>A. tumefaciens</i> strain		<i>rol ABC</i>	12.45 мг/г сухої речовини	[202]

LBA4404; <i>A. rhizogenes</i> strains LBA 9402 and 8196				
--	--	--	--	--

За допомогою *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації Zhang et al. отримали трансформовані рослини *A. annua*, які синтезували артемізинін у кількості до 31.4 мг/г сухої маси. У цьому випадку збільшення рівня накопичення артемізиніну було досягнуто за допомогою блокування експресії гена *SQS*, який кодує скваленсинтазу – ключовий фермент біосинтезу стерольних сполук, який перешкоджає синтезу артемізиніну [45].

*Отримання артемізиніну за допомогою культури «бородатих» коренів.* Місцем біосинтезу і накопичення артемізиніну вважають гландулярні трихоми, які розташовані на поверхні листя і суцвіть [203-204]. Було показано, що завдяки індукції стійкості рослин до сольового стресу можна збільшити кількість трихом та, відповідно, підвищити рівень накопичення артемізиніну у надземній частині полину однорічного [205]. Разом з тим, ця сполука може накопичуватися і у коренях рослин.

Вміст артемізиніну у коренях рослин полину визначали лише у поодиноких дослідженнях. Більшість досліджень присвячено визначенню вмісту артемізиніну у трансгенних коренях *A. annua*, які було отримано внаслідок трансформації, та перенесення специфічних генів для посилення синтезу артемізиніну (наприклад, гени транскрипційних факторів) з метою розробки альтернативного способу продукції сполуки [199-200, 206].

Ще у 2001 році було успішно отримано культуру «бородатих» коренів полину однорічного шляхом трансформування листків та черешків. У цих коренях, отриманих за допомогою *A. rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації (штам R1601), артемізинін накопичувався у кількості 9.08 мг/л [207].

Шляхом перенесення гена фарнезилдифосфат синтази (*FDS*) до *A. annua* було отримано лінії трансгенних коренів, які синтезували антималярійну сполуку у кількості, що в 4 рази перевищувала таку у «бородатих» коренях, які не містили ген *FDS* [208].

Але, незважаючи на підвищений інтерес до *A. annua*, поза увагою у контексті вивчення накопичення артемізиніну залишаються культури «бородатих» коренів інших видів, зокрема, культура «бородатих» коренів *A. vulgaris*, якій присвячено лише одну роботу, а також *A. dracuncululus*, робіт з *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації якої досі немає. У зв'язку з цим постає потреба у вивченні інших видів роду *Artemisia* та дослідження впливу генетичної трансформації на синтез та накопичення антималярійних сполук.

**Флавоноїди: функції, синтез та біотехнології отримання.** До природних сполук, синтезованих у «бородатих» коренях, належать флавоноїди, сполуки з антиоксидантними властивостями. Флавоноїди — це група вторинних метаболітів рослин фенольної природи, яка була знайдена у більшості судинних рослинах. У рослинах флавоноїди проявляють широкий спектр біологічної дії: вони беруть участь в окислювально-відновлювальних процесах, виконуючи антиоксидантні функції [209], поглинають ультрафіолетові промені, запобігають руйнуванню хлорофілу, тощо [210, 211]. Флавоноїди проявляють антиоксидантну, протирадикальну активності, запобігають розвитку ішемічної хвороби серця, мають гепатопротекторну, протизапальну та протипухлинну дії, деякі флавоноїди демонструють противірусну активність (наприклад, проти ВІЛ або гепатиту А). Фрукти та овочі є основними дієтичними джерелами флавоноїдів для людей, ці сполуки містяться і у напоях — чаї та вині. Комерційне значення цих сполук пов'язане з використанням флавоноїдів у харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловостях. Звідси випливає необхідність пошуку нових джерел флавоноїдів, а також визначення біологічної активності цих сполук, синтезованих у трансформованих рослинах та коренях.

**Біосинтез флавоноїдів.** Флавоноїди є низькомолекулярними сполуками, їх біосинтетичні шляхи добре досліджені, а гени, які кодують ферменти біосинтезу

флавоноїдів у різних видах рослин, були визначені та клоновані [212]. Ці вторинні метаболіти є похідними фенілпропаноїдів, а останні є продуктами біосинтезу ароматичних амінокислот (фенілаланіну) і циклу Кребса (ацетил КоА). Ключовим ферментом цього шляху біосинтезу є фенілаланін аммоній-ліаза (PAL). Перший етап біосинтезу флавоноїдів включає кон'югацію молекул малоніл-КоА і кумароїл-КоА, у результаті чого утворюються халкони. Ця реакція каталізується за допомогою ферменту халконсинтази (CHS) Халкони перетворюються на флаванони за дії халконізомерази (CHI), ферменти флаванон-3-гідроксилаза (F3H) та флавонолсинтаза (FLS) перетворюють флаванони на флавоноли [213]. Флаванони є попередниками флавоноїдів усіх класів [214]. Флавоноїди мають карбоновий скелет C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> [215] та два бензольних ядра. Структурна відмінність різних флавоноїдів забезпечується кількістю та місцем приєднання гідроксильних груп, а також різним ступенем глікозилування [216]. Серед підкласів флавоноїдів можна виділити такі: флавоноли, ізофлавоноли, флавони, ізофлавони, флаванони, ізофлаванони, флавани, ізофлавани, антоціанідини, аурони та кумарини.

*Біотехнології отримання флавоноїдів.* Для фармацевтичних цілей економічно ефективно виробництво різних видів флавоноїдів є можливим за допомогою біотехнології мікробіологічного синтезу [217]. Флавоноїди отримують у культурах трансгенних дріжджів фенілпропаноїдним шляхом біосинтезу. Було показано успішне перенесення до дріжджів генів *PAL*, *CHH*, *4CL* та *CHS* та їх експресія. Таким чином отримують попередник флавоноїдів – флаванон. Флавони також отримують у дріжджах. Для цього до геному дріжджів додають також гени флавонсинтази I та флавонсинтази II (*FSI*) [218]. Було вивчено можливість отримання кемпферолу та кверцетину з трансгенних *E. coli* [219].

Наразі є декілька альтернативних мікробіологічному синтезу систем для отримання флавоноїдів з рослинного матеріалу *in vitro*: за допомогою суспензійних та калусних культур, а також у культурах органів — коренів або стебел. Так, Agarwal et al. [220] визначили, що у калюсній культурі *Momordica charantia* загальний вміст флавоноїдів може сягати 1.83 мг/г сухої маси) через 6 тижнів культивування. Однак, калюсні культури часто накопичують флавоноїди

у меншій кількості, ніж рослини. Наприклад, загальний вміст флавоноїдів у коренях *Tetrastigma hemsleyanum* складав 31,1 мг/г сухої маси, у той час як листя та калус накопичували флавоноїди у кількості до 13 та 18 мг/г відповідно [221]. Dias et al. (1998) [222] показали наявність лютеоліну та його похідних у калусі *Hypericum perforatum*, однак вміст цієї сполуки, який становив 0,05-0,7 мг/г сухої маси, був значно менший за такий у інтактних рослинах (14-70 мг/г сухої маси). Але, незважаючи на менший вміст цих сполук у калусі, продукування флавоноїдів у клітинних культурах може становити інтерес, оскільки такі культури характеризуються швидким приростом маси.

Культури органів вищих рослин як правило демонструють більш повільний ріст, ніж культури недиференційованих клітин рослин. Тому для продукування флавоноїдів перспективним є використання культури «бородатих» коренів, яка відрізняється швидким ростом [223]. Zhou et al. [224] екстрагували 15 різних флавоноїдів з культури «бородатих» коренів *Scutellaria baicalensis*. Також було показано, що підвищувати вміст флавоноїдів у «бородатих» коренях цієї рослини може еліситація [225]. Так, після еліситації жасмонатами «бородатих» коренів *S. baicalensis* вміст флавоноїдів вогоніну, байкаліну і байкалеїну збільшувався у 2 рази. Зміну складу середовища, додавання еліситорів та біотрансформацію попередників флавоноїдів можна використовувати як інструменти підвищення вмісту флавоноїдів у культурах органів, калюсних та суспензійних культурах [226].

У ряді робіт було показано, що генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* може призводити до підвищеного накопичення сполук вторинного метаболізму. Shkryl et al. [21] показали на калусі *Rubia cordifolia*, що індуктором вторинного метаболізму можуть виступати гени Т-ДНК *A. rhizogenes* — *rolA*, *rolB* та *rolC*. Також, у роботі Kiselev et al. перенесення гена *rolB* за допомогою *A. tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації призводило до посиленого синтезу ресвератролу у клітинах *Vitis amurensis* [227]. Хоча, молекулярний механізм такої стимулюючої дії генів *rol* досі невідомий, генетичну

трансформацію за допомогою *A. rhizogenes* можна використовувати для посилення синтезу цінних вторинних метаболітів, зокрема флавоноїдів.

Інформацію щодо накопичення БАС рослинного походження у «бородатих» коренях різних видів наведено у Таблиці 1.2.

Таблиця 1.2.

**Біологічно активні сполуки рослинного походження, синтезовані у «бородатих» коренях**

<b>Вид рослини</b>	<b>Штам <i>A. rhizogenes</i></b>	<b>Сполука, що синтезувалась</b>	<b>Біологічна активність, використання</b>	<b>Джерело</b>
<i>Athropa belladonna</i> L.	ATCC 15834 <i>A. tumefaciens rolABC</i>	скополамін	антихолінергічна дія, седативний засіб	[228]
<i>Nicotiana tabacum</i> cv <i>Xhanti</i>	A4 HsCYP1B1 or VvROMT	стилбеноїди	антипроліферативна активність	[229]
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal	R1601	вітанолід	антипроліферативна активність	[230]

<i>Daucus carota</i> L.	LBA 9402	фенолокислоти	фунгіцидна, антиоксидантна, антипроліферативна активності	[231]
<i>Продовження таблиці 1.2</i>				
<i>Artemisia</i> <i>annua</i>	ATCC 15834	артемізинін	антималарійна активність	[232]
<i>Artemisia</i> <i>pallens</i>	ATCC 15834	артесунат	антималарійна активність	[233]
<i>Drosera</i> <i>burmanii</i>	ATCC 15834	плюмбагін	антипроліферативна, протимікробна активності, стимулююча дія	[234]
<i>Solanum</i> <i>chrysotrichum</i>	A4	сапоніни	протигрибкова активність	[235]
<i>Hyoscyamus</i> <i>niger</i>	LBA1334	гіоціамін та скополамін	антихолінергічна дія, седативний засіб	[236]

<i>Panax ginseng</i> (L.) C.A. Meyer	A4	гінзенозиди	стимулююча дія	[237]
<i>Papaver somniferum</i> var. album	ATCC 15834, LBA 9402	морфін, кодеїн	спазмолітична, гіпотензивна дія	[238]
<i>Продовження таблиці 1.2</i>				
<i>Cinchona ledgeriana</i>	LBA 9402	хінін, хінідин	антималарійна активність	[239]
<i>Beta vulgaris</i> L.	A4	беталаїн	антиоксидантна, антимікробна, протигрибкова, антипроліферативна, радіопротекторна активності	[240]
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	ATCC 15834	індольні алкалоїди	антипроліферативна активність	[241]
<i>Rauwolfia serpentine</i> (L.) Beth. ex	ATCC 15834	індольні алкалоїди	антипроліферативна, нейропротекторна дія	[242]



Kurz				
<i>Arachis hypogaea</i> L.	ATCC 15834, R1000, EHA105	ресвератрол, птеростилбен та його похідні	антипроліферативна, кардіопротекторна дія	[243]
<i>Продовження таблиці 1.2</i>				
<i>Salvia officinalis</i> L.	ATCC 15834, A4	феноли (розмаринова кислота)	антиоксидантна, імуномодулююча, протизапальна, нейропротекторна дія	[244]
<i>Gossypium spp</i> L.	ATCC 15834	госсипол	антипроліферативна, протівірусна, протигрибкова, антимікробна	[245]

<i>Plumbago indica</i> L	ATCC 15834	плюмбагін	антимікробна, протизапальна дія	[246]
<i>Ginkgo biloba</i> L.	A4	гінзенозиди	стимулююча дія	[247]
<i>Valeriana officinalis</i> (L.)	A13	валер'янові кислоти	цитопротекторна дія	[248]
<i>Продовження таблиці 1.2</i>				
<i>Ocimum basilicum</i> L.	ATCC 15834 A4 ATCC - 11325	розмаринова кислота, тритерпени	антиоксидантна активність	[249]
<i>Hypericum perforatum</i> L.	A4	ксантон	інсектицидна активність, барвник	[251]

**1.4.2. Рекombінантні біологічно активні сполуки.** Культура «бородатих» коренів може слугувати біореактором для накопичення рекомбінантних сполук, оскільки гени білків тваринного чи мікробного походження можна переносити до геному рослин шляхом генетичної трансформації *A. rhizogenes* (табл. 1.3). Задля таких цілей до рослин переносять гени вірусних або бактеріальних антигенів, бактеріальні гени стійкості до антибіотиків, або гени білків, які мають фармакологічну цінність [252, 253].

Синтез рекомбінантних білків є можливим протягом тривалого періоду. Наприклад, стабільну (протягом приблизно 19 місяців) експресію генів моноклональних антитіл мишачого IgG показано у культурі трансгенних коренів *N. tabaccum*, [254] та  $\beta$ -глюкуронідази (GUS) у «бородатих» коренях *Lotus corniculatus* (протягом 5 років) [255]. Окрім тривалого стабільного синтезу, «бородаті» корені також здатні виділяти функціонально активні рекомбінантні білки у живильне середовище [256]. Це досягається шляхом додавання до Т-ДНК агробактерії з геном інтересу сигнальної послідовності, яка направляє продукт трансгена до екскреторних шляхів у «бородатих» коренях, причому виділення рекомбінантних білків з живильного середовища може бути достатньо економічно ефективним.

Woods et al. [257] показали можливість синтезу холінестерази людини у «бородатих» коренях *N. benthamiana* у кількості до 3,3% від кількості загального розчинного білка, що втричі перевищувало кількість холінестерази у трансгенних рослинах цього виду. Kumar et al. [258] отримали трансгенні корені картоплі з геном *HBsAg*, який кодує поверхневий антиген гепатиту В. Цей білок накопичувався у культурі коренів у кількості 97,1 нг/г сирової маси. Одночасно, рослини картоплі, трансформовані *Agrobacterium tumefaciens* з геном *HBsAg*, накопичували ці антигени у п'ять разів менш інтенсивно (19,11 нг/г сирової маси).

Наявні дослідження свідчать про широку варіабельність у кількості та активності рекомбінантних білків у залежності від використаних видів рослин. Тому важливими є дослідження, спрямовані на вивчення можливості синтезу

рекомбінантних білків у рослинних системах та визначення видів рослин, які здатні синтезувати ці сполуки у біологічно активній формі та у значній кількості.

Таблиця 1.3.

**Рекомбінантні біологічно активні сполуки синтезовані у «бородатих»  
коренях**

<b>Вид вихідної рослини</b>	<b>Штам <i>A. rhizogenes</i></b>	<b>Перенесений ген</b>	<b>Сполука, що синтезувалась у БК</b>	<b>Джерело</b>
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATCC15834	<i>EPO</i>	еритропоетин	[259]
<i>Продовження таблиці 1.3</i>				
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATCC15834	<i>MAP30</i>	<i>Momordica charantia</i> pRNA N-глікозидаза MAP30	[260]
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATCC15834 pK7WG2D/thau	<i>THM1</i>	тауматин	[261]
<i>Nicotiana tabacum</i>	A4 TR105 ATCC15834	<i>Вектор</i> <i>pMON 530</i>	моноклональні антитіла	[262]

<i>Solanum tuberosum</i>	ATCC15834	HBsAg	поверхневий антиген вірусу гепатиту В	[263]
<i>Nicotiana benthamiana</i>	R 1000	AChE-R	ацетилхолінестераза людини	[7]
<i>Nicotiana tabacum cv. Xanthi</i>	ATCC 15834	mIL-12	мишачий інтерлейкін-12	[264]
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATCC 15834	hEGF	епідермальний фактор росту людини	[265]
<i>Продовження таблиці 1.3</i>				
<i>Cichorium intybus</i>	A4	esxA:fbpB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ESAT6:Ag85B antigens	[266]
<i>Lactuca sativa</i>	A4, вектор pCB158	esxA:fbpB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ESAT6:Ag85B antigens	[267]

<i>Althaea officinalis</i>	A4, вектор pCB161	<i>ifn-α2b</i>	інтерферон α2b людини	[268]
<i>Artemisia tilesii</i>	A4, вектор pCB161	<i>ifn-α2b</i>	інтерферон α2b людини	[269]
<i>Nicotiana tabacum</i> (cv. <i>Wisconsin</i> )	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	<i>rolABC, SEAP</i>	амбріональна лужна фосфатаза	[270]
<i>Vitis berlandieri</i> <i>V. riparia</i> <i>V. rupestris</i> ), трансформовані <i>A. tumefaciens</i>	ATCC 15834	<i>CP-GCMV</i>	білок оболочки вірусу мозаїки виноградної лози	[272]
<i>Продовження таблиці 1.3</i>				
<i>Heliantus tuberosus</i> L	A4	<i>ifn-α2b</i>	інтерферон α2b людини	[272]
<i>Fragaria 9 ananassa</i> Duch	R1000, k599, A4, and MSU440	<i>BCA</i>	попередник інсуліну	[273]

**Інтерферони – білки з противірусною активністю.** Одним з білків, який привертає увагу вчених у контексті синтезу в культурі «бородатих» коренів, є інтерферон людини. Інтерферони — це група споріднених біологічно активних пептидів, які утворюються в клітинах після стимуляції вірусами, іншими патогенними агентами (бактеріями), а також іноді й речовинами ендogenous походження [274]. Унікальні біологічні функції інтерферонів обумовлюють терапевтичне застосування цих білків при лікуванні тяжких вірусних захворювань, зокрема гепатиту [275]. Крім антивірусної дії, інтерферони гальмують розмноження клітин злякисних пухлин, у зв'язку з чим ці сполуки розглядаються як перспективні антипухлинні засоби [276].

Концентрація інтерферону, яка здатна пригнітити активність різних вірусів в організмі, коливається досить сильно. Найбільш чутливими до дії інтерферону є віруси, що мають зовнішню оболонку і ліпідні компоненти (міксовіруси, арбовіруси, віруси віспи), тоді як пікорнавіруси та аденовіруси позбавлені зовнішньої оболонки, є більш стійкими до даного фактору [277].

У людини знайдено лише по одному гену, що кодують синтез  $\beta$ -,  $\gamma$ - і  $\omega$ -інтерферонів. Відповідно, існує лише один тип кожного з перелічених інтерферонів [278]. В той же час, виявлено 13 генів, які кодують синтез 13 різних підтипів  $\alpha$ -інтерферону [279]. Більшість відомих характеристик для  $\alpha$ -інтерферонів отримано під час вивчення рекомбінантного  $\alpha 2$ -інтерферону. Рекомбінантний  $\alpha 2$ -інтерферон має три підтипи –  $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 2c$  – які відрізняються один від одного за амінокислотним складом на 1-2 амінокислоти [280].

Всередині клітини інтерферони індують синтез протеїнкіназ, які фосфорилують фактори ініціації трансляції eIF-2. Це гальмує біосинтез як вірусних білків, так і всіх білків клітини, в яку потрапив вірус. Зазначений процес призводить до загибелі клітин макроорганізму, і тим самим запобігається розмноження віріонів. Противірусний ефект триває протягом 24-48 годин навіть після повної елімінації інтерферонів з організму [281].

*Технологія продукції рекомбінантних інтерферонів.* Нині у виробництві інтерферону використовується технологія рекомбінантного синтезу, за якого необхідний продукт синтезують у бактеріальних клітинах *E. coli*, що містять гени синтезу інтерферону людини. Щоб створити умови для експресії гена інтерферону в клітинах кишкової палички, його забезпечують регуляторними елементами транскрипції і трансляції [282]. Ця методика була розроблена українськими вченими [283].

Раніше проводились роботи з перенесення генів інтерферону людини в рослинні клітини з метою противірусного захисту рослин [284-285]. Наразі синтез інтерферону у рослинах розглядають як альтернативу синтезу цього білка в бактеріальних системах.

Рослинні рекомбінантні білки характеризуються рядом переваг. До них належать відсутність домішок, що мають алергенну, канцерогенну природу, легкість очищення цільових білків; рослинний процесинг забезпечує глікозилювання білків, що забезпечує їх повноцінне функціонування [286-288]. Окрім цього, рослинну їжу не обов'язково піддавати термічній обробці, що дозволяє зберегти нативну структуру синтезованих білків-вакцин. За допомогою рослинних систем експресії доведено можливість синтезу не тільки інтерферону, але й багатьох інших сполук медичного призначення, зокрема гормони [5-6], ферменти [289], білки імунної системи людини [12-13, 63, 86, 290].

Хоча досі такі трансгенні рослини не набули практичного застосування, однак вже було продемонстровано можливість експресії гена інтерферону в рослинах картоплі, рису, ріпаку, алое, моркви [78, 291-297]. Так, у роботі Xu et al. вміст інтерферону у трансгенних культурах клітин тютюну сягав 0,4-3,5% від загального розчинного білка, при перенесенні гена *IFNa2* за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* штам LBA4404 [298]. Arlen et al. вдалось отримати вміст інтерферону до 20% від загального розчинного білка, або 3 мг/г сирової маси листя за транз'єнтної експресії гена *IFNa2* після біобалістики [299].

Таким чином, доведено можливість синтезу інтерферону у рослинних клітинах. Однак, у більшості публікацій не представлено дані щодо кількості



інтерферону, синтезованого у клітинах трансгенних рослин. Разом з тим, є дані, щодо інтерфероподібної активності екстрактів трансгенних рослин, до яких було перенесено відповідні гени інтерферонів. Так, рослини картоплі, трансформовані за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* штам LBA4404, що несли ген *IFNa2*, проявляли інтерфероподібну активність до 561 МО/г маси проти вірусу везикулярного стоматиту [300], у той час як екстракти трансгенних рослин алое проявляли активність до 953 МО/г маси проти вірусу ЕМС [301].

Попри наявність робіт, у яких було показано можливість синтезу та накопичення інтерферонів, досі триває пошук рослин, в клітинах яких можна отримати найбільш високий рівень синтезу біоактивного білка. Рослини, які природньо багаті на біологічно активні сполуки, є у фокусі уваги. Використання культури «бородатих» коренів може бути вигідним для досягнення цієї мети з огляду на такі характеристики цих коренів як швидкий ріст та невибагливість до умов вирощування.

Отже, для створення культури «бородатих» коренів використовують рослини, які належать до різних родів та родин. «Бородаті» корені індуковані у рослин більш ніж 160 видів, що належать до 31 родини рослинного царства, у тому числі підтверджено отримання культури «бородатих» коренів вже більш ніж у 100 видів лікарських рослин з 26 родин [131]. Ці цифри щорічно зростають у зв'язку з необхідністю пошуку нових джерел біологічно активних речовин, а лікарські рослини є зручними об'єктами для досягнення цієї мети з огляду на притаманну їм природну біологічну активність.

Таким чином, за використання *A. rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації можна отримати культуру «бородатих» коренів рослин роду *Artemisia*. Ці корені характеризуються швидким ростом та здатні до накопичення біологічно активних сполук. Зважаючи на ці особливості «бородатих» коренів, вони можуть бути використані для продукції цінних сполук, у тому числі біологічно активних вторинних метаболітів.

### ***1.5. Рослини роду Artemisia як об'єкт біотехнологічних досліджень***

Рід *Artemisia* є одним з найбільших та найпоширеніших серед родини складноцвітих (Asteraceae). За різними класифікаціями до роду включають 200–500 видів. На території України росте 30 видів роду *Artemisia*, деякі з них є ендемічними [302].

**1.5.1. Біологічні особливості рослин.** Представники роду являють собою багаторічні, дворічні та однорічні трави або невеликі чагарники [303]. Загальними морфологічним особливостями роду полину є чергові листки, дрібні суцвіття, зазвичай гроновидні, волотисті або головчаті, рідко поодинокі; приквітки обгортки розташовані в кілька рядів, квітколоже напівсферичне, без лусочок, а іноді з ворсинками; квіти трубчасті, сім'янки оберненояйцевидні, летючка відсутня, іноді трапляється невелика з плівчастим кільцем [304].

Полин здавна використовується у народній та традиційній медицині. Зокрема, це обумовлено наявністю у хімічному складі рослин ефірних олій, аскорбінової кислоти, флавоноїдів та сесквітерпенових сполук (в тому числі артемізиніну) [31-32]. За відкриття артемізиніну та створення антималярійного засобу на основі останнього у 2015 році була присуджена Нобелівська премія в області фізіології та медицини 84-річній Юю Ту – вченій Китайської академії медичних наук [305].

**1.5.2. Лікувальні властивості.** За результатами досліджень, проведених Всесвітньою організацією охорони здоров'я, близько 80% населення світу покладаються на нетрадиційні лікарські засоби та особливо на ліки рослинного походження. Завдяки глобальній тенденції до підвищення "якості життя" є чимало свідчень щодо зростання попиту на лікарські рослини. Незважаючи на те, що використання рослин для лікування різних хвороб людини і тварин є дуже давньою практикою, лише за останні десятиріччя в наукових колах зросла увага до вивчення рослин як джерел сполук з лікувальними властивостями. Зібрано велику кількість доказів величезного потенціалу лікарських рослин, які використовуються в різних традиційних системах [306].

Рослини роду *Artemisia* не є виключенням. Серед рослин цього роду є чимало потенційних видів, які можуть бути використані в якості терапевтичних агентів.

Завдяки відкриттю артемізиніну в рослинах **однорічного полину** – *A. annua* ця рослина є найбільш дослідженою серед представників роду. Однак наявність артемізиніну – не єдина особливість *A. annua*. Полин однорічний може слугувати джерелом ефірних олій [307] (до 111 кг/га в листі рослини [308]), а також інших біологічно активних речовин: флавоноїдів, дубильних речовин та кумаринів [309-311]. З різних частин рослини було виділено 137 біологічно активних сполук, в тому числі 40 сесквітерпенів, 10 тритерпенів, 7 кумаринів, 46 флавоноїдів та 34 інші сполуки, наразі ідентифіковано більше 600 сполук [312]. Виявлено протиракову активність дигідроартемізиніна з *A. annua* щодо раку молочної залози [313-314] *A. annua* L. занесена до Китайської Фармакопеї [315] і використовується як засіб при різних лихоманках, включаючи малярію [316].

Представники інших видів роду також заслуговують на увагу. **Полин звичайний** – *A. vulgaris* L. – багаторічна рослина, яка росте по усій території України, на луках, узліссях, біля доріг, у садах та серед чагарників [317]. Препарати полину звичайного заспокійливо діють на нервову систему [318], виявляють легку снодійну та потогінну дію, збуджують апетит та регулюють діяльність травного тракту [319]. Рослини *A. vulgaris* багаті на ефірні олії, у їх біохімічній композиції переважають леткі сполуки, серед котрих є гермакрен D (25%), каріофіллен (20%), альфа-цингиберен (15%) та борнеол (11%). У складі ефірних масел з бутонів полину звичайного також було знайдено 1,8-цинеол (32%) та камфору (16%) [320-321]. Досліджено цитотоксичну активність екстрактів *A. vulgaris* проти клітин міелоїдної лейкемії людини HL-60 [322]. Також є повідомлення щодо лаврицидної активності [323] проти *Aedes aegypti*. *A. vulgaris* L. знаходить використання у якості анальгетика, а також проявляє протизапальну, спазмолітичну дію [324].

**Естрагон** – *A. dracuncululus* L. – широко відома багаторічна рослина, яка поширена по всьому світу, і, зокрема, зростає в степовій і лісостеповій зонах

України [325]. Відомі два різновиди *A. dracunculus* (російський та французький [40]), які відрізняються як з ботанічної та фізіологічної точок зору, так і за фітохімічним профілем. Завдяки високому вмісту ефірних олій естрагон використовується у народній медицині, а також у косметології та кулінарії. Естрагон є смаковою приправою, листя рослини використовують для приготування оцту. Легкий анісовий аромат є кулінарною особливістю естрагону [326].

Широкий спектр біологічної активності цієї рослини обумовлений наявністю флавоноїдів, кумаринів, фенілпропаноїдів та терпенів у її складі. Екстракти *A. dracunculus* виявляють антимикробну, протівірусну, протигрибкову і антиоксидантну дію. Все це робить естрагон потенційною фармацевтичною сировиною для лікування запалень [327], гепатиту [328] і бактеріальних інфекцій [329-330]. *A. dracunculus* L. знаходить використання як протидіабетичний засіб і антикоагулянт [331]. Листя *A. dracunculus* накопичують протималярійну сполуку артемізинін до 0,27% від сирої маси [332].

Лікувальні властивості виявлено і у рослин інших видів роду *Artemisia*. Так, *A. absinthium* L. використовується як спазмолітичний, жарознижувальний, кардіостимулюючий та глистогінний засіб [333], а також для поліпшення пам'яті та відновлення психічних функцій [334]. Екстракти з листя цієї рослини можуть проявляти гепатопротекторну дію [335]. *A. africana* здавна використовувалася при лікуванні різних захворювань, таких як кашель, застуди, головні болі, диспепсія, коліки, малярія, діабет, при захворюваннях сечового міхура і нирок, а також використовується як проносний засіб [336]. *A. asiatica* Nakai використовувалася в традиційній східній медицині для лікування раку, при інфекціях, запаленнях і захворюваннях, що викликають утворення виразок [337-338]. *A. douglasiana* Бесс. використовується для лікування передменструального синдрому і дисменореї [339]. *A. judaica* L. — єгипетська лікарська рослина, що використовується при лікуванні шлунково-кишкових розладів [340-341]. У західній частині США *A. tripartita* Ridberg здавна використовується корінними американцями для лікування застуд, ангіни, тонзиліту, головних болів та для загоєння ран [40] [342]

*A. verlotorum* Lamot. використовується в народній медицині Італії, в якості засобу при гіпертонії [343-344]. *A. vestita* є поширеною традиційною лікарською рослиною, яка використовується в Китаї для лікування різних запальних захворювань [345].

**1.5.3 Рослини роду *Artemisia* у культурі *in vitro*.** Серед видів роду *Artemisia* найбільша кількість робіт з уведення в культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження, генетичної трансформації тощо присвячена *A. annua*, *A. absinthium* та *A. cina*. Проте інші представники цього роду, які, незважаючи на розповсюдженість по усій північній півкулі, досі залишаються мало вивченими у культурі *in vitro*. До таких рослин слід віднести полин звичайний – *A. vulgaris* та естрагон – *A. dracunculus*.

Мікроклональне розмноження рослин *in vitro* зазвичай має низку переваг перед вирощуванням рослин у природі. Останні часто ушкоджуються різноманітними грибковими та бактеріальними інфекціями, що робить рослинну сировину непридатною для використання у медичних цілях. Окрім того, такий фактор навколишнього середовища як забруднення токсичними сполуками має вплив на соматичну мінливість [346-347]. При культивуванні рослин *in vitro*, регенерації з меристематичних тканин та з клітин етіологованих гіпокотилів можна уникнути проблем, з якими стикаються при використанні рослин *in vivo*. Метод культивування *in vitro* може бути застосованим при використанні рослин роду *Artemisia* в якості джерела вторинних метаболітів та інших біологічно активних сполук.

З метою підвищення біосинтетичної активності рослин *Artemisia* spp. може бути застосована генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* та *A. tumefaciens*. Переважна більшість досліджень спрямованна на збільшення рівня накопичення артемізиніну або ефірних олій [42-46,348].

З цією ж метою ведуться роботи з оптимізації умов вирощування рослин, зокрема, досліджено вплив культурального середовища на приріст біомаси, а також на накопичення деяких сполук, таких як артемізинін та арглабін.

Наприклад, додавання в середовище цитокініну тидіазурону у концентрації 0.1 мг/л призводить до формування множинних нових пагонів *A. annua* [349] та підвищення вдвічі вмісту артемізиніну у них. Також було показано, що гіббереліни впливають на цвітіння та опосередковано і на синтез артемізиніну у рослин роду *Artemisia* [350]. Окрім того, Weathers et al. [351] показали ефективність використання гіберелової та абсцизової кислот для збільшення біомаси культури трансгенних коренів *A. annua*. Ними також було виявлено підвищення вмісту артемізиніну у трансгенних коренів *A. annua* після додавання 2-ізопентеніладеніну (природний цитокінін) до культурального середовища.

Більшість робіт з дослідження *A. dracuncululus* біотехнологічного спрямування присвячені оптимізації способів мікророзмноження [352], визначенню вмісту сполук медичного призначення [353], у тому числі синтезу артемізиніну [332].

Хоча представники роду *Artemisia* мають у своєму фітохімічному профілі низку біологічно активних речовин, які можуть становити інтерес для фармакологічної, косметичної та харчової промисловостей, *in vitro* культивовані рослини не можуть задовольнити зростаючу потребу у цих сполуках. Так, наприклад, вартість артемізиніну нині становить 180-300\$ за кілограм, у тому числі й через незадовільну кількість цієї речовини, яку можна отримати з одного гектару полину. ВООЗ оцінює, що вартість артемізиніну має бути зменшена майже вдвічі [354]. Перспективною альтернативою для масової продукції БАС, синтезованих у рослинах *Artemisia* spp. є біореактори.

Для вирощування як культури пагонів, так і для культури бородатих коренів полину можна використовувати різноманітні конфігурації біореакторів. Переважно задля цієї мети використовують два типи біореакторів: з рідкою або з газовою фазами. Біореактори рідкої фази складаються зі звичайних ферментерів та барботажних колончатих реакторів. Корені в реакторах такого типу занурені у середовище. В біореакторах газової фази подача культурального середовища здійснюється у вигляді аерозолі, що дозволяє культурі органів мати більший доступ до кисню. В результаті огляду літератури з даної теми, можна зробити

висновок, що серед описаних конфігурацій, біореактори рідкої фази є найоптимальнішими для культивування культури органів цього роду. Це було показано Liu et al. [355], згідно з даними яких приріст маси та кількість артемізиніну станом на 20 добу сягають 26,8 г/л та 536 мг/л відповідно при культивуванні трансгенних коренів *A. annua* у ерліфтному біореакторі (inner-loop airlift bioreactor). Нещодавно Patra та Srivastava [356] показали можливість значного приросту маси *A. annua* (23.02 г/л) та накопиченні артемізиніну до 25.78 мг/л при культивуванні в біореакторі рідкої фази (liquid-phase bioreactor) протягом 5 днів з подальшим культивуванням у біореакторі з туманним зрошенням (nutrient mist bioreactor), що є найвищими показниками накопичення артемізиніну серед опублікованих робіт з культивування у біореакторах газової фази культур трансгенних коренів *A. annua*. Культури трансгенних коренів *A. indica* та *A. dubia* також були культивовані у біореакторах як джерела артемізиніну [357]. Головною метою цього є створення відповідного біореактора для делікатного культивування культур органів *Artemisia*.

Попри широке використання полину у народній медицині, представники цього роду залишаються недостатньо вивченими у культурі *in vitro* та з біотехнологічної точки зору. Тому, генетична трансформація рослин роду *Artemisia* становить як фундаментальний, так і практичний інтерес. Зокрема, це обумовлено тим, що рослини роду *Artemisia* синтезують біологічно активні сполуки. Спектр цих сполук є широким. У рослинах *Artemisia* spp. було ідентифіковано флавоноїди та сесквітерпенові сполуки кумарини, дубильні речовини, аскорбінову кислоту, ефірні олії (каріофіллен, камфора, борнеол), тощо. Рослини *Artemisia* spp. можуть накопичувати артемізинін – сполуку з антималярійними властивостями. Окрім цього, рослини родини Asteraceae, до яких і належить *Artemisia*, відомі своєю здатністю синтезувати та накопичувати фруктозовмісні цукри [358] Останні проявляють протипухлинну [51], пребіотичну, імуномодулюючу [52], гепатопротекторну та протизапальну активності [53-54]. Біотехнологічні методи, зокрема, генетична трансформація представників *Artemisia* spp за допомогою *A. rhizogenes*, можуть бути використані

для підвищення вмісту природних біологічно активних сполук, а також для індукування синтезу рекомбінантних БАС. Культури «бородатих» коренів, які відрізняються швидким ростом та невибагливістю до умов вирощування, є потенційним джерелом сполук з лікувальними властивостями. Попри велику кількість робіт з генетичної трансформації *A. annua*, спрямованої на збільшення вмісту артемізиніну у рослинах, для інших представників *Artemisia* spp. вплив *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації на фізіологічні та біохімічні параметри коренів, та накопичення ними БАС (фруктанів, моносахаридів, флавоноїдів, інуліну, артемізиніну) є малодослідженим. Окрім того, досі не вивчали можливість накопичення рослинами полину рекомбінантних білків медичного призначення, зокрема інтерферонів. Тому, розроблення ефективної методики генетичної трансформації рослин полину, створення культури «бородатих» коренів рослин полину *Artemisia annua* L., *Artemisia vulgaris* L. та *Artemisia dracuncululus* L., та дослідження перспективи її використання у якості джерела біологічно активних сполук (як природних для видів, так і рекомбінантних) заслуговує на увагу, з огляду на широке практичне застосування БАС представників цього роду.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### ***2.1. Вихідний матеріал***

Вихідним матеріалом для досліджень слугувало насіння рослин роду *Artemisia* трьох видів: *Artemisia vulgaris* L., *Artemisia dracuncululus* L. та *Artemisia annua* L. («Benary», Німеччина).

#### ***2.2. Уведення в культуру in vitro***

Рослини вводили в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння. Насіння витримували в 70% етанолі протягом 1 хвилини. Далі спирт відбирали та у ємкість з насінням додавали розчин комерційного препарату «Білизна» (у співвідношенні з дистильованою водою 1:3) та витримували протягом 10 хвилин, після чого промивали тричі по 5 хвилин стерильною дистильованою водою. Після стерилізації насіння переносили на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга [359] зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей (1/2МС). Склад середовища наведено на Таблиці 2.1. Культивування проводили при температурі 24°С та 16-годинному фотоперіоді.

#### ***2.3. Мікроклональне розмноження рослин Artemisia***

Після проростання насіння частини пагонів рослин, що містили принаймні одну бруньку, відокремлювали і переносили на поверхню агаризованого середовища 1/2МС у чашки Петрі. Культивування рослин проводили при температурі 24°С та 16-годинному фотоперіоді.

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

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

<i>Продовження таблиці 2.1</i>	
Біотин	0,050
<i>Джерело вуглецю</i>	
Сахароза	20000,000
<i>Допоміжні компоненти</i>	
Агар	7000,000

#### **2.4. Оптимізація умов вирощування рослин *Artemisia***

Для ініціювання множинного пагоноутворення бічні бруньки пагонів переносили на середовище МС з додаванням бензиламінопурина (БАП) у концентрації 0,5 мг/л та  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентрації 0,05 мг/л.

#### **2.5. Культивування агробактерій для генетичної трансформації**

Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 як дикого типу, так і з векторними конструкціями pCB124 та pCB161, які містили селективний ген *nptII* з регуляторними послідовностями *NOS* промотора і термінатора та цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$  під контролем 35S промотора (pCB124) [360] або коренеспецифічного MII промотора цукрового буряку (pCB161) [361]. Конструкцію векторів представлено на Рисунку 2.1.

Бактерії вирощували протягом 24 годин при температурі 28°C у рідкому середовищі LB [362] на ротаційному шейкері. Культивування дикого штаму *A. rhizogenes* A4 проводилось без антибіотиків, в той час як *A. rhizogenes* з векторними конструкціями pCB124 та pCB161 культивували за додавання карбеніциліну (100 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л). Суспензію нічної культури бактерій використовували для генетичної трансформації досліджуваних рослин.

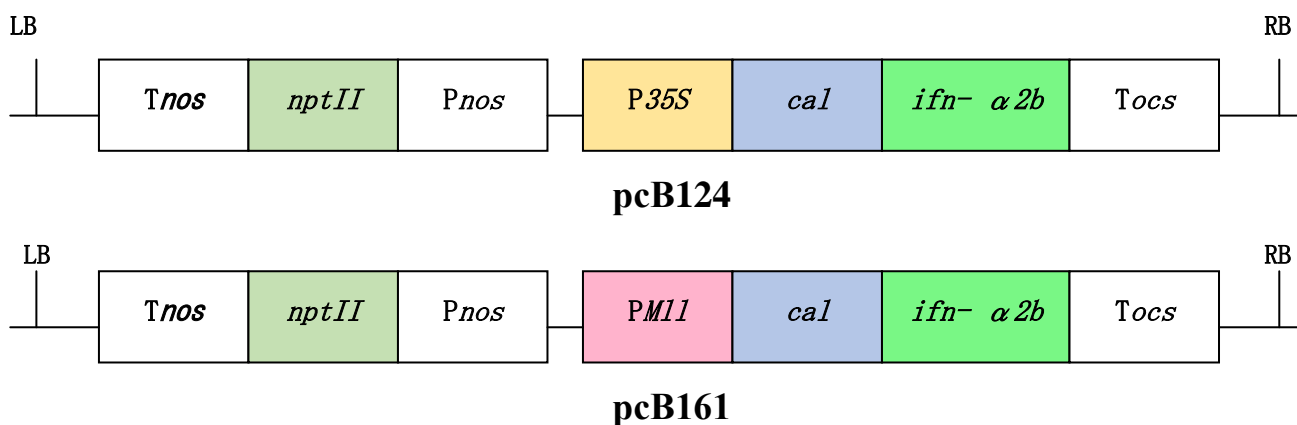


Рис. 2.1. Схеми Т-ДНК векторів pCB124 та pCB161, що були використані для трансформації полину:

LB, RB – ліва і права границі Т-ДНК; *nptII* — ген неоміцин фосфотрансферази 2; P-NOS та T-NOS — промотор і термінатор гена нопалін синтази; *ifn-α2b* – ген інтерферону-α2b людини; *cal* — ген кальретикуліну; P35S — промотор гена 35S-білка з геному вірусу мозаїки цвітної капусти; P-Mll — коренеспецифічного промотор *Mll* цукрового буряку; T-OCS — термінатор гена октопін синтази.

## 2.6. Генетична трасформація з використанням *A. rhizogenes*

Для отримання культур «бородатих» коренів рослин полину використовували суспензію бактерій *A. rhizogenes*. Експлантами для генетичної трансформації слугували гіпокотилі, листки, міжвузля та корені 21-денних проростків *A. vulgaris*, *A. dracuncululus* та *A. annua*. Експланти з попередньо зробленими насічками кокультивували з бактеріальною суспензією протягом 30 хв., далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС (протягом 2-4 діб) та переносили на середовище з цефотаксимом у концентрації 600 мг/л для елімінації агробактерій.

## 2.7. Субкультивування культури «бородатих» коренів *Artemisia*

Корені, які утворювались на експлантах після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, відділяли та вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2МС. Для цього, апікальні частини коренів довжиною 30-40 мм

відділяли, переносили на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі та вирощували при температурі +24°C. Протягом перших 6 місяців культивування корені переносили на середовище з антибіотиком цефотаксимом у концентрації 600 мг/л для повної елімінації агробактерій. Після проведення ПЛР аналізу на відсутність *vir* генів агробактерій культуру коренів культивували на середовищі без антибіотиків.

Час між субкультивуванням варіював від 14 до 21 діб у залежності від виду полину та швидкості росту культури «бородатих» коренів.

## **2.8. Виділення загальної ДНК**

Для виділення ДНК використовували усі лінії коренів, що мали характерний бородатим кореням фенотип (негативний геотропізм, сильне галуження, ріст на середовищі без гормонів). Корені, культивовані протягом трьох місяців на селективному агаризованому середовищі, відділяли від агару, зважували.

Виділення тотальної ДНК з «бородатих» коренів проводили СТАВ-методом [363]. Для цього відбирали наважку досліджуваних зразків та поміщали їх у еппендорфи. Гомогенізацію проводили безпосередньо у пробірках, до матеріалу попередньо додавали 2-кратний СТАВ-буфер та 0,5%-меркаптоетанол. Об'єм суміші складав 5 об'ємів від ваги матеріалу. Гомогенат нагрівали до 56°C. Після цього додавали рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1) та активно перемішували протягом 4 хв. Зразки центрифугували на 14000 об/хв протягом 10 хв та ретельно відбирали верхню фазу розчину. Водну фазу переносили у чисті пробірки, куди додавали СТАВ-буфер для осадження (не містить NaCl). Для формування осаду ДНК-СТАВ зразки залишали на ніч за температури 36°C. Наступного дня зразки центрифугували при 10000 об./хв та відбирали супернатант. До осаду додавали 200 мкл NaCl та підігрівали розчини при 60°C протягом 8 хв. Повторно додавали рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт, перемішували, центрифугували. Відбирали ~160мкл водної фази та додавали 2 об'єми 96%-вого етанолу. Суміш

охолоджували протягом 60 хв при  $-20^{\circ}\text{C}$ , після чого центрифугували при 14000 об./хв 10 хв. Супернатант видаляли, а осад промивали 85%-вим етанолом для видалення залишків СТАВ. Центрифугували, видаляли супернатант. Осад висушували при  $37^{\circ}\text{C}$  10 хв, після чого до виділеної ДНК додавали 40 мкл дистильованої води. Отриману ДНК використовували у подальших молекулярно-біологічних аналізах.

### 2.9. Молекулярно-біологічний аналіз

Наявність трансгенів визначали за допомогою методу ПЛР з використанням набору реактивів «Fermentas» та праймерів, специфічних до генів *ifn- $\alpha$ 2b*, *nptII*, та *rolB*. Щоб переконатися у відсутності агробактеріальної контамінації, «бородаті» корені також аналізували на наявність *virD* гена, який знаходився поза Т-ДНК *Agrobacterium*. Відомості щодо праймерів наведено у Таблиці 2.2

Табл 2.2

**Праймери, використані при ПЛР аналізі «бородатих» коренів полину**

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н.
<i>rolB</i>	5'-atggatcccaaatgctattcctccacga-3' F 5'-ttaggcttcttcttcaggttactgcagc-3' R	780
<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' F 5'-gctctagatccagagtcccgctcagaag-3' R	622
<i>ifn-<math>\alpha</math>2b</i>	5'-ttgatgctcctggcacag- 3' F 5'-ttctgctctgacaacctc-3' R	396

<i>virD</i>	5'-atgtcgcaaggcagtaagccca-3' F 5'-ggagtctttcagcatggagcaa-3' R	432
-------------	--	-----

Ампліфікацію проводили за таких умов: первинна денатурація – 94°C, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (94°C, 30 с – 62°C, 30 с – 72°C, 30 с. Для генів *nptII* та *ifn-α2b* і 94°C, 30 с – 56°C, 30 с – 72°C, 45 с для *rolB*), заключний синтез – 72°C, 3 хв. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5%-вому агарозному гелі у Tris–боратній буферній системі. Негативним контролем слугувала ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем – ДНК відповідного плазмідного вектору. Було використано маркер нуклеотидних послідовностей O`GeneRuler 1kb №1163 («Fermentas», Литва).

### 2.10. Дослідження швидкості росту трансгенних коренів

Швидкість росту трансгенних коренів визначали за приростом маси за 21 добу. Кореневі апекси довжиною 20 мм відокремлювали, зважували у асептичних умовах та культивували на поверхні агаризованого живильного середовища 1/2МС у чашках Петрі при температурі +24°C. Через три тижні корені відділяли від агару фільтрувальним папером, зважували. Приріст маси  $\Delta m$  визначали за формулою 2.1:

$$\Delta m = m_1 - m_0, \quad (2.1)$$

де  $m_1$  – маса коренів через три тижні,  $m_0$  – вихідна маса коренів. У кожному експерименті використовували по 5 корневих апексів. Експерименти проводили у трьох повторностях.

### 2.11. Дослідження впливу регуляторів росту рослин на швидкість росту трансгенних коренів

У експериментах використовували у якості модельного об'єкту трансгенні корені *A. vulgaris*. Апикальні частини коренів довжиною 20 мм з точкою росту

відокремлювали та переносили на поверхню агаризованого живильного середовища 1/2МС, до якого додавали регулятори росту: 0,5 мг/л індоділоцтової кислоти; 0,5 мг/л індоділмасляної кислоти; 0,05 мкл/л Емістиму С та 0,05 мкл/л Стимпо (два останні – регулятори на основі природних компонентів виробництва „Агробіотех”). Корені вирощували при температурі +24°C протягом трьох тижнів.

Для визначення приросту маси отримані корені зважували, приріст маси  $\Delta m$  визначали за формулою 2.1. У якості контролю використовували корені, які культивували на живильному середовищі 1/2МС без додавання регуляторів росту. Експерименти проводили у трьох повторностях.

### ***2.12. Підготування рослинного матеріалу для біохімічних досліджень***

Матеріал, який використовували у ряді біохімічних досліджень, отримували заздалегідь (Рис. 2.2). Для цього рослини та трансгенні корені полину вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2МС протягом 2-4 тижнів залежно від виду рослин. Після цього рослини та «бородаті» корені відділяли від агару, підсушували фільтрувальним папером та висушували на приборі Freezer dryer 4.5 (Labconco) відповідно до інструкції виробника. Після ліофілізації матеріал зберігали у холодильній камері при температурі +4°C у щільно закритих zip-lock пакетах.



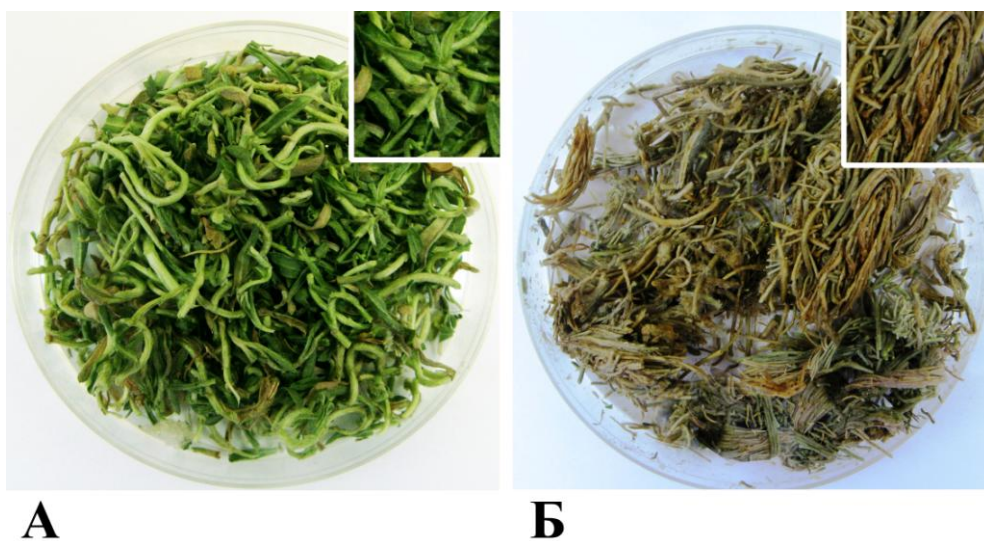


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд ліофілізованого матеріалу на прикладі *A. dracuncululus*, який використовували в подальших біохімічних дослідженнях:

А – пагони, Б – «бородаті» корені.

### **2.13. Визначення вмісту поліфруктанів у трансгенних коренях *Artemisia***

Для дослідження накопичення фруктозовмісних цукрів у трансгенних коренях полину використовували по п'ять ліній коренів кожного виду.

Матеріал попередньо висушували згідно з розділом 2.12, подрібнювали, відбирали наважку та гомогенізували, додаючи дистильовану воду. Співвідношення сухої речовини досліджуваних рослин до об'єму води становило 10 мг на 1 мл води. Екстракти поміщали в еппендорфи та залишали на 30 хв при кімнатній температурі, після чого пробірки витримували при температурі +80°C протягом 20 хв на водяній бані для екстракції. Екстракти двічі освітлювали центрифугуванням при 9000 об/хв протягом 5 хв. Вміст поліфруктанів визначали за методикою, яка базується на здатності кетоцукрів давати червоне забарвлення з резорцином у кислому середовищі [364]. Для аналізу використовували 0.1% спиртовий розчин резорцину, який додавали до пробірок з екстрактами. Зразки витримували при температурі +80°C протягом 10 хв на водяній бані. Виміри

здійснювали у трьох повторностях. Концентрацію фруктанів визначали спектрофотометрично. Оптичну густину зразків вимірювали на спектрофлуориметрі Eppendorf BioPhotometer Plus при довжині хвилі 550нм. Калібрування здійснювали за рочидами фруктози концентрацією 0,62, 1, 25, 2,5 та 5 мг/мл з додаванням резорцину у відповідних кількостях.

#### **2.14. Визначення вмісту цукрів та інуліну**

Зразки готували за методом Albersheim et al. [365]. До наважки подрібнених ліофілізованих коренів або пагонів з листям додавали алдононітрилацетат у співвідношенні 2:1. Отриману суміш запаювали в ампулу та гідролізували на водяній бані впродовж 25 хвилин при 80 °С. Пробу охолоджували та додавали 1мл оцтового ангідриду. трубку закривали, обробляли ультразвуком протягом 1 хв. Суміш знову запаювали в ампулу та нагрівали на водяній бані впродовж 15 хвилин при 80°С. До охолодженої суміші додавали 2 мл 1,2-дихлоретану. Отриману суміш упарювали досуха в декілька етапів, при додаванні HCl та дистильованої води, центрифугували при 5000 об/хв, 20 хв. Супернатант упарювали до повного упарювання розчину. Зразки ресуспендували в 400 мкл розчину етилацетат-гексан (1:1), 0,5 мкл цієї суміші вводили в хроматограф для аналізу.

Аналіз проводили на базі Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України методом газорідинної хроматографії на хроматографі „Chrom-5” (Чехія) з полуменево-іонізаційним детектором. Температурний режим 180-235°С при градієнті температури 3°С/хв, газ-носії гелій, швидкість потоку 20 мл/хв, колонка – скляна, діаметром 3 мм, довжина 120 см, фаза GP 3 % на 100/200 Supelcort (виробник Supelco, США), розчинник — етилацетат.

Ідентифікацію проводили за часом утримання піка речовини на хроматограмі у порівнянні з часом утримання цукрів у стандартній суміші.

### ***2.15. Визначення вмісту артемізиніну в трансгенних коренях Artemisia***

Для визначення вмісту артемізиніну 1 г ліофілізованих коренів або пагонів з листям подрібнювали, додавали етиловий ефір оцтової кислоти у співвідношенні 1/40 та проводили екстрагування протягом 20 хвилин, фільтрували за допомогою вакуумного насосу. Отриманий розчин випарювали на центрифужному ротаційному випаровувачі SpeedVac Savant AES 2010 (Labconco, USA) до повного випарювання розчинника. Утворений осад розчиняли в 2 мл ацетонітрилу.

Хроматографічні дослідження були виконані з використанням обладнання Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, а саме з використанням вискоєфективного рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Розділення проводили в ізократичному режимі з використанням аналітичної колонки Zorbax SB-C18 2,1мм×150мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). В якості рухомої фази використовували суміш H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN (30/20/50 v/v), швидкість потоку через колонку 0,4 мл/хв., температура термостату 30 С. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора в ультрафіолетовому діапазоні на 210, 280 та 216 нм. Ідентифікацію проводили за допомогою стандарту артемізиніну (Sigma-Aldrich, номер у каталозі 63968-64-9), кількісний аналіз проводили методом зовнішньої калібровки.

### ***2.16. Визначення вмісту флавоноїдів в трансгенних коренях Artemisia***

Для визначення вмісту флавоноїдів використовували ліофілізований рослинний матеріал. Корені або пагони з листям подрібнювали, екстракцію здійснювали 70% розчином етанолу протягом 20 годин на ротаційному шейкері при температурі +28°C. До 100 мг зразку додавали 5 мл 70% етанолу.

До 1 мл екстракту додавали 4 мл дистильованої води, 0,3 мл 5% розчину NaNO<sub>2</sub> та залишали на 5 хвилин. До суміші додавали 0,3 мл 10% розчину AlCl<sub>3</sub> та залишали на 5 хвилин. Після цього до отриманого розчину додавали 2 мл NaOH та доводили загальний об'єм суміші до 10 мл.

Концентрацію флавоноїдів визначали спектрофотометрично, інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофлуориметрі при довжині хвилі 510 нм. Концентрацію флавоноїдів визначали за калібрувальною прямою, калібрування здійснювали за розчинами рутину (у концентрації 62,5, 125, 250, 200, 1000 мкг/мл) у 96% етанолі та виражали у мг рутинового еквіваленту на 1 г сухої маси.

### ***2.17. Визначення антиоксидантної активності екстрактів трансгенних коренів Artemisia***

Антиоксидантну активність визначали, використовуючи 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил радикал (DPPH). Для приготування екстрактів рослинний матеріал зважували, гомогенізували з дистильованою водою (у співвідношенні 30 мг на 1 мл води), центрифугували при 10000 g протягом 10 хв при кімнатній температурі. Отриманий супернатант використовували для дослідження. Використовували розчин DPPH у 96% етиловому спирті (концентрація радикалу –  $10^{-4}$  М); реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах.

В кожному лунку планшета додавали 10 мкл розчину радикалу та 190 мкл досліджуваного екстракту. Об'єм екстрактів, що додавався, становив 10 мкл; кінцевий об'єм реакційної суміші в лунці становив 200 мкл. Реакційна суміш витримувалась при кімнатній температурі у темноті протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину суміші при довжині хвилі 550 нм. Крім цього, вимірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації в спирті (без додавання DPPH). У якості позитивного контролю використовували водний розчин аскорбінової кислоти концентрацією 1 мг/мл.

Кількісно відновлення радикалу виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою 2.2:

$$A(k) - A(e) / A(k) \cdot 100, \quad (2.2)$$

де  $A(k)$  – оптична щільність контрольного розчину  $A(e)$  – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту

## **2.18. Визначення противірусної активності екстрактів трансгенних коренів *Artemisia***

Противірусну активність досліджували в екстрактах трансгенних коренів двох видів полину (*Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*). «Бородаті» корені було отримано нами раніше [366-367]. У роботі використовували «бородаті» корені, для яких було показано наявність гена *ifn- $\alpha$ 2b* методом ПЛР.

Для приготування водно-сольових екстрактів використовували фосфатний буфер рН 7,1-7,4. Рослинний матеріал зважували та розтирали на льоді з буфером (у співвідношенні 100 мг матеріалу на 1 мл води). Екстракт освітлювали центрифугуванням протягом 5 хвилин при 10000g при температурі +4°C. Надосадову рідину відбирали, переносили в центрифужні пробірки та центрифугували 15 хвилин при 16000g (+4°C). Інтерфероподібну противірусну активність водно-сольових екстрактів трансгенних коренів визначали мікрометодом за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу везикулярного стоматиту (ВВС, штам Індіана) у перевивній культурі клітин тестикул поросят (ПТП). Противірусну активність розраховували за методом Кербера за зниженням цитопатичної дії ВВС в перевивній культурі клітин тестикул поросят ПТП [368] і виражали у міжнародних одиницях у перерахунку на 1 г маси коренів (МО/г). Як референс-зразок інтерферону- $\alpha$ 2b людини використовували WHO International Standard. Interferon Alpha 2b (Human rDNA derived), (NIBSC, UK).

## **2.19. Статистична обробка результатів**

Всі вимірювання проводили у трьох повторностях. Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу [369]. Діаграми створювали у програмі Microsoft Excel, на яких зображали середнє значення та довірчі інтервали ( $p < 0,05$ ). Для порівняння середніх значень незалежних вибірок застосовували дисперсний аналіз [369] та тест Тьюкі [370]. До даних, виражених в процентах, застосовували логістичне перетворення.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Культивування *Artemisia* spp. *in vitro* та ініціювання культури «бородатих» коренів**

**3.1.1. Уведення рослин *Artemisia* в культуру *in vitro* та мікроклональне розмноження.** Ефективним способом введення рослин в культуру *in vitro* є отримання асептичних проростків з насіння. Одночасно цей етап є важливим і чутливим, оскільки невідповідні концентрації стерилізуючих розчинів мають згубний ефект на клітини ендосперму, що може обмежити ріст і розвиток проростків. Таким чином, для успішної інтродукції рослин в культуру *in vitro* необхідно підібрати концентрацію стерилізуючого розчину та тривалість обробки ним насіння [371].

Згідно з літературними даними, насіння полину не потребує стратифікації. Для стерилізації насіння рослин *Artemisia* spp. можна використовувати різні хімічні сполуки. Так, Kiani et al. та Sujatha et al. для стерилізації *A. annua* та *A. dubia* використовували 0.1% хлорид ртуті ( $\text{HgCl}_2$ ), у якому протягом 2 хв витримували насіння, попередньо оброблене 70% етанолом [55, 202.] Elfahmi et al. витримували насіння *A. annua* у 70% розчині етанолу протягом 2 хв, після чого спирт відбирали, а насіння переносили до 5% розчину гіпохлориду натрія [372]. Lai et al. отримували асептичні проростки *A. halodendron* після 10-хвилинного опромінення насіння ультрафіолетом [373]. Завершальним етапом всіх методик зі стерилізації насіння *Artemisia* з застосуванням хімічних речовин є трьократне відмивання насіння у стерильній воді.

Для отримання асептичних рослин полину ми проводили поверхневу стерилізацію насіння *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracunculoides*. Ефективність поверхневої стерилізації насіння з використанням водного розчину Білизни (1:3) виявилася високою, оскільки за застосованих умов була відсутня бактеріальна контамінація. Схожість насіння залежала від виду та складала до 100% для *A. dracunculoides* і *A. annua*, у той час як енергія

проростання насіння *A. vulgaris* становила лише 10%. Зменшення часу кокультивування насіння з розчином «Білизни» не збільшувало схожість насіння полину звичайного.

Отримані проростки *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracuncululus* зберігали життєздатність та характеризувалися швидким ростом. Розмноження проводили живцюванням у стерильних умовах за методикою, описаною у розділі 2.3. Зовнішній вигляд рослин в умовах *in vitro*, що були отримані шляхом поверхневої стерилізації, наведено на рис. 3.1.

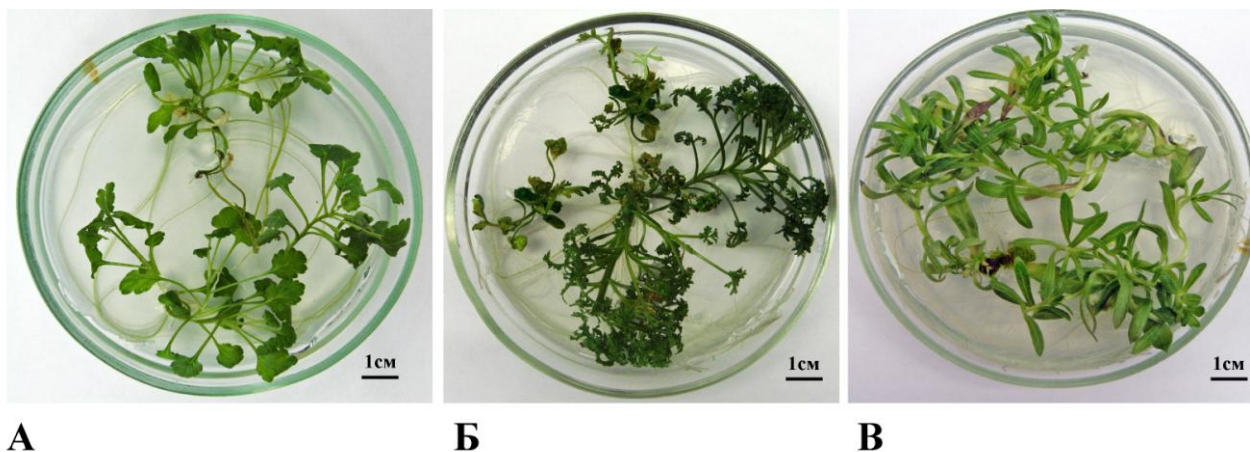


Рис. 3.1. Зовнішній вигляд рослин роду *Artemisia*, культивованих *in vitro* на живильному середовищі Мурасіге-Скуга:

А – *A. vulgaris*, Б – *A. annua*, В – *A. dracuncululus*

Отже, застосована нами методика поверхневої стерилізації насіння може слугувати для введення в асептичну культуру рослин *Artemisia*, є простою у виконанні.

### 3.1.2. Оптимізація умов вирощування рослин *Artemisia*.

Мікроклональне мікророзмноження — це отримання *in vitro* нестатевим шляхом клонів, генетично ідентичних вихідній рослині. В основі методу лежить використання унікальної здатності рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність. Тому з метою розмноження можна використовувати сім'ядольні листки, апікальні меристеми, частини листків, стебел або коренів, гіпокотилі, міжвузля та бічні бруньки. Метод мікроклонального мікророзмноження (мікроклонування) можна використовувати для мультиплікації рослинного

матеріалу. Генотип рослин, тип експланту, склад живильного середовища та умови культивування впливають на ефективність методу [374]. Додавання до живильного середовища регуляторів росту рослин (синтетичних фітогормонів) дозволяє контролювати мікроклонування. Правильно підібрані комбінації та концентрації екзогенних фітогормонів стимулюють морфогенез та процеси регенерації пагонів з експлантів [375].

Отримані нами проростки трьох видів *Artemisia* були використані для вивчення впливу регуляторів росту БАП та НОК на ініціацію формування додаткових пагонів з метою прискореного мікроклонального розмноження рослин.

Нові пагони утворювались на бруньках *A. vulgaris*, *A. dracunculus*, та *A. annua* через 5 днів після їх перенесення на середовище МС з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК. На експлантах, культивованих на безгормональному середовищі МС (контроль), за цей проміжок часу утворювався лише один пагін. На середовищах з додаванням БАП і НОК в залежності від виду рослин кількість новоутворених пагонів варіювала від трьох до дев'яти за 14 діб (Рис. 3.2). Найменшу кількість пагонів утворювали бруньки *A. vulgaris*, в той час як бруньки *A. dracunculus* та *A. annua* були більш чутливими до дії екзогенних регуляторів росту та утворювали в 3 рази більше пагонів у порівнянні з *A. vulgaris* [376].

Пагони, що були утворені на середовищі з додаванням регуляторів росту, мали вкорочені міжвузля порівняно з пагонами, отриманими на безгормональному середовищі. З метою видовження пагонів до живильного середовища додавали 1 мг/л гіберелової кислоти, оскільки відомо, що цей фітогормон стимулює лінійний ріст стебел, активуючи як поділ клітин меристематичних зон, так і їх розтягнення [377].

Згідно з даними літератури для мікроклонування рослин роду *Artemisia* використовують листя [378-379], стебла та апікальні бруньки. Стимулюючий ефект БАП у комбінації з НОК на формування пагонів було виявлено при розмноженні декількох видів роду *Artemisia*: *A. tscherneviana* Bosser, *A. alba* Turra [379], *A. absinthium* [380], *A. annua* [381]. Для прямого морфогенезу полину також



використовують комбінацію БАП/НОК/Кін у різних концентраціях [379]. Зокрема, Liu et al. продемонстрували можливість прискорення пагоноутворення *A. judaica* при додаванні 1 мкмоль/л індолілмасляної кислоти у живильне середовище та збільшенні об'єму посуду для культивування зі 100 мл до 500 мл [341]. Також, Dangash et al. повідомляли про необхідність додавання до живильного середовища амінокислот глютаміну, аргініну, аспарагіну та цистину для пагоноутворення *A. annua* [381]. У нашому експерименті формування пагонів *A. annua* відбувалось з високою ефективністю на живильному середовищі МС, що містило 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК і за відсутності амінокислот.

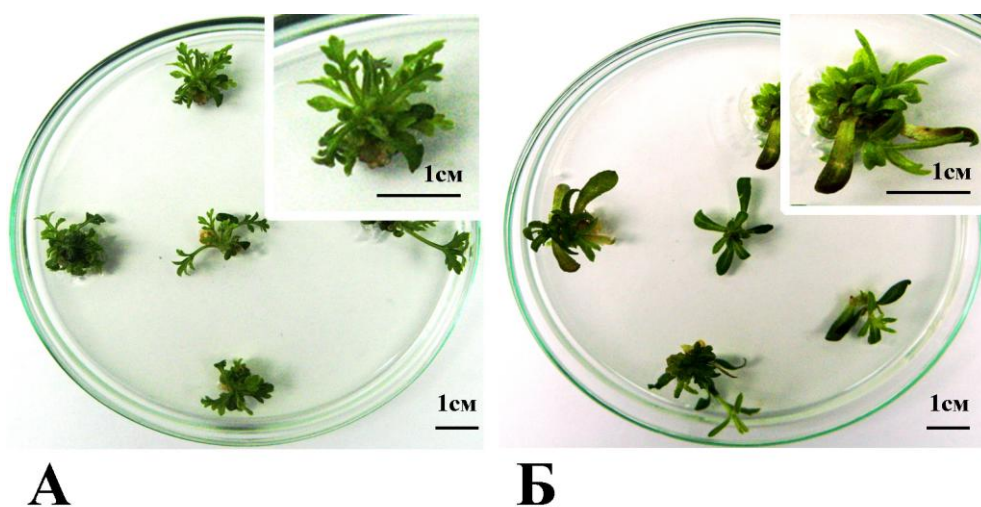


Рис 3.2. Зовнішній вигляд множинного формування пагонів з бруньок *A. annua* (А) та *A. dracunculoides* (Б) через 14 діб культивування на середовищі, що містить 0,5 мг/л БАП та 0,05 мг/л НОК.

Таким чином, у результаті наших експериментів було встановлено, що використання регуляторів росту БАП і НОК в концентрації 0,5 мг/л і 0,05 мг/л відповідно прискорює формування нових пагонів *A. annua*, *A. dracunculoides* та *A. vulgaris*. Нові пагони утворювались за умов використання лише двох регуляторів росту, без додаткового додавання до живильного середовища амінокислот. Для збільшення довжини міжвузлів отриманих пагонів *Artemisia* було ефективним додавання гіберелової кислоти у концентрації 1 мг/л живильного середовища МС.

### 3.1.3. Генетична трансформація рослин *Artemisia* spp.

Використання *A. rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації дозволяє отримати культуру «бородатих» коренів. Такі корені здатні до ізольованого росту на безгормональному середовищі і є перспективним джерелом біологічно активних сполук [131]. Культура «бородатих» коренів має ряд переваг у порівнянні з суспензійною культурою. Їй притаманні генетична стабільність, вона дозволяє масове культивування в контрольованих умовах біореакторів при відносно невеликій кількості початкового рослинного матеріалу, є економічно вигідною у зв'язку з відсутністю необхідності використання додаткових регуляторів росту, простотою культивування, великим виходом біомаси, можливістю культивування без освітлення, додаткового обігріву та цінних сполук у складі живильного середовища [16,130]. Крім того, вирощування «бородатих» коренів в біореакторах є екологічно безпечним і не суперечить правилам біобезпеки. Перелічені особливості такої культури роблять її потенційною системою для продукції ряду речовин, особливо якщо такі корені здатні синтезувати комплекс біологічно активних сполук.

У роботі ми проводили генетичну трансформацію *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracuncululus* за методикою, описанною у розділі 2.6, з метою отримання культури «бородатих» коренів. Для цього листки рослин кокультивували з суспензією *A. rhizogenes*, далі експланти вирощували на середовищі без антибіотиків, після чого їх переносили на середовище з цефотаксимом. У подальшому проводили субкультивування отриманих коренів.

У результаті експериментів встановлено можливість отримання культури «бородатих» коренів рослин *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracuncululus* за допомогою запропонованого способу (Табл. 3.1). Початок формування коренів на листових експлантах спостерігали вже через 5-7 діб після трансформації. Слід відзначити, що корені на експлантах *A. vulgaris* з'являлися раніше (через 5-7 діб), ніж на експлантах двох інших видів *A. annua* та *A. dracuncululus* (через 7-10 та 7-20 діб відповідно).

**Результати *A.rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації  
полину**

Вид полину	Експлант	Кількість діб на середовищі без додавання цефотаксиму	Час, через який з'являються корені (кількість діб після кокультивування с суспензією бактерій)	Частота трансформації, %
<i>A. vulgaris</i>	Листки	2 доби	5-7 діб	100
	Гіпокотилі			100
<i>A. dracuncululus</i>	Листки	4 доби	7-10 діб	20
<i>A. annua</i>	Листки	2 доби	10-20 діб	20
	Гіпокотилі			10

Частота трансформації (кількість експлантів, на яких формувалися корені) становила 10 - 100% та залежала від використаного штаму бактерій, виду рослин та типу експланту (Табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.2

**Частота формування коренів на листових експлантах рослин роду *Artemisia***

№	Вид рослин	Максимальна частота коренеутворення (%) після трансформації:		
		<i>A. rhizogenes</i> A4	<i>A. rhizogenes</i> A4-pCB124	<i>A. rhizogenes</i> A4-pCB161
1	<i>A. annua</i>	20	20	10
2	<i>A. vulgaris</i>	100	20	100
3	<i>A. dracuncululus</i>	20	0	0

**Генетична трансформація *Artemisia vulgaris* L.** Ріст коренів на на листових та гіпокотильних експлантах *A. vulgaris* починався через 5-7 діб після кокультування з агробактеріями як дикого штаму, так і тими, що містили векторні конструкції pCB161 або pCB124 (Рис. 3.3). Корені відрізнялися високою швидкістю росту на середовищі без додавання регуляторів росту рослин, значно галузились, не вросли у середовище та не мали позитивного геотропізму.

Частота коренеутворення на листових експлантах та гіпокотиліях полину звичайного сягала 100%, в той час як при використанні коренів та міжвузлів у якості експлантів трансгенні «бородаті» корені отримати не вдалося. Отже, різні типи експлантів, а саме листя, корені, міжвузля та гіпокотилі, відрізнялись за здатністю формувати «бородаті» корені, а результати наших досліджень свідчать про те, що гіпокотилі і листки є найкращим типом експлантів для отримання трансформованих коренів *A. vulgaris* [382].

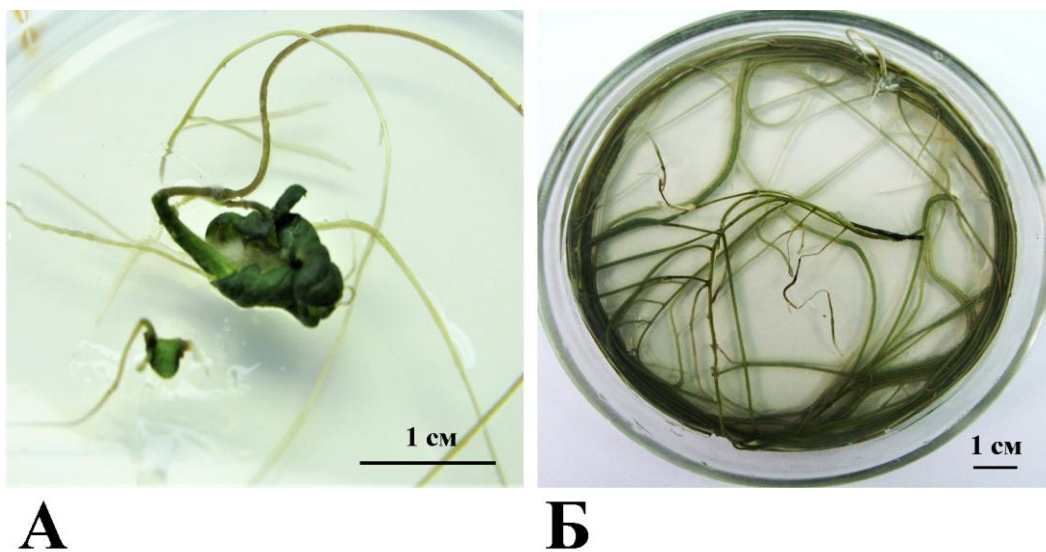


Рис 3.3. Ініціація росту коренів на листових експлантах *A. vulgaris* (А) та культура «бородатих» коренів (Б) *in vitro*

*A. vulgaris* досі залишається маловивченим у культурі *in vitro*, незважаючи на його розповсюдженість по всій північній півкулі. Нині є лише декілька публікацій з уведення рослин *A. vulgaris* в асептичну культуру і лише одна робота з генетичної трансформації полину звичайного.

У 2013 році опубліковано роботу Sujatha et al. [55], присвячену *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованій генетичній трансформації *A. vulgaris*. Було порівняно частоту трансформації *A. vulgaris* за використання чотирьох штамів *Agrobacterium*: A4GUS, R1000, R1601 та ATCC15834, а також трьох типів експлантів: апексу, листя та міжвузля. Дикий штам A4 GUS виявився найбільш вірулентним, ніж інші штами. В результаті генетичної трансформації Sujatha et al. вдалось отримати культуру бородатих коренів з листкових експлантів з високою частотою — 92,6%, однак корені на експлантах з'являлись на 14-й день після кокультивування з агробактерією, що вдвічі довше, ніж у наших експериментах (Табл 3.1). Скоріше за все, така різниця може бути пояснена різницею у генотипі вихідних рослин.

**Генетична трансформація *A. dracunculus* L.** Частота утворення «бородатих» коренів при використанні листків *A. dracunculus* сягала 20%. Відомо, що частота трансформації зазвичай залежить від штаму *Agrobacterium*, видової приналежності рослин та типу експлантів [55], але, оскільки наша робота є першою роботою з генетичної трансформації естрагону, отримані нами дані [383-384] не можуть бути зіп'явставлені з отриманими раніше.

Слід зазначити, що при використанні гіпокотилів, коренів та міжвузлів у якості експлантів трансгенні корені отримати не вдалося. Змінення часу культивування цих експлантів з бактеріальною суспензією не впливала на частоту трансформації цих експлантів. Протягом двох тижнів експланти темнішали та втрачали здатність до росту, що вказує на їхню непридатність для проведення *A. rhizogenes* генетичної трансформації.

За результатами наших досліджень час кокультивування експлантів з суспензією *Agrobacterium* є ключовим фактором для генетичної трансформації естрагону. Оптимальний час культивування експлантів на середовищі без цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій, становив 4 дні. Збільшення цього терміну призводило до загибелі експлантів, в той час як скорочення часу кокультивування не призводило до появи «бородатих» коренів.

Корені утворювались на листових експлантах на 7-й день після кокультивування з бактеріальною суспензією (Рис 3.4). Трансгенні корені *A. dracunculoides* було отримано лише за допомогою дикого штаму *Agrobacterium A4*.

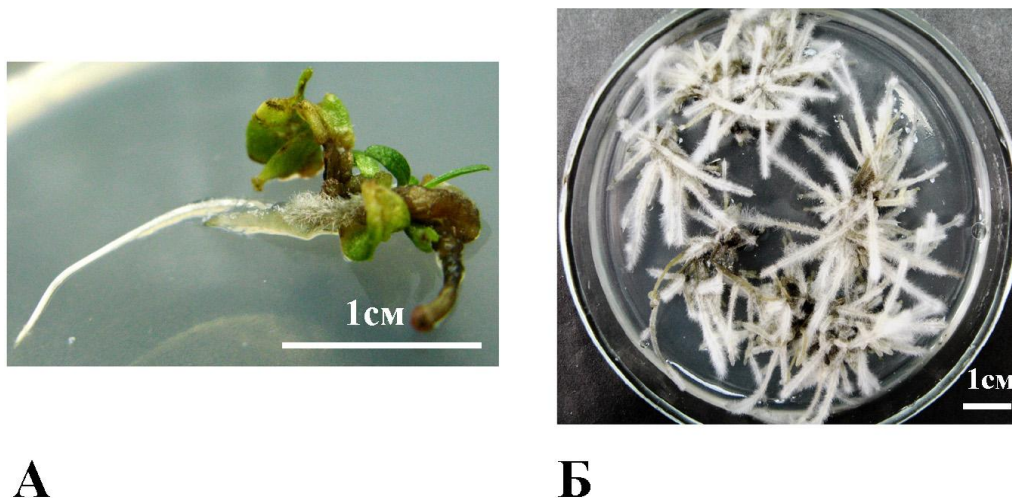


Рис 3.4. – Ініціація росту коренів на листових експлантах *A. dracunculoides*: (А) та культура «бородатих» коренів (Б) *in vitro*

Наші дослідження є першими стосовно *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації полину естрагону [385]. Однак розробка біотехнологічних підходів, зокрема генетичної трансформації, для удосконалення біологічних властивостей цих рослин становить інтерес. Це пояснюється тим, що, завдяки високому вмісту ефірних олій естрагон є смаковою приправою, використовується у народній медицині, а також у косметології та кулінарії. Згідно з літературними джерелами [327-330, 386], біологічна активність цієї рослини обумовлена наявністю флавоноїдів, кумаринів, фенілпропаноїдів та терпенів у її складі. Екстракти *A. dracunculoides* виявляють антимікробну, протигрибкову і антиоксидантну дію. Такі властивості естрагону роблять його потенційною фармацевтичною сировиною, а культура «бородатих» коренів, отримана з цих рослин, може бути джерелом біологічно активних сполук. З огляду на це, актуальним є створення біотехнологічних коренів естрагону та їх вивчення.

**Генетична трансформація *Artemisia annua* L.** Трансгенні корені полину однорічного *A. annua* було отримано при використанні листових

експлантів та гіпокотилів на десяту добу після кокультування з агробактерією (рис.3.5).

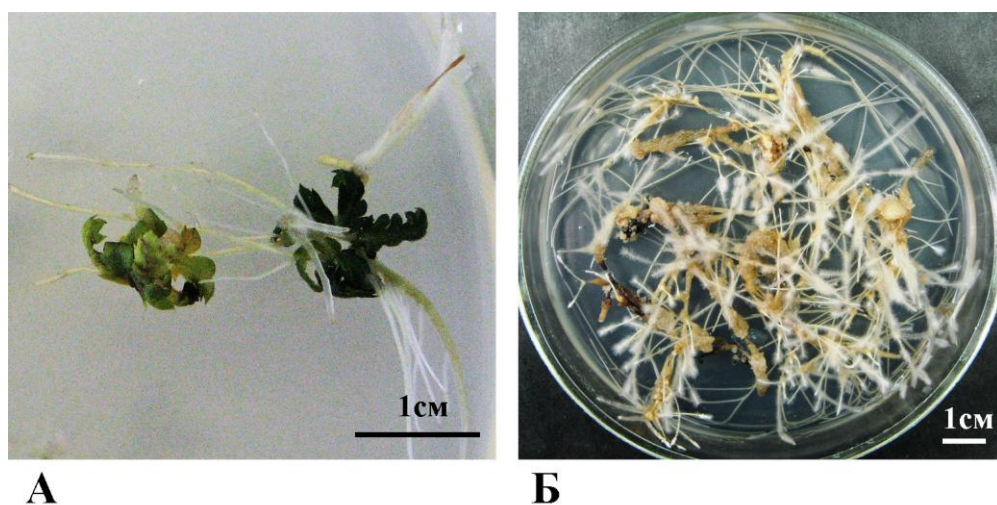


Рис 3.5 – Ініціація росту коренів на листкових експлантах *A. annua* (А) та культура «бородатих» коренів (Б)

При використанні коренів та міжвузля у якості експлантів трансгенні корені отримати не вдалося. Частота трансформації *A.annua* складала лише 10-20%, залежала від використаної бактерії (10% для бактерій з вектором pCB161, а також 20% для бактерій дикого штаму А4 та з вектором pCB124) та не залежала від типу експланта [367].

Більшість публікацій з генетичної трансформації *A.annua* присвячені *A. tumefaciens*-опосередкованій трансформації [372, 387-388]. У наявних роботах з *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації полину однорічного частота трансформації коливається у широких межах: 10-98% [389]. Така різниця у частоті трансформації може бути пояснена використанням різних штамів агробактерій [19], типів експлантів [390], відмінностями у протоколах проведення генетичної трансформації, таких як концентрація бактеріальної суспензії та час кокультування експлантів з *Agrobacterium* [391]. Додавання екзогенних регуляторів росту [392.] та рН живильного середовища [393] також можуть впливати на індукцію росту трансгенних коренів.

Найбільший вплив на частоту коренеутворення після генетичної трансформації *A. annua* чинить обраний штам агробактерій. В дослідженнях з генетичної трансформації *A. annua* найчастіше використовують штами LBA 9402, R1000, R1601, ATCC15834, MSU440, A13, NCIM 5140. У роботі Youyou Tu et al. [394] найбільш ефективним індуктором коренеутворення на експлантах *A. annua* був штам ATCC15834. Після кокультивування листкових експлантів з бактеріальною суспензією штаму A4, який ми використовували у роботі, раніше [19] було повідомлено про утворення «бородатих» коренів з частотою до 75% через 15-20 діб після проведення генетичної трансформації. Додавання ацетосерингону майже вдвічі скорочувало час коренеутворення (до 8-10 діб). У іншій роботі [395] при використанні цього ж штаму було повідомлено про частоту трансформації 49% через 4 доби після проведення генетичної трансформації стеблових експлантів.

У більшості робіт з генетичної трансформації *A. annua* листя є найбільш сприйнятливим до трансформації експлантом. Ймовірно, це зумовлено їх високою регенераційною здатністю та зручним розміром для проведення маніпуляцій [396]. Однак, чутливість до агробактерій та здатність до коренеутворення залежить від генотипу і може відрізнитись навіть серед різновидів одного виду [394].

**3.1.4. Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів *Artemisia*.** Для підтвердження перенесення бактеріальних генів до рослин полину використовували метод ПЛР.

Першим етапом було визначення відсутності бактеріальної контамінації (за відсутністю *virD* гена агробактерій, рис. 3.6). Виявилось, що у деяких лініях на перших етапах культивування (1-2 місяці після трансформації) детектували наявність вказаного гена (трек №2). Це пов'язано з тим, що для повної елімінації бактерій потрібно більше часу. Отримані результати виявили необхідність подальшого субкультивування коренів цієї лінії на живильному середовищі з цефотаксимом.



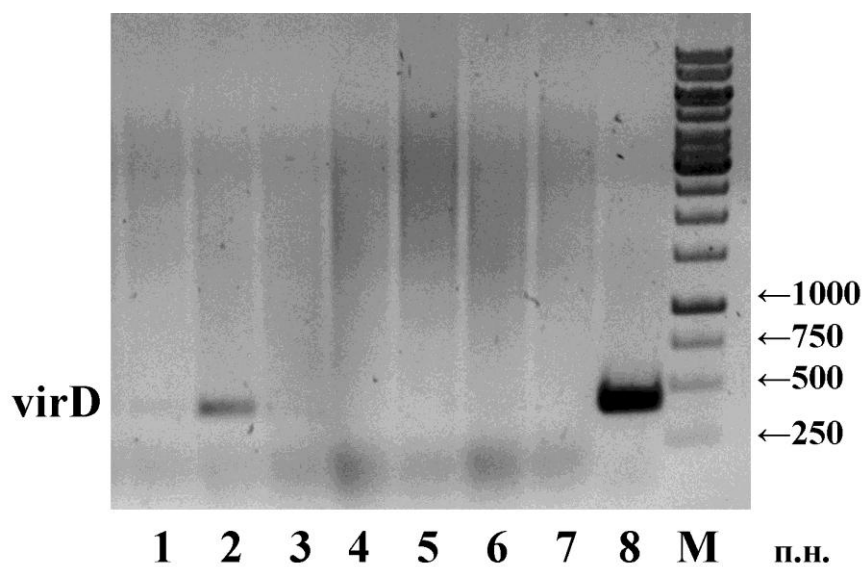


Рис.3.6. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу відсутності генів *virD* агробактерій: треки 1 – 6 – ДНК коренів, отриманих після трансформації, 7 – ДНК контрольної рослини, 8 – позитивний контроль, ДНК агробактерій, 9 – маркер O'Gene Ruler™ #1136.

Показано, що усі аналізовані лінії коренів *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracuncululus*, отримані після трансформації диким штамом агробактерій, мали *rolB* ген (рис. 3.7).

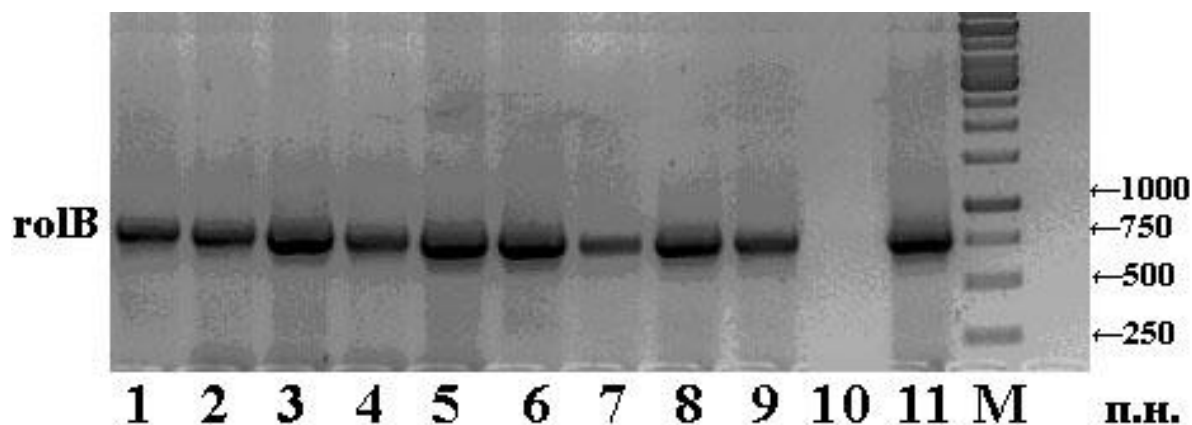


Рис.3.7. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *rolB* у трансгенних коренях полину, трансформованих диким штамом *A. rhizogenes* A4; треки 1-9 – ДНК бородатих коренів, 10 – ДНК контрольних нетрансформованих рослин; 11 – позитивний контроль, плазмідна ДНК; М – маркер O'Gene Ruler™ #1136.

Корені *A. vulgaris* та *A. annua*, трансформовані *A. rhizogenes* з вектором pCB161 або pCB124, несли як агробактеріальний ген *rolB*, так і плазмідний ген *ifn- $\alpha$ 2b* та *nptII* (рис. 3.8).

Таким чином, проведені молекулярно-біологічні аналізи підтвердили наявність гена *rolB* у коренях, одержаних за допомогою агробактерій дикого штаму A4, та генів *ifn- $\alpha$ 2b* і *nptII* у коренях, отриманих за використанням агробактерій, що несли вектори pCB161 або pCB124, і, відповідно, факт трансформації.

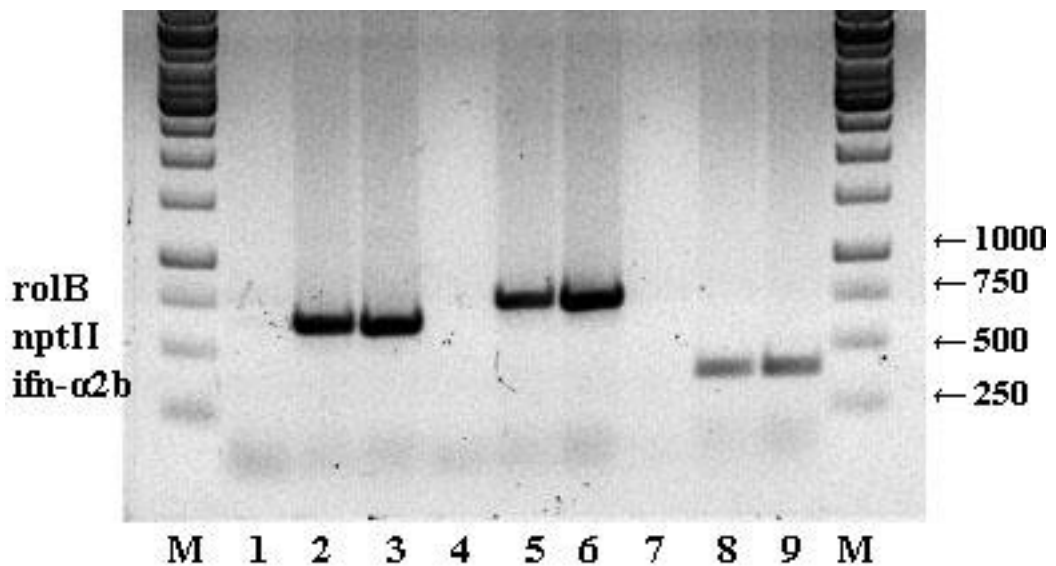


Рис.3.8. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *nptII* (1-3), *rolB* (4-6) та *ifn- $\alpha$ 2b* (7-9) у трансгенних коренях полину, отриманих з використанням *A. rhizogenes* з вектором pCB161: треки 1, 4 та 7 – ДНК контрольних нетрансформованих рослин; треки 2, 3, 5, 6, 8, 9 – ДНК трансгенних коренів; М – маркер O'Gene Ruler™ #1136.

Отже, результати наших досліджень показали, що при генетичній трансформації *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. dracunculoides* доцільно використовувати саме листки або гіпокотилі (*A. vulgaris* та *A. annua*) 21-денних проростків у якості експлантів для отримання «бородатих» коренів.

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

У наших дослідженнях за описаних умов трансформації та використання оптимального типу експланту (листки) було отримано «бородаті» корені полину з частотою 10-100% в залежності від використаної бактерії та видової приналежності експланту. Низька частота генетичної трансформації *A. annua* та *A. dracunculus* може бути обумовлена фізіологічними особливостями цих видів, а саме наявністю протимікробної активності у рослин та, відповідно, зменшення чутливості до ураження агробактеріями. Перенесення *rolB* гену агробактерій було підтверджено результатами ПЛР-аналізу для усіх «бородатих» коренів. Також за результатами ПЛР було підтверджено наявність гену *ifn- $\alpha$ 2b* у коренях, що були отримані після трансформації *A. rhizogenes* A4 з векторами pCB124 та pCB161.

Результати, подані у цьому розділі, опубліковані у таких працях:

1. **Дробот К.О.** Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини / **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, Н.А. Матвеева // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2015 – Т.17. – С.145-147.
2. **Дробот Е.А.** *In vitro* растения рода *Artemisia* как продуценты биологически активных соединений / **Е.А. Дробот**, Н.А. Матвеева // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2015. – № 1 – P.127-130.

3. Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) “hairy” root culture production / **K.O. Drobot**, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // *Biotechnologia acta.* – 2016. – Vol.9, №2. – P. 55-60.
4. **Drobot K.O.** Transgenic *Artemisia dracunculus* L. “hairy” root culture construction / **K.O. Drobot**, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Тези доповідей Міжнародної наукової конференція «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології», 11-13 жовтня, 2015 р. – Львів, 2015. – С. 110.

### 3.2. Дослідження впливу генетичної трансформації на морфо-фізіологічні параметри «бородатих» коренів

**3.2.1 Фенотипові особливості отриманих ліній трансгенних коренів *Artemisia*.** Отримані лінії «бородатих» коренів мали характерний фенотип: високу ступінь галуження, негативний геотропізм. Окрім того, такі корені були здатні до росту на середовищі без додавання екзогенних регуляторів росту рослин. Було відзначено морфологічні відмінності серед різних трансгенних ліній одного виду. Вони відрізнялися за кольором, ступенем обводнення, товщиною коренів та ступенем галуження (Рис. 3.9).

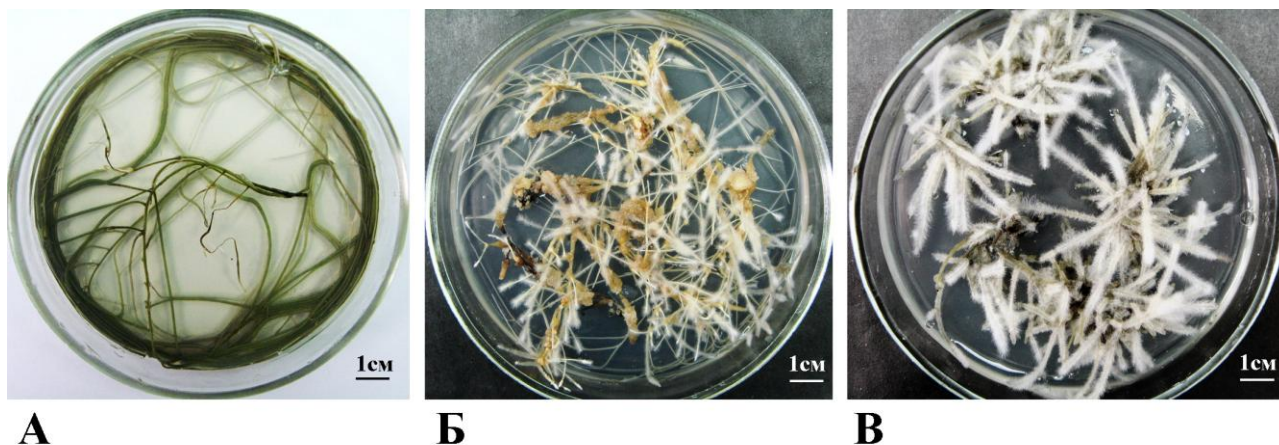


Рис. 3.9. Зовнішній вигляд культивованих *in vitro* «бородатих» коренів полину:

А – *A. vulgaris*, Б – *A. annua*, В – *A. dracunculoides*.

«Бородаті» корені *A. vulgaris* переважно мали темнозелений колір, в той час як трансгенні корені *A. annua* та *A. dracunculoides* були безбарвними або світло-коричневими. Трансгенні корені *A. vulgaris* були довгими та незначно галузились, не мали значно вираженого негативного геотропізму. На відміну від них, трансгенні корені *A. annua* були сильно розгалужені, потовщені та більш ламкі, вірогідно, через більш високий ступінь обводнення, а також менше вросли у середовище. Трансгенні корені *A. dracunculoides* були коротшими за корені *A. vulgaris*, відрізнялись ламкістю і значно вираженим негативним геотропізмом.

**3.2.2 Порівняння швидкості росту отриманих ліній трансгенних коренів *Artemisia*.** Отримані лінії «бородатих» коренів рослин мали специфічні риси. Зокрема, трансгенні лінії коренів відрізнялися за швидкістю росту (Рис. 3.10). Швидкість росту «бородатих» коренів слід урахувати для того, щоб оцінити цінність культури трансгенних коренів та відібрати найбільш продуктивні лінії. Швидкий приріст біомаси може дозволити отримати більшу кількість БАС.

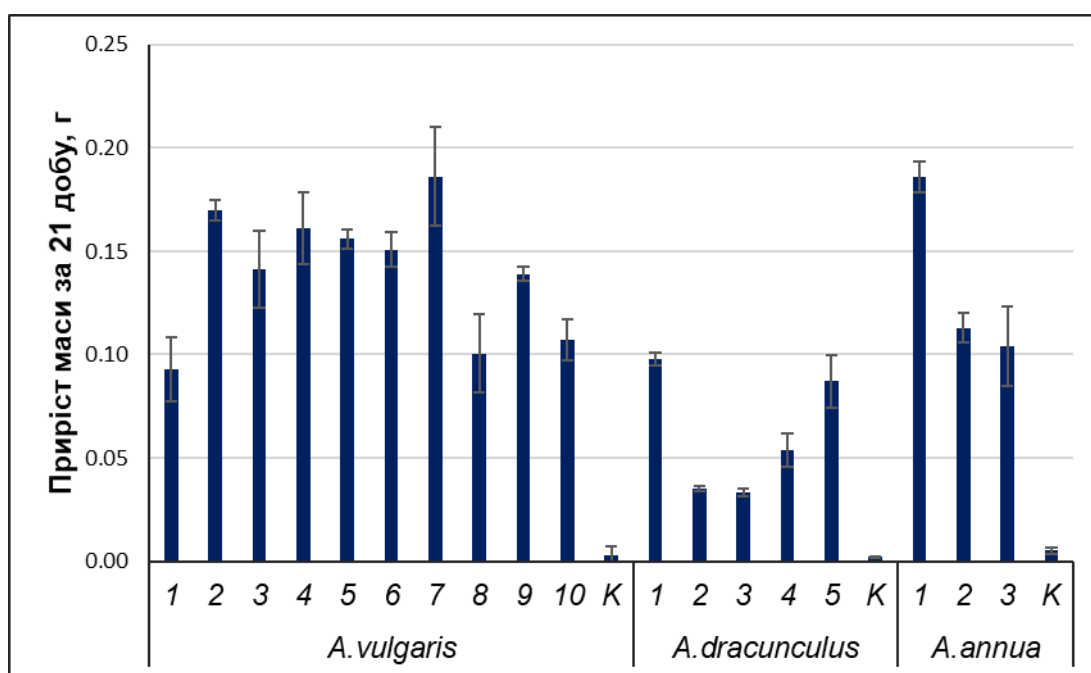


Рис. 3.10. Приріст маси коренів *Artemisia*:

К – корені нетрансформованих рослин; 1-10 – лінії «бородатих» коренів полину

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

видно з наведеної діаграми (рис.3.10), корені ліній №1 та №8 удвічі повільніше накопичували масу, ніж корені лінії №7.

Аналогічний результат було отримано і при вирощуванні різних ліній коренів *A. dracunculus* та *A. annua* (рис. 3.11). Середній приріст маси коренів *A. annua* варіював у межах  $0,104 \pm 0,019$  –  $0,186 \pm 0,007$  г, а для коренів *A. dracunculus* —  $0,033 \pm 0,001$  –  $0,098 \pm 0,003$  г. Така варіабельність за досліджуваним параметром дозволила вибрати саме ті лінії, які характеризуються швидким ростом та накопиченням біомаси [367, 382-383].

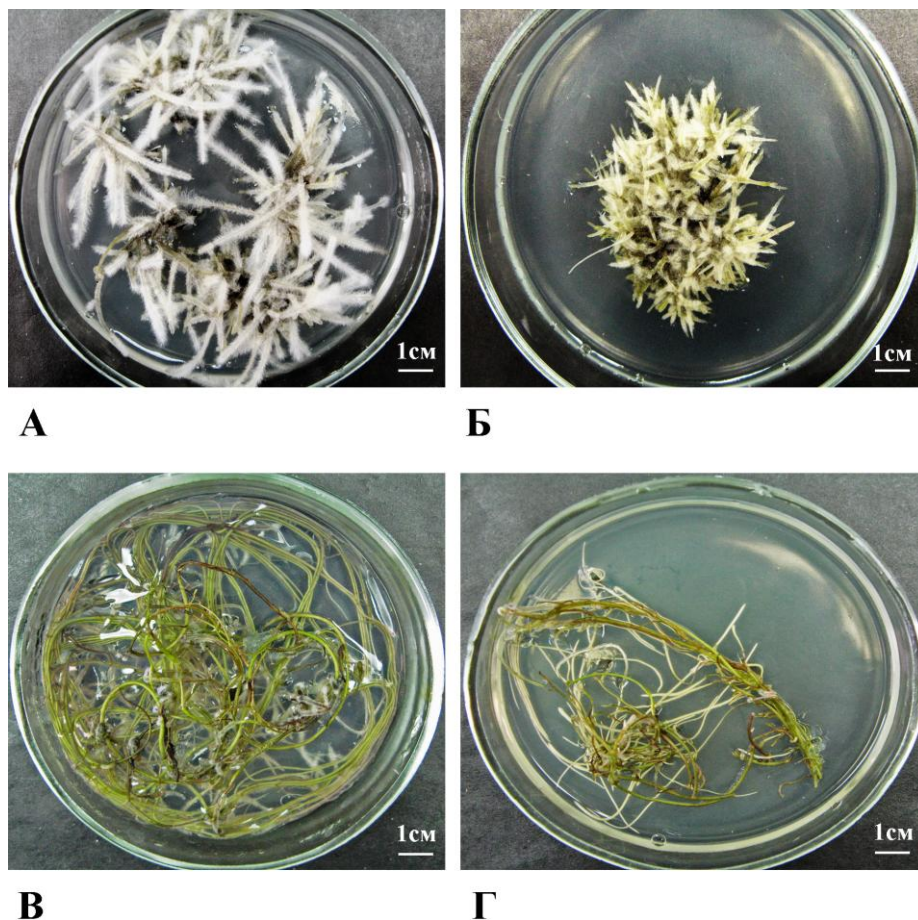


Рис. 3.11. Ріст «бородатих» коренів *A. dracunculus* (а, б) та *A. vulgaris* (в, г): швидкий (а, в) та повільний (б, г) ріст

Слід зазначити, що ізолювані корені контрольних нетрансформованих рослин також росли на безгормональному середовищі, однак цей ріст повністю припинявся через місяць після їх відокремлення від рослин і був повільним (середній приріст становив лише 0,003 г (*A. vulgaris*), 0,002 г (*A. dracunculus*) та

0,005 г (*A. annua*) за місяць). В той же час, трансгенні корені не припиняли ріст на середовищі без регуляторів росту навіть при тривалому культивуванні (3 роки) та не змінювали характерний для «бородатих» коренів фенотип.

Відомо, що специфічний фенотип трансгенних коренів зумовлений перенесенням *rol* генів агробактерій, а саме генів *rolA*, *rolB*, *rolC* у *rolD* [397]. Гени *rolA*, *rolB* та *rolC* є у всіх *Ri*-плазмідах. Продукт гена *rolA* бере участь у регуляції експресії генів у рослинах [398] та за даними цих авторів призводить до зменшення вмісту ауксинів, цитокінінів, гіберелової кислоти [399]. Ген *rolB* є необхідним для ініціювання росту коренів [400], а результатом його перенесення є формування специфічного фенотипу «бородатих» коренів [401]. Окрім того, було з'ясовано, що наявність цього гена у трансгенних рослинах/коренях індукує зміни у метаболізмі, зокрема, впливає на синтез вторинних метаболітів [21]. Ген *rolC* є найбільш консервативним серед *rol* генів, та разом з *rolA* та *rolB* генами бере участь у ініціюванні коренеутворення [402].

Таким чином, у результаті перенесення вказаних генів до геному рослин після інфікування агробактеріями може відбуватися формування коренів, які мають типовий фенотип, а також зміни у вторинному метаболізмі. Вірогідно, різницю у фенотипі та швидкості росту всередині одного виду можна пояснити різним рівнем експресії *rol* генів або особливостями інтеграції бактеріальної Т-ДНК у геном рослини-реципієнта [399]. При трансформуванні ядерної ДНК контрольоване вбудовування трансгенів є неможливим. Тому причиною особливості кожної лінії може бути ефект положення генів, який, вірогідно, призводить до відмінностей у морфології та швидкості росту коренів різних ліній.

Лінієспецифічність росту описано у дослідженнях щодо трансформування полинів. Так, у дослідженні Sujatha та ін. [55] дві з 92 отриманих ліній «бородатих» коренів *A. vulgaris* відрізнялися значною швидкістю росту (до 3г сирої речовини за 30 діб). Kiani та ін. [403] також продемонстрували відмінності у швидкості росту трансгенних коренів рослин іншого виду, *A. dubia*. Подібний ефект трансформації було показано і на «бородатих» коренях *A. annua* [404] при культивуванні у рідкому середовищі МС. За таких умов експерименту Kim et al.



вдалося отримати приріст сирої речовини 0,2 г/день з загальним приростом маси до 10 г сухої речовини на 1 л живильного середовища за 28 діб культивування. Для порівняння, показано, що швидкість росту «бородатих» коренів *Atropa belladonna* L. є вищою і може сягати до 0,3 г/день (сира речовина) [405], як і у випадку «бородатих» коренів *Hyoscyamus muticus* L., швидкість росту яких сягає 0,32 г/день (сира речовина) [406]. Shiao та Dogan продемонстрували, що приріст маси коренів *Arabidopsis thaliana* L. складав 0,045 – 0,101 г/день (сира речовина) у експоненційній фазі росту, а загальний приріст маси сягав 13 г сухої речовини на 1 л середовища за 30 діб культивування [407]. У розглянутих дослідженнях швидкість росту визначали при культивуванні коренів у рідкому середовищі у колбах об'ємом 250-500мл. У наших дослідженнях ми використовували агаризоване живильне середовище, а експеримент проводили у чашках Петрі, що могло слугувати лімітуючим фактором, і не дозволяло дослідити максимально можливий приріст маси, як у розглянутих дослідженнях. Однак, для досягнення нашої мети використання таких параметрів культивування було достатньо, щоб оцінити відносний приріст росту трансформованих ліній коренів всередині кожного виду.

Оскільки регуляція такого фізіологічного параметру як швидкість росту зумовлена вмістом фітогормонів, а їх синтез залежить від активності *rol* генів агробактерій [207], цілком закономірним є варіабельність у швидкості росту «бородатих» коренів як окремих трансформаційних подій.

Морфологічні особливості та відмінності у швидкості росту є підґрунтям для дослідження рівня накопичення сполук вторинного метаболізму у різних лініях трансгенних коренів.

**3.2.3. Вплив регуляторів росту на приріст маси трансгенних коренів.** Було проведено дослідження можливості прискорення росту культури «бородатих» коренів *Artemisia* шляхом додавання до живильного середовища індолілоцтової та індоділмасляної кислот та полікомпонентних препаратів Емістим С (продукт біотехнологічного вирощування грибів-епіфітів з кореневої

системи лікарських рослин) і Стімпо (препарат біологічного походження, який містить ненасичені жирні кислоти, вуглеводи, аналоги натуральних фітогормонів, біогенні мікроелементи, аверсектини) ТМ «Агробіотех»). Визначено, що застосування індолілоцтової та індолилмасляної кислот дозволяє пришвидшити ріст «бородатих» коренів. Такий ефект спостерігався для усіх ліній коренів, які використовували у експериментах (рис. 3.12).

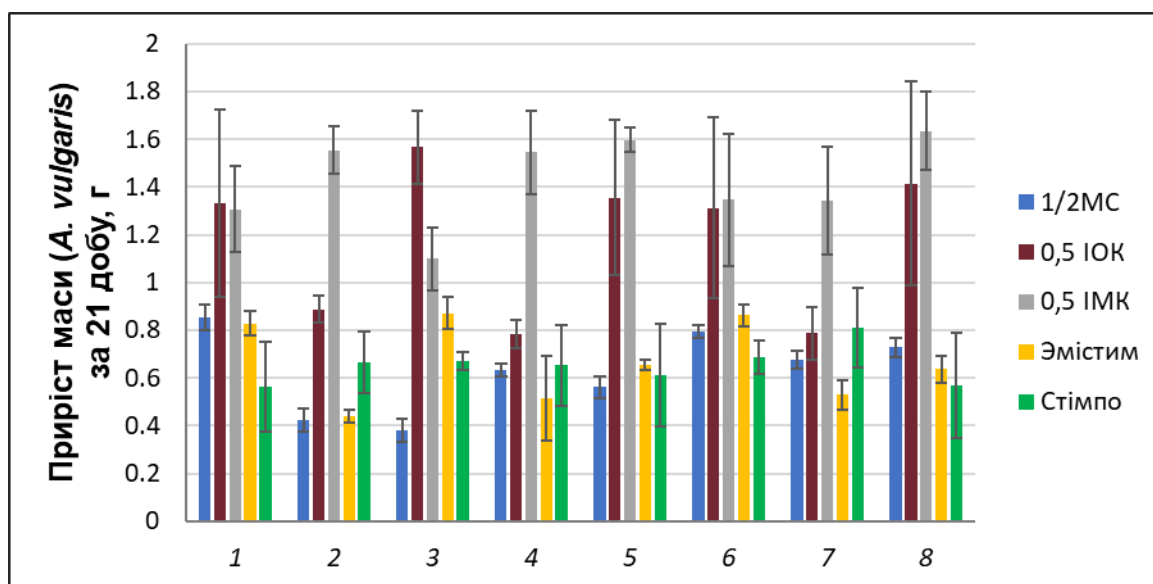


Рис. 3.12. Вплив регуляторів росту рослин на ріст культур «бородатих» коренів *A. vulgaris*; 1-8 – лінії трансгенних коренів; ІОК – індолілоцтова кислота; ІМК – індолилмасляна кислота

Швидкість росту «бородатих» коренів залежить від складу живильного середовища [404]. Так, було продемонстровано залежність росту трансгенних коренів від концентрації сполук азоту, фосфору. Також, для прискорення росту «бородатих» коренів *A. annua* Towler et al. [408-409.] збільшували вміст сахарози у кількості від 30 до 50 г/л живильного середовища при використанні біореактору газової фази. Окрім цього, було показано, що як синтетичні регулятори росту, так і комплексні препарати природного походження можуть стимулювати ріст «бородатих» коренів [410].

У наших експериментах виявлено лінієспецифічність відповіді на дію регуляторів росту. Вирощування трансгенних коренів на живильному середовищі

з 0,5 мг/л  $\alpha$ -індолілоцтової кислоти призводило до суттєвого прискорення росту та збільшення маси, причому такий ефект спостерігали при вирощуванні усіх ліній коренів за виключенням лінії №7. Збільшення приросту маси за використання індолілоцтової кислоти у порівнянні з контролем (1/2МС) становило 1,2 – 4,1 рази. Слід відзначити, що найбільший приріст маси спостерігали у коренів лінії №3, які росли найповільніше за контрольних умов.

Додавання до живильного середовища 0,5 мг/л індоділмасляної кислоти також сприяло прискоренню росту «бородатих» коренів. Цей ефект спостерігали на усіх досліджених лініях коренів. Маса коренів через три тижні збільшувалася у 1,5 – 3,6 рази у порівнянні з контролем у залежності від лінії коренів.

Використання регуляторів Емістим та Стимпо для більшості ліній не призводило до стимулювання росту коренів за виключенням коренів лінії №3. Для ліній №№ 1, 2, 4, 5, 6 та 7 достовірні відмінності за параметром швидкості росту від контролю відсутні, а культивування коренів лінії №8 у присутності Стимпо навіть призводило до зменшення приросту у порівнянні з контролем. Разом з тим, виявлено, що регулятори Емістим С та Стимпо у значному ступені прискорювали ріст коренів лінії №3 у порівнянні з контролем – у 7,9 та 6,1 рази відповідно. Ефект відсутності стимулювання росту більшості ліній трансгенних коренів при додаванні до живильного середовища Емістиму С та Стимпо є досить очікуваним, оскільки, за рекомендаціями фірми-виробника ці препарати використовують для біозахисту рослин від шкідників, підвищення урожайності [411]. Разом з тим, привертає увагу той факт, що при використанні Емістиму С та Стимпо спостерігали значне пришвидшення росту «бородатих» коренів однієї з ліній, причому за контрольних умов саме ця лінія характеризувалася найбільш повільним ростом. Отже, вірогідно, що за певних умов ці регулятори також можуть впливати і на ріст кореневої системи рослин, прискорюючи її формування.

Таким чином, у результаті наших досліджень було встановлено, що трансформовані лінії коренів *Artemisia* відрізняються за швидкістю росту як між різними видами, так і між собою всередині окремого виду. Найбільш високими

темпами росту відрізнялись трансгенні корені *A. vulgaris* та *A. annua*, в той час як *A. dracuncululus* був притаманний повільний темп росту. Окрім того, «бородаті» корені *Artemisia* виявились чутливими до дії таких регуляторів росту як ІОК та ІМК, причому чим повільніше ростуть корені у контрольних умовах, тим більш ефективною може бути стимулююча дія цих регуляторів.

Результати, подані у цьому розділі, опубліковані у таких працях:

1. **Дробот К.О.** Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn-α2b* людини / **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, Н.А. Матвєєва // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2015 – Т.17. – С.145-147.
2. **Дробот Е.А.** *In vitro* растения рода *Artemisia* как продуценты биологически активных соединений / **Е.А. Дробот**, Н.А. Матвеева // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2015. – № 1 – P.127-130.
3. **Drobot K. O.** Tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) “hairy” root culture production / **К.О. Drobot**, А.М. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Biotechnologia acta. – 2016. – Vol.9, №2. – P. 55-60.
4. **Дробот К.О.** Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / **К.О. Дробот**, Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – Т. 19. – С. 117-120.
5. **Drobot К.О.** Transgenic *Artemisia dracuncululus* L. “hairy” root culture construction / **К.О. Drobot**, А.М. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Тези доповідей Міжнародної наукової конференція «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології», 11-13 жовтня, 2015 р. – Львів, 2015. – С. 110.
6. Some investigations of using of biostimulators for the activation of seeds germination and stimulation of roots growth / N. Matvieieva, S.P. Ponomarenko, **К.О.**

**Drobot, E. Maluszynska, A. Szydłowska** // II Konferencja Naukowa “Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin”, 25-26 lutego 2015. –Warszawa, 2015. – P. 78

7. Пат. КМ № 116312 Україна. Спосіб отримання культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia dracunculus* L. / Н.А. Матвеева, **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, В.П. Дуплій – Опубл. 20. 03. 2017

### **3.3. Визначення вмісту біологічно активних сполук та біологічної активності у «бородатих» коренях *Artemisia***

Лікарські рослини є джерелом низки хімічних сполук та використовуються для потреб медицини, харчової та косметичної промисловостей. Задля отримання біологічно активних сполук зазвичай використовують рослини, які зібрані у природних ареалах. Отримання БАС з таких рослин має недоліки. Зокрема, масовий збір дикоростучих рослин може призвести до їх знищення, а неконтрольовані умови вирощування не гарантують чистоти рослинної сировини. При вирощуванні рослин у природних умовах вміст сполук вторинного метаболізму залежить від цілого ряду факторів — вологи ґрунту, змін температури, освітлення [61]. Окрім того, природні ресурси є вичерпними і часто не можуть задовільнити широкий попит індустрії.

Розв'язати ці проблеми може використання культури *in vitro* та методів біотехнології. Культура *in vitro* надає можливість суворо контролювати умови вирощування рослин, а біотехнологічні підходи дозволяють посилювати природні властивості лікарських рослин та відбирати найбільш продуктивні лінії. Культивовані *in vitro* «бородаті» корені є альтернативним джерелом цінних сполук [129-130] та є перспективною біотехнологічною системою для синтезування та отримання біологічно активних сполук [131-132].

**3.3.1. Визначення вмісту поліфруктанів.** Фруктани є запасними сполуками, що синтезуються у рослинах та їх коренях. За хімічною структурою фруктани є полісахаридами, які відрізняються різною кількістю залишків фруктози. Фруктани виявляють біологічну активність та використовуються у медицині та харчовій промисловості.

За результатами наших досліджень виявлено, що в коренях нетрансформованих рослин та у «бородатих» коренях *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracuncululus* дійсно накопичувались фруктани. В залежності від виду їх вміст у нетрансформованих коренях коливався у широкому діапазоні  $61,68 \pm 0,98$  –

263,88±5,72 мг/г сухої речовини. Найвищий вміст було зафіксовано у коренях *A. vulgaris*, а найменший — у коренях *A. dracunculus*. Проведений аналіз вмісту фруктанів у різних лініях трансгенних коренів цих видів свідчив також про значну варіабельність за цим показником (рис. 3.13). Найвищий вміст фруктанів був зафіксований у трансгенних лініях *A. dracunculus* та *A. annua*, а найменший — у трансгенних коренях *A. vulgaris*.

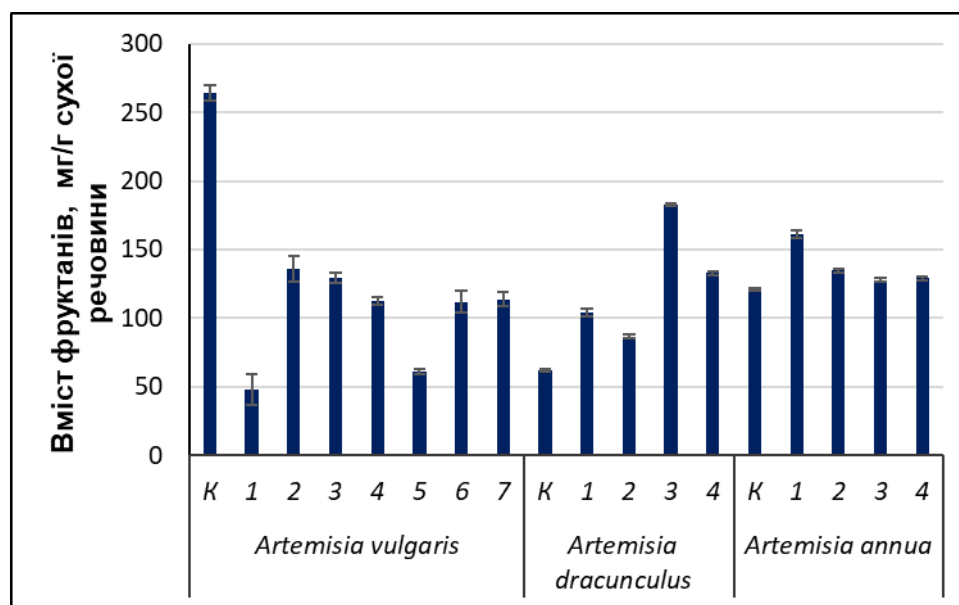


Рис. 3.13. Вміст фруктанів у «бородатих» коренях *Artemisia*:

К – корені нетрансформованих рослин; 1-7 – «бородаті» корені полину;

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

Генетична трансформація призводила до збільшення накопичення фруктанів у трансгенних коренях *A. annua* та *A. dracunculus*. В усіх досліджуваних

трансгенних лініях *A. annua* та *A. dracuncululus* вміст фруктанів перевищував такий у коренях нетрансформованих рослин. Так, у «бородатих» коренях *A. annua* вміст фруктанів знаходився у діапазоні  $127,93 \pm 1,05$  –  $160,8 \pm 2,81$  мг/г сухої речовини та був вищим, ніж у нетрансформованих коренях цього виду у 1,05–1,32 раза. У «бородатих» коренях *A. dracuncululus* фруктани накопичувались у кількості в 1,4 – 2,15 раза вищій, ніж у контрольних коренях, вміст цих сполук коливався у межах  $86,61 \pm 1,6$  –  $183,1 \pm 1,05$  мг/г сухої речовини [412].

Слід відзначити, що вектори, які використовували для трансформації, не несли специфічних генів [413], які впливають на рівень синтезу фруктанів. Отже, у проведених нами дослідженнях не можна було очікувати на значні зміни метаболізму та суттєве підвищення рівня цих сполук. Разом з тим, наші дані підтверджують той факт, що генетична трансформація без використання специфічних генів, що кодують синтез фруктанів, може змінювати рівень їх накопичення.

Кількість фруктанів не залежала від використаних агробактерій – дикого штаму A4, або *A. rhizogenes* з вектором pCB161 або pCB124. Таким чином, виявлені відмінності не були індуковані наявністю перенесених генів *ifn-a2b* та *nptII*, а, скоріш за все, стали результатом самого процесу генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*.

Було виявлено, що представники родини Asteraceae, у тому числі артишок, цикорій, брокколі, салат, здатні синтезувати фруктани. [169]. У науковій літературі є результати біотехнологічних досліджень, що спрямовані на пошук нових джерел фруктанів, а також на збільшення шляхом генетичної трансформації вмісту цих цукрів у рослинах [414-416]. Одним з об'єктів таких досліджень є цикорій, оскільки наразі цю рослину використовують для промислового виробництва одного з фруктанів — інуліну [417]. Модифіковані рослини, що синтезують фруктани, отримують шляхом перенесення бактеріальних або рослинних генів, що кодують біосинтез цих сполук.

З використанням генів, які беруть участь у синтезі фруктанів, зокрема, *I-sst*, *I-fft* рослинного походження, створено трансформовані рослини тютюну [418],



картоплі [415.], цукрового буряку [75], тощо. Експресія генів ячменю *b-fft* або *l-sst* у рослинах *Lolium perenne* L. збільшувала вміст фруктанів на 15% порівняно з їх вмістом у дикорослих рослинах цього виду [419]. Окрім цього, інтенсифікація синтезу фруктанів не заважала росту рослин. Sobolev et al. [420] створили трансгенний салат з надвисокою експресією гена аспарагін-синтази з *Escherichia coli*, та отримали непередбачуване 30-кратне підвищення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів у порівнянні з вихідними нетрансформованими рослинами салату. Метою цього дослідження було зміна азотного статусу рослин салату і, зрештою, посилення зростання. З'ясувалося, що така трансформація активізувала метаболізм рослини, включаючи цикл Кребса та біосинтез фруктанів, хоча статус азоту не змінювався. Таким чином, за допомогою введення в рослинний геном генів синтезу фруктанів, можна отримати рослини з поліпшеними властивостями, які також є новими продуцентами сполук з харчовою цінністю.

До рослин, здатних до синтезу та накопичення фруктанів, належать і рослини роду *Artemisia*. У 2017 році Corrêa-Ferreira et al. показали, що екстракти *A. vulgaris*, багаті на фруктозовмісні цукри, виявляли значний гепатопротекторний ефект *in vivo*, який, ймовірно, був пов'язаний з антиоксидантними та імуномодулюючими властивостями [421]. Ці результати підтверджують доцільність традиційного використання екстракта *A. vulgaris* для лікування захворювань печінки. З огляду на це, становить інтерес дослідження впливу генетичної трансформації на вміст фруктанів у коренях *Artemisia* spp. та оцінка можливості використання «бородатих» коренів цього роду як джерела фруктозовмісних сполук.

Таким чином, нами було визначено видові відмінності у накопиченні фруктанів у «бородатих» коренях рослин *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracunculoides*, отриманих після генетичної трансформації. Генетична трансформація призводила до збільшення накопичення фруктанів у *A. annua* та *A. dracunculoides*, однак відбувалося зменшення вмісту цих у сполук у «бородатих» коренях *A. vulgaris*. Неспецифічний вплив генетичної трансформації некеровано впливав на клітинний

метаболізм та змінював природну здатність представників *Artemisia* spp до накопичення фруктозовмісних цукрів. Таку дію *Agrobacterium*- опосередкованої генетичної трансформації можна використовувати як інструмент для підвищення вмісту цінних сполук у трансгенних коренях *Artemisia*, зокрема, для збільшення рівня накопичення фруктанів.

**3.3.2. Визначення вмісту цукрів.** Метою цих досліджень було вивчення змін у накопиченні цукрів після генетичної трансформації. Наразі немає публікацій щодо вмісту цих сполук у *in vitro* культивованих рослинах та у «бородатих» коренях рослин роду *Artemisia*.

За результатами роботи було встановлено, що у пагонах нетрансформованих рослин обох досліджуваних видів — *A. vulgaris* та *A. dracunculus* — синтезувались глюкоза, фруктоза та сахароза (рис. 3.14). Вміст фруктози був вищим у пагонах *A. dracunculus* — до  $61,7 \pm 0,21$  мг/г сухої речовини, в той час як нетрансформовані корені цих рослин накопичували фруктозу лише у кількості до  $14,235 \pm 0,24$  мг/г сухої речовини. У пагонах *A. dracunculus* також виявлено високий вміст глюкози –  $31,29 \pm 0,45$  мг/г сухої речовини (у порівнянні з  $13,35 \pm 0,12$  мг/г сухої речовини у коренях). На відміну від *A. dracunculus* вміст фруктози, глюкози та сахарози був вищим у коренях *A. vulgaris*, ніж у пагонах. Ці сполуки накопичувались у коренях рослин відповідно у кількості  $20,93 \pm 0,31$  мг/г,  $17,37 \pm 0,26$  мг/г і  $25,48 \pm 1,14$  мг/г сухої речовини. У той же час вміст фруктози, глюкози та сахарози у пагонах *A. vulgaris* становив  $14,71 \pm 0,28$  мг/г,  $10,15 \pm 0,1$  мг/г і  $12,27 \pm 1,39$  мг/г сухої речовини відповідно.

Особливістю пагонів *A. vulgaris*, а також пагонів та нетрансформованих коренів *A. dracunculus* була здатність до накопичення манітолу. Вміст манітолу у пагонах *A. vulgaris* складав  $0,68 \pm 0,024$  –  $0,63 \pm 0,007$  мг/г сухої речовини, а у пагонах та коренях *A. dracunculus* —  $0,70 \pm 0,01$  та  $0,63 \pm 0,007$  мг/г сухої речовини відповідно.

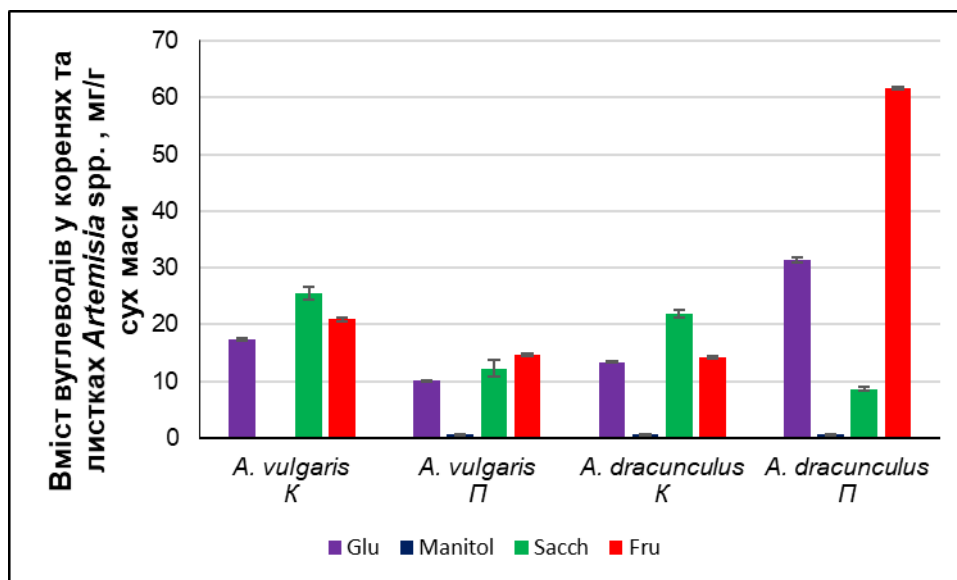


Рис. 3.14. Вміст цукрів у коренях та пагонах *in vitro* культивованих нетрансформованих рослин *Artemisia*: К – корені нетрансформованих рослин; П – пагони нетрансформованих рослин. Glu – глюкоза, Manitol – манітол, Sacch – сахароза, Fru – фруктоза.

Таким чином, корені та пагони культивованих *in vitro* інтактних рослин *A. vulgaris* та *A. dracunculus* відрізнялись за вмістом цукрів. Вміст цих сполук може варіювати в залежності від виду досліджуваної рослини та умов її зростання. Вміст цукрів також відрізняється у коренях та пагонах: синтез цих цукрів починається в листі, однак зазвичай ці цукри накопичуються у корінні рослин як запасні сполуки [422].

«Бородаті» корені *A. vulgaris* та *A. dracunculus* також накопичували глюкозу, фруктозу та сахарозу (рис. 3.15). Їхній вміст у трансформованих коренях різних ліній суттєво варіював. Так, у «бородатих» коренях *A. vulgaris* вміст глюкози був у межах  $3,8 \pm 0,17$  –  $10,5 \pm 0,1$  мг/г, а фруктози  $3,1 \pm 0,07$  –  $12,08 \pm 0,07$  мг/г сухої речовини, що є меншим, ніж у нетрансформованих рослинах *A. vulgaris*. Проте 40% «бородатих» коренів накопичували сахарозу у більшій кількості, ніж контрольні корені. Окрім цього, в трансформованих коренях *A. vulgaris* було виявлено манітол, який не був притаманний нетрансформованим кореням. Його вміст варіював у межах  $0,65 \pm 0,04$  мг/г –  $18,72 \pm 0,20$  мг/г сухої речовини, що

перевищувало такий вміст у листі нетрансформованих рослин майже у 30 разів. ( $0.68 \pm 0.024$  мг/г сухої речовини відповідно).

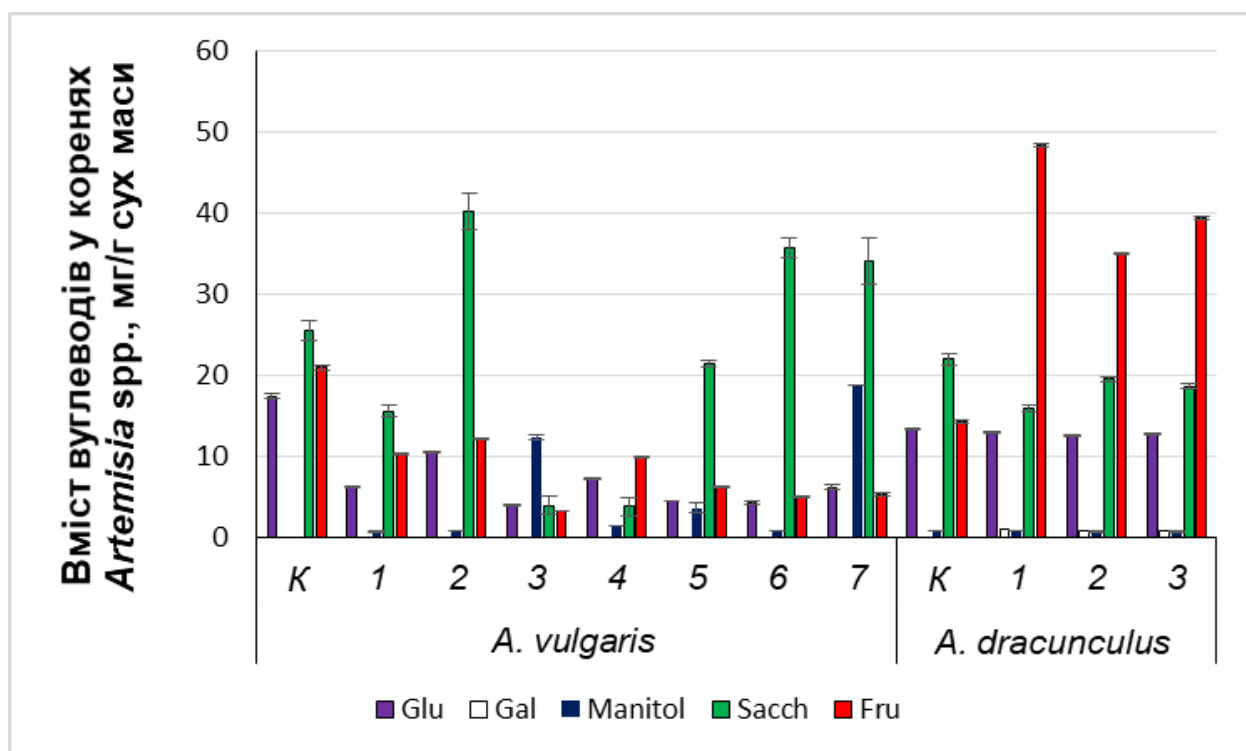


Рис. 3.15. Вміст цукрів у «бородатих» коренях *Artemisia*: К – корені нетрансформованих рослин; 1-7– «бородаті» корені полину; Glu – глюкоза, Gal – галактоза, Manitol – манітол, Sacch – сахароза, Fru – фруктоза.

«Бородаті» корені *A. dracuncululus* також накопичували глюкозу, фруктозу, сахарозу та манітол. Їхній вміст у трансгенних коренях різних ліній незначно варіював. Так, вміст глюкози був у межах  $12,45 \pm 0,09$  –  $12,93 \pm 0,09$  мг/г сухої речовини, майже на рівні з контрольними коренями.

На відміну від глюкози, вміст фруктози у трансгенних коренях був у 3,4 рази вищим, ніж такий у коренях нетрансформованих рослин — до  $48,35 \pm 0,17$  мг/г сухої речовини. Галактоза у трансгенних коренях естрагону була виявлена в невеликій кількості —  $0,69 \pm 0,06$  –  $0,9 \pm 0,07$  мг/г сухої речовини, хоча цей цукор не був притаманний нетрансформованим рослинам (ані кореням, ані листкам). Відмінності у вмісті манітолу в контрольних та трансформованих коренях ( $0,63 \pm 0,007$  та  $0,68 \pm 0,05$  мг / г сухої речовини відповідно) статистично не були достовірні ( $p > 0,05$ ).

Отже, після генетичної трансформації було зафіксовано зміни у вмісті цукрів в трансгенних коренях *A. vulgaris* та *A. dracuncululus*. Відмінності проявлялися у наявності сполук, які не були притаманні нетрансформованим кореням. Наприклад, в трансгенних коренях *A. vulgaris* відбувався синтез манітолу, а в трансгенних коренях *A. dracuncululus* – синтез галактози. Також було виявлено і кількісні зміни у накопиченні «бородатими» коренями сполук (у порівнянні з їх кількістю у нетрансформованих коренях). Наприклад, кількість фруктози в деяких трансгенних лініях *A. vulgaris* перевищувала таку у контрольних коренях в 3,4 рази, а сахарози — в 1,3-1,6 рази [423].

Таким чином, було визначено, що трансформація з використанням агробактерій може призводити до активізації синтезу цукрів і, таким чином, може бути використана для отримання ліній-продуцентів цих сполук.

**3.3.3 Визначення вмісту інуліну.** Інулін ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> — високомолекулярний фруктан, що є полімером D-фруктози, молекули якої з'єднані між собою 1,2-глюкозидними зв'язками та мають термінальну молекулу глюкози [54]. Ця речовина солодка на смак та добре розчиняється в гарячій воді. У рослинах інулін знайдено в листках, але переважна кількість його накопичується в коренях рослин [173].

У роботі ми досліджували накопичення інуліну у нетрансформованих рослинах, та у «бородатих» коренях полину з метою вивчення впливу *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст цієї сполуки.

За результатами експерименту інулін було виявлено як у коренях, так і у пагонах нетрансформованих рослин. У рослинах *A. vulgaris* ця сполука накопичувалась у кількості  $114,5 \pm 2,72$  мг/г та  $44,8 \pm 0,59$  мг/г сухої речовини у коренях та пагонах відповідно. На відміну *A. vulgaris* пагони *A. dracuncululus* містили інулін у більшій кількості у порівнянні з вмістом цієї речовини в коренях. Така тенденція є особливістю рослин *A. dracuncululus*, оскільки зазвичай інулін в основному накопичується в коренях рослин.

Вміст інуліну в «бородатих» коренях полину був переважно нижчий за такий у контролі (рис. 3.16). У «бородатих» коренях *A. vulgaris* варіював у діапазоні від  $12,9 \pm 0,203$  до  $106,39 \pm 4,22$  мг/г сухої речовини. Трансформовані корені накопичували інулін у кількості нижчій за кількість у коренях контрольних рослин. Отже, генетична трансформація призвела до зменшення вмісту інуліну у «бородатих» коренях *A. vulgaris*. У той же час у одній з трансформованих ліній *A. dracunculus* інулін накопичувався на рівні контролю, і сягав  $79,79 \pm 1,78$  мг/г сухої речовини (при вмісті  $71,81 \pm 6,1$  мг/г сухої речовини у контрольних коренях) [423].

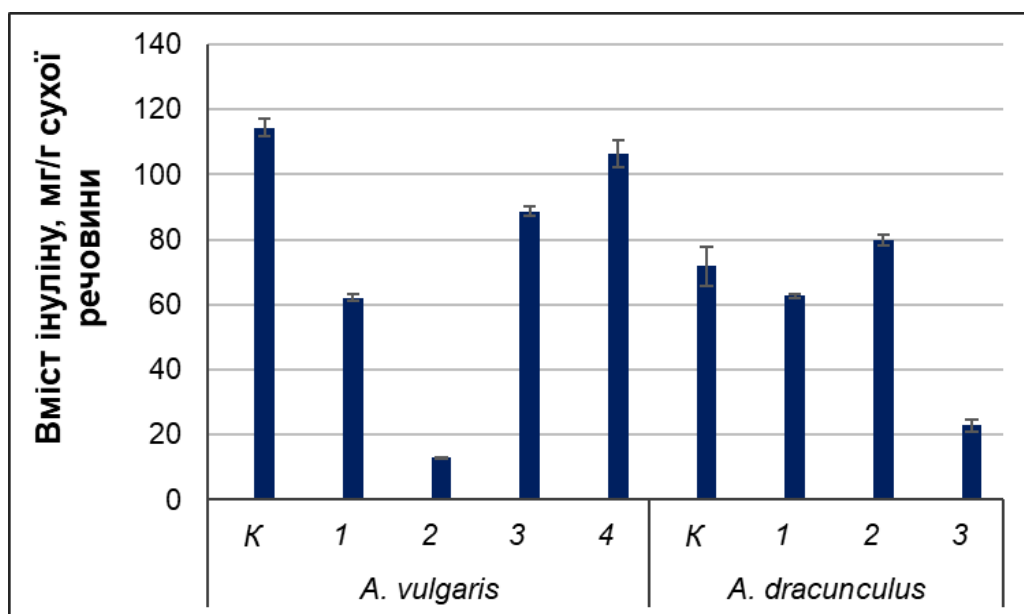


Рис. 3.16. Вміст інуліну у коренях *Artemisia*: К – корені нетрансформованих рослин; 1-4 – лінії «бородатих» коренів.

Рослини, які розглядають у якості джерел інуліну, мають відповідати таким параметрам: висока продуктивність, великий запасуючий орган (коріння, бульба), здатність до накопичення сахарози, та відсутність або дуже мала кількість крохмалю.

Цукровий буряк здатний накопичувати сахарозу у великій кількості (200 мг/г сирої речовини), в результаті чого вихід сахарози становить 10-14 т/га. Метод екстракції інуліну, який нині використовується у промисловості для виділення

цієї сполуки з рослин цикорію, також може бути застосованим до цукрового буряку [424-426].

Іншою потенційною платформою для виробництва інуліну є цукрова тростина (*Saccharum spp. L.*), оскільки ця рослина накопичує сахарозу у кількості 500 мг/г сухої речовини у міжвузлях [427], що забезпечує вихід цієї сполуки у кількості 6–14 т/га. Nicholson et al. перенесли ген *I-SST* із артишоку до геному цукрової тростини і продемонстрували виробництво 1-кестози *in vivo*. Однак при трансформації і буряку, і тростини, вихід інуліну є дуже низьким: 0,01–10 мкмоль/ г сирої речовини.

Як зазначалося, корені, отримані після трансформації рослин за допомогою агробактерій, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, які властиві для тієї чи іншої рослини [428], причому в трансформованих коренях вміст таких сполук може бути відмінним за такий вміст у коренях рослин дикого типу. Такі зміни не є прогнозованими і часто викликані плейотропною дією перенесених генів агробактерій. У нашому дослідженні генетична трансформація призводила до зменшення вмісту інуліну у "бородатих" коренях. Лише у одній з досліджуваних трансгенних ліній (*A. dracunculus*) спостерігалось незначне збільшення вмісту цієї сполуки.

**3.3.4. Визначення вмісту артемізиніну.** Культивовані *in vitro* рослини *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracunculus* синтезували артемізинін-подібні сполуки. Ці сполуки були виявлені як у пагонах, так і в коренях контрольних рослин. Вміст артемізиніну в пагонах *A. vulgaris* був набагато вищий, ніж у коренях — до 1,53 і 0,69 мг/г сухої речовини відповідно. Ці сполуки також накопичувались у невеликій кількості у пагонах *A. dracunculus* (до 0,14 мг/г сухої речовини).

У той же час вміст цих сполук у коренях естрагону був набагато вищим і сягав 2,47 мг/г сухої речовини. Таким чином, накопичення артемізинін-подібних сполук у нетрансформованих коренях *in vitro* культивованих рослин *A. dracunculus* було вище, ніж його вміст у пагонах цих рослин.

Вміст артемізинін-подібних сполук у нетрансформованих коренях *A. annua* був вищим, ніж у лініях «бородатих» коренів і становив 6,5 мг/г сухої речовини.

Представники роду *Artemisia* здавна відомі як рослини, що синтезують сполуку з антималярійними властивостями – артемізинін. Вміст цієї сполуки було виявлено у листі культивованих *in vivo* рослин *A. annua* (0,03-1,4% сухої речовини) [429]. Артемізинін був також виявлений в *Artemisia apiacea* і *Artemisia lancea* [430], *Artemisia cina* [431], *Artemisia absinthium* (у каллусі) [432], *Artemisia dubia* та *Artemisia indica* [357], а також в надземних частинах *Artemisia sieberi* [433]. У дослідженнях Mannan et al. [332] вміст артемізиніну проаналізовано у 17 видах *Artemisia*. Автори продемонстрували, що найвища концентрація артемізиніну була у листі ( $0,44 \pm 0,03\%$ ) та суцвіттях ( $0,42 \pm 0,03\%$ ) *A. annua*, у суцвітті *A. bushriences* ( $0,34 \pm 0,02\%$ ) та листі *A. dracunculus var dracunculus* ( $0,27 \pm 0,01\%$ ). За даними авторів, інтенсивність накопичення артемізиніну зменшується у такому порядку: суцвіття > листя > стебла > коріння. Кілька досліджень показали, що синтез артемізиніну відбувається в залозистих трихомах (glandular trichomes, GLTs), присутніх на квітках, бруньках і листі [434]. Це пояснює, чому корені рослин *Artemisia* мають меншу здатність до накопичення артемізиніну.

Отримані нами дані узгоджуються з попередніми дослідженнями і доводять, що надземна частина *in vivo* культивованих рослин *A. vulgaris* накопичує артемізинін у більшій мірі, ніж корені. У нашому дослідженні вміст артемізиніну у надземній частині та коренях *A. vulgaris* відрізнявся вдвічі. Однак, слід зазначити, що при дослідженні рослин *A. dracunculus* виявлено, що корені цих рослин накопичували артемізинін у кількості більшій, ніж листки. Той факт, що у нещодавніх дослідженнях було показано, що листя *A. dracunculus* накопичує артемізинін у більшій кількості, ніж корені, можна пояснити тим, що всі попередні експерименти були проведені на рослинах, культивованих *in vivo*, тоді як у нашому дослідженні ми використовували *in vitro* культивовані рослини. Таким чином, накопичення артемізиніну переважно у коренях може бути особливістю *in vitro* культивованих рослин *A. dracunculus*.



Деякі лінії трансгенних коренів *A. vulgaris* накопичували артемізинін у більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин (до 1,02 мг/г сухої речовини, рис. 3.17). Серед п'яти досліджуваних ліній, лише одна лінія накопичувала цю сполуку у меншій кількості, ніж коріння контрольних нетрансформованих рослин (0,237 мг/г сухої речовини). У нашому дослідженні генетична трансформація *A. vulgaris* призвела до збільшення вмісту артемізиніну у 40% ліній, у 40% не впливала на вміст цієї сполуки, та у 20% ліній призводила до зменшення вмісту артемізиніну. Слід відзначити, що на сьогодні немає публікацій стосовно вмісту артемізиніну у «бородатих» коренях *A. vulgaris*.

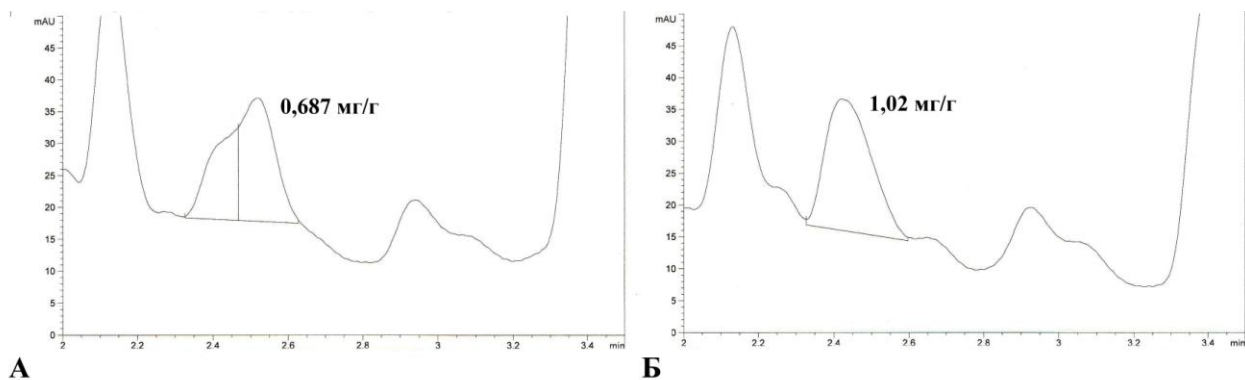


Рис. 3.17. Хроматограма результатів HPLC аналізу вмісту артемізинін-подібних сполук:

А – у нетрансформованих коренях рослин *A. vulgaris*; Б – у одній з трансгенних ліній *A. vulgaris*

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

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

*annua* призводила до зменшення накопичення артемизинін-подібних сполук [366, 423, 435].

Відомо, що *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація та перенесення генів *rol* може призвести до зміни кількості накопичених сполук, які притаманні рослині. Dilshad et al. [56] показали, що трансформовані рослини *A. vulgaris*, що містили агробактеріальні гени *rolB* та *rolC*, мали тенденцію накопичувати більше артемизиніну (до 10 разів більше) у порівнянні з рослинами, що не були трансформованими. Зміни у накопиченні артемизиніну у трансгенних коренях усіх досліджуваних видів не залежали від використаного вектора, отже, вірогідно, зміни у синтезі цієї антималярійної сполуки були зумовлені фактом агробактеріальної трансформації.

**3.3.5. Визначення вмісту флавоноїдів у трансформованих коренях.** Попри те, що посилений інтерес до представників роду *Artemisia* пов'язаний з наявністю вискоєфективної протималярійної сполуки артемизиніну у хімічному профілі цих рослини, рослини полину є цікавими як джерело і інших біологічно активних сполук.

Зокрема, екстракти полину можуть проявляти антимікробну, протизапальну та антиоксидантну дією у зв'язку з наявністю ефірних олій, фенолів, флавоноїдів та інших біологічно активних речовин [316.]. Так, наприклад, у фітохімічному складі екстрактів рослин *A. annua* виявлено більш ніж 40 різних флавоноїдів [47]. Серед них – еупатин, кверцетин, апігенін, рутин, лютеолін, камперфол, тощо. Крім того, у нещодавніх роботах обговорюється потенційний синергетичний ефект флавоноїдів полину у комбінації з артемизиніном при прояві протималярійних властивостей. Флавоноїди проявляють антиоксидантні, протиракові та протизапальні властивості, а також є потенційними агентами для затримки розвитку атеросклерозу та нейродегенеративних процесів [437].

Незважаючи на те, що *A. annua* є найбільш досліджуваним видом, інші представники цього роду також накопичують широкий спектр флавоноїдів. Різноманіття флавоноїдів у фітохімічному профілі було продемонстровано для *A.*

*absinthium* L [438], *A. asiatica* [439], *A. herba-alb* [440]. Огляд літератури показав, що вміст цих сполук наразі є найменш дослідженим у підземній частині (коренях) рослин полину. Зважаючи на це, актуальним є дослідження впливу генетичної трансформації на вміст флавоноїдів саме у коренях представників цього роду.

У нашому дослідженні флавоноїди були виявлені як у коренях, так і в листі досліджуваних рослин *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracunculus*. Кількість цих сполук у різних частинах (коренях та надземній частині) значно відрізнялась для *A. vulgaris* та *A. dracunculus* (Рис. 3.18). Вміст флавоноїдів у коренях та листі *A. vulgaris* становив  $8,03 \pm 1,04$  та  $29,27 \pm 2,74$  мг РЕ /г сухої речовини, а у *A. dracunculus* –  $51,27 \pm 4,15$  та  $25,35 \pm 3,58$  мг РЕ /г сухої речовини відповідно. Корені та листки нетрансформованих рослин *A. annua* накопичували флавоноїди – на рівні  $19,4 \pm 1,95$  та  $22,3 \pm 0,83$  мг РЕ /г сухої речовини у коренях та листі відповідно. Слід зазначити, що лише рослини *A. dracunculus* накопичували флавоноїди більшою мірою у коренях, в той час як вміст цих сполук у рослинах *A. vulgaris* та *A. annua* був більшим у надземній частині. Така ж тенденція у накопиченні сполук рослинами естрагону, що є протилежною тенденції у накопиченні іншими представниками роду, зберігалась при дослідженні вмісту фруктози, інуліну та артемізиніну.

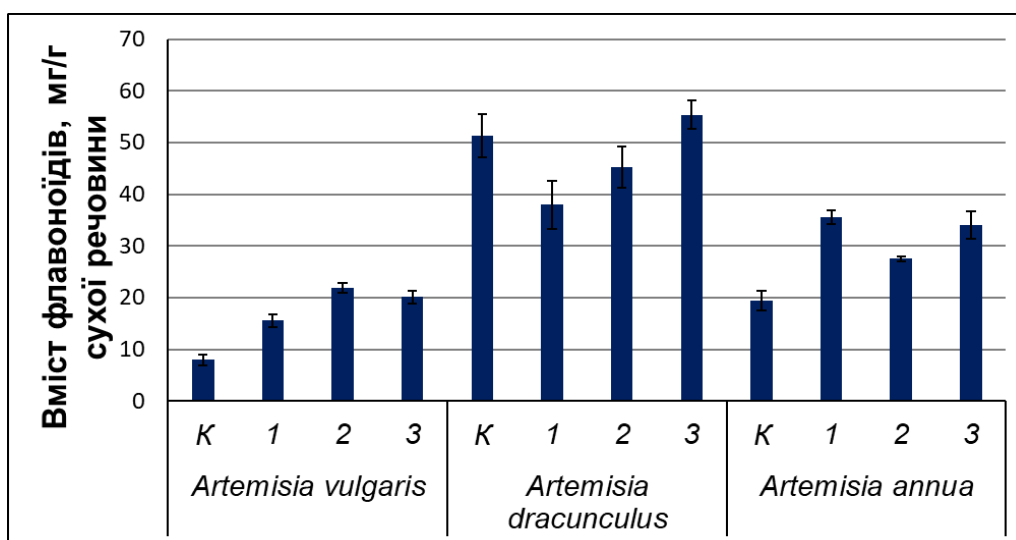


Рис. 3.18. Вміст флавоноїдів у коренях *Artemisia* (калібрування за 70% етанольним розчином рутину):

К – корені нетрансформованих рослин; 1-3 – лінії «бородатих» коренів.

Усі трансформовані лінії *A. vulgaris* накопичували флавоноїди у 2-3 рази більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин. Вміст цих сполук у «бородатих» коренях рослин цього виду коливався у межах  $15,59 \pm 1,24$  –  $21,92 \pm 1,01$  мг РЕ /г сухої речовини.

У 65% «бородатих» коренів *A. dracunculus* спостерігали зменшення вмісту флавоноїдів у порівнянні з контрольними коренями. Однак, з-поміж усіх досліджуваних видів полину, трансгенні корені естрагону мали найвищий вміст цих сполук — у діапазоні  $38,03 \pm 4,66$  –  $55,39 \pm 2,8$  мг РЕ /г сухої речовини.

Вміст флавоноїдів у трансформованих коренях *A. annua* варіював у межах  $27,5 \pm 0,53$  –  $35,6 \pm 1,38$  мг РЕ /г сухої речовини. Трансгенні корені у 100% випадків накопичували флавоноїди в більшій кількості, ніж корені (в 1,8 рази вище) і листя (в 1,6 рази вище) контрольних рослин.

Відомо, що рослини *Artemisia* spp. синтезують флавоноїди. Наразі, вміст цих сполук переважно досліджено у надземних частинах (листя, суцвіття) *in vivo* культивованих рослин. Загальний вміст флавоноїдів у рослинах полину може суттєво відрізнятись залежно від різних чинників: виду, частини рослини, стадії онтогенезу, умов зростання [441]. Наприклад, вміст еупатину в дослідженні Baraldi et al [441] варіював у межах від 0,035 мг на 100 г вологої маси перед цвітінням до 0,69 мг на 100 г вологої маси після цвітіння. Skowryga et al [442] продемонстрували, що концентрація рутину в екстракті *A. annua* може сягати лише до 0,75 мкг/г вологої маси.

Отже, за результатами наших досліджень генетична трансформація призводила до збільшення вмісту флавоноїдів в усіх «бородатих» коренях *A. annua* та *A. vulgaris*, однак корені *A. dracunculus* переважно мали нижчий вміст цих сполук, ніж їх нетрансформовані попередники. Лише одна лінія з досліджуваних накопичувала флавоноїди у більшій кількості (у 1,08 рази) [435,443].

**3.3.6. Визначення антиоксидантної активності (АОА).** Оскільки генетична трансформація може виступати індуктором змін системи

антиоксидантного захисту рослин, актуальним є дослідження її впливу на антиоксидантний статус рослин, що були отримані шляхом генетичної трансформації і мають перенесені гени.

Відомо, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація є комплексним стресовим фактором для рослини. У процесі агробактеріальної трансформації відбувається її поранення, контакт з патогенним мікроорганізмом, інсерція Т-ДНК у геном, культивування *in vitro*. Будь-який вид стресу (абіотичний, біотичний) супроводжується утворенням і накопиченням активних форм кисню (АФК). Одним з найважливіших механізмів гомеостазу рослин є активація системи антиоксидантного захисту при дії стресових факторів.

Захист клітини від негативного впливу окисних агентів після генетичної трансформації досягається двома механізмами: ферментативним (підвищення активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, пероксидази, каталази та ін), та неферментативним (накопичення низькомолекулярних антиоксидантів, таких як глутатіон, аскорбат, пролін, каротиноїди, токоферол та ін., а також високомолекулярних антиоксидантів, зокрема, танінів та цукрів) [444]. Біологічна роль антиоксидантної системи рослин полягає у захисті мембран та генетичного матеріалу від АФК, вільних радикалів (супероксид іонів ( $O_2^-$ ), гідроксил радикалів (ОН) та перекису водню ( $H_2O_2$ )). [445]. Ці сполуки проявляють надзвичайно високу реакційну здатність. Посилене утворення АФК породжує окисний «спалах», який є компонентом первинного захисту рослинних клітин, але водночас несприятливим і навіть пагубним чинником для останніх. Антиоксиданти, які є донорами електронів, втручаються в окислювальні процеси шляхом відновлення вільних радикалів та хелатування каталітичних металів.

Одним з найбільш поширених методів дослідження антиоксидантної активності є методи, що базуються на відновленні специфічних забарвлених вільних радикалів антиоксидантними сполуками. До них належить і метод DPPH<sup>+</sup> [446]. Принцип цього методу полягає у вимірюванні інтенсивності забарвлення спиртового розчину DPPH<sup>+</sup> (1,1-дифеніл-2-пікрілгідразил) радикалу до і після додавання рослинного екстракту. При наявності антиоксидантних (радикал-

поглинаючих) властивостей екстракту, DPPH<sup>+</sup> радикал змінює колір з пурпурно-синього на світло-жовий. Цей метод дозволяє спектрофотометрично визначати ступінь протирадикальної активності рослинних екстрактів.

Ми дослідили антиоксидантну (протирадикальну) активність екстрактів з нетрансформованих та трансгенних коренів рослин *A. vulgaris*, *A. dracunculus* та *A. annua*. Екстракти, отримані з трансгенних коренів різних видів *Artemisia*, відрізнялися за здатністю відновлювати DPPH<sup>+</sup> радикал (рис.3.19).

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

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

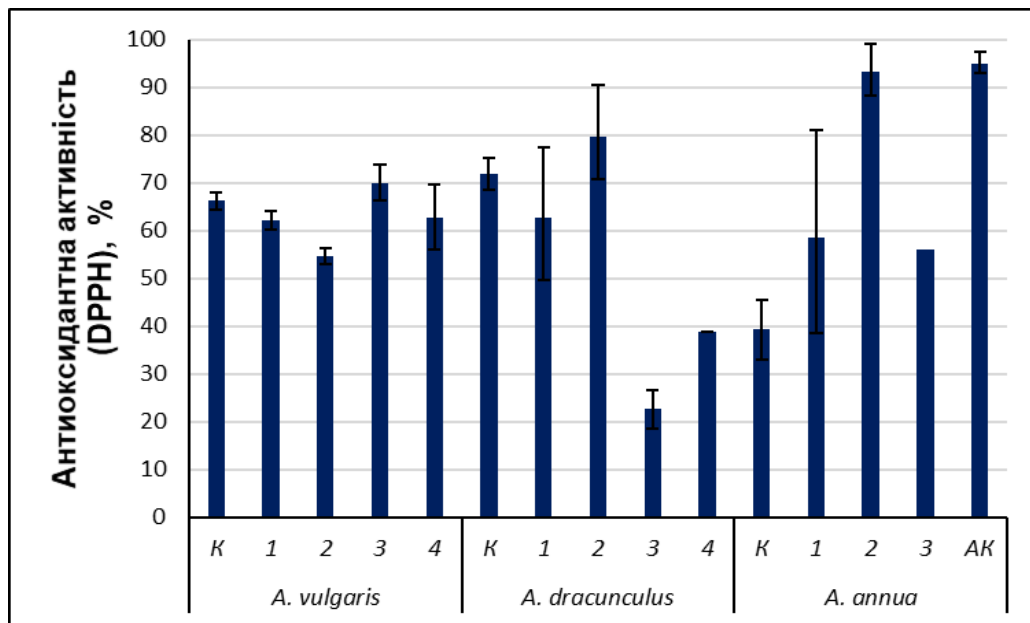


Рис. 3.19 Антиоксидантна активність екстрактів з нетрансформованих та трансгенних коренів рослин роду *Artemisia*:

1-4 – АОА екстрактів з трансгенних коренів полину; К – АОА екстрактів з коренів контрольних рослин; АК – АОА розчину аскорбінової кислоти концентрацією 1 мг/мл.

Рівень активності екстрактів з трансгенних коренів *A. vulgaris* у 100% ліній статистично не відрізнявся від такого у екстрактах з нетрансформованих коренів і коливався у діапазоні  $55 \pm 1,6$  –  $70 \pm 3,7\%$ , тоді як в контролі складав  $66 \pm 1,9\%$ . Отже, *A. rhizogenes*–опосередкована трансформація не призводила до достовірних змін антиоксидантної активності у *A. vulgaris*.

Експерименти показали, що екстракти, отримані з 50% вивчених трансгенних ліній *A. dracunculus*, статистично не відрізнялися за рівнем антирадикальної активності від екстрактів, отриманих з нетрансформованих коренів рослин цього виду. Лише у екстрактах двох ліній *A. dracunculus* (№1/2 та №1/4) протирадикальна активність була значно нижчою, ніж у нетрансформованих коренях (у 1,8 та 3,1 рази відповідно).

Генетична трансформація призводила до збільшення рівня протирадикальної активності екстрактів у 100% ліній *A. annua*. Так, екстракт трансгенної лінії №1, отриманої за допомогою дикого штаму А4, проявляв

протирадикальну активність у 2,4 рази вищу, ніж екстракт нетрансформованих коренів цього виду, і складав  $93,2 \pm 5\%$  (при  $39,4 \pm 6,4\%$  у екстракті нетрансформованих коренів *A. annua*).

Отже, як видно з отриманих даних, зміна протирадикальної активності у відповідь на генетичну трансформацію є видоспецифічним параметром. Антиоксидантна активність трансгенних ліній також не залежала від використаного вектора [447].

Створення рослин-продуцентів антиоксидантних сполук представляє інтерес для фармацевтичної індустрії, оскільки такі сполуки є активними і в клітинах людини, захищаючи їх від окисного стресу. Лікарські рослини можуть слугувати сировиною для досягнення цієї мети. До них належать і рослини полину. Серед рослин роду *Artemisia* є чимало видів, які можуть бути використані в якості терапевтичних агентів. Зокрема, рослини роду *Artemisia* проявляють антимікробну [329], противірусну активності [328], спазмолітичну дію [336], тощо. Нетрансформовані рослини роду *Artemisia* вже розглядали як потенційні джерела сполук з антиоксидантними властивостями у ряді робіт. [442, 448-449]. Також було продемонстровано можливість використання екстрактів рослин полину звичайного *A. vulgaris* для підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту у пацієнтів [448], що робить рослини цього виду потенційним джерелом сполук фармакологічного призначення.

У 2016 році Dilshad et al. [450] показали, що до змін у накопиченні сполук-антиоксидантів у рослинах *A. carvifolia* можуть призводити *rol* гени агробактерій, при їх перенесенні за допомогою *A. tumefaciens*. Раніше, Shkryl et al [21] на прикладі *Rubia cordifolia* продемонстрували, що *rol* гени є потужними індукторами метаболізму і у багатьох випадках можуть призводити до накопичення вторинних метаболітів. Підвищення антиоксидантної активності на 31-50% показано також для трансгенних коренів *Lactuca serriola* [451].

Застосування біотехнологічних підходів дозволяє у ряді випадків підвищити рівень накопичення у клітинах рослин сполук з цінними лікувальними властивостями, зокрема, антиоксидантів. Наприклад, у трансгенних рослин



тютюну, отриманих за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, підвищувалась активність пероксидази порівняно з нетрансформованими рослинами [452], а в клітинах *Rubia cordifolia*, *Panax ginseng* та *Arabidopsis thaliana* з експресованим *rolB* геном спостерігали підвищення експресії генів пероксидази, супероксиддисмутази та каталази, що свідчило про зміну антиоксидантного статусу рослини внаслідок генетичної трансформації [453]. Підвищення антиоксидантної активності на 31-50% після агробактеріальної трансформації без участі генів, що впливають на синтез сполук-антиоксидантів, показано також для трансгенних коренів *Lactuca serriola* [451]. У 2016 році Dilshad et al. [450] продемонстрували зміни у накопиченні сполук-антиоксидантів у рослинах *A. carvifolia* після перенесення *rol* генів агробактерій за допомогою *A. tumefaciens*.

Дослідження протирадикальної активності екстрактів з нетрансформованих та трансгенних коренів *A. vulgaris*, *A. dracunculoides* та *A. annua* та показали, що *A. rhizogenes*-опосередкована генетична трансформація може бути використана як метод посилення природньої протирадикальної активності представників цього роду.

Таким чином, культура «бородатих» коренів рослин роду *Artemisia* може виступати в якості джерела природних антиоксидантів рослинного походження.

**3.3.7. Визначення противірусної активності.** Використання специфічних генів у складі векторної конструкції для генетичної трансформації дозволяє цілеспрямовано надавати рослинам нові ознаки. Через це метод генетичної трансформації використовується у біотехнології з метою створення трансгенних культур, які продукують природні та рекомбінантні біологічно активні сполуки. До них належать і білки з противірусною дією, як, наприклад, білки-інтерферони. Людські інтерферони утворюються в клітинах після стимуляції вірусами, іншими патогенними агентами (бактеріями), а також іноді й речовинами ендогенного походження [274]. Унікальні біологічні функції

інтерферонів обумовлюють терапевтичне застосування цих білків при лікуванні тяжких вірусних захворювань, зокрема гепатиту.

Для екстрактів деяких видів полину (*A. morrisonensis*, *A. annua*, *A. incana*, *A. chamaemelifolia*, *A. fragrens* and *A. persica*) *in vitro* було показано протівірусну активність [454-455]. Вивчення протівірусної активності трансгенних коренів рослин різних видів роду *Artemisia*, що несуть ген інтерферону *ifn- $\alpha$ 2b* людини, становить фундаментальний інтерес з можливим практичним застосуванням результатів дослідження, зокрема у медицині та косметології.

У цій роботі ми дослідили протівірусну активність коренів рослин роду *Artemisia*, які було отримано шляхом генетичної трансформації з використанням гена інтерферону *ifn- $\alpha$ 2b* людини (рис. 3.20).

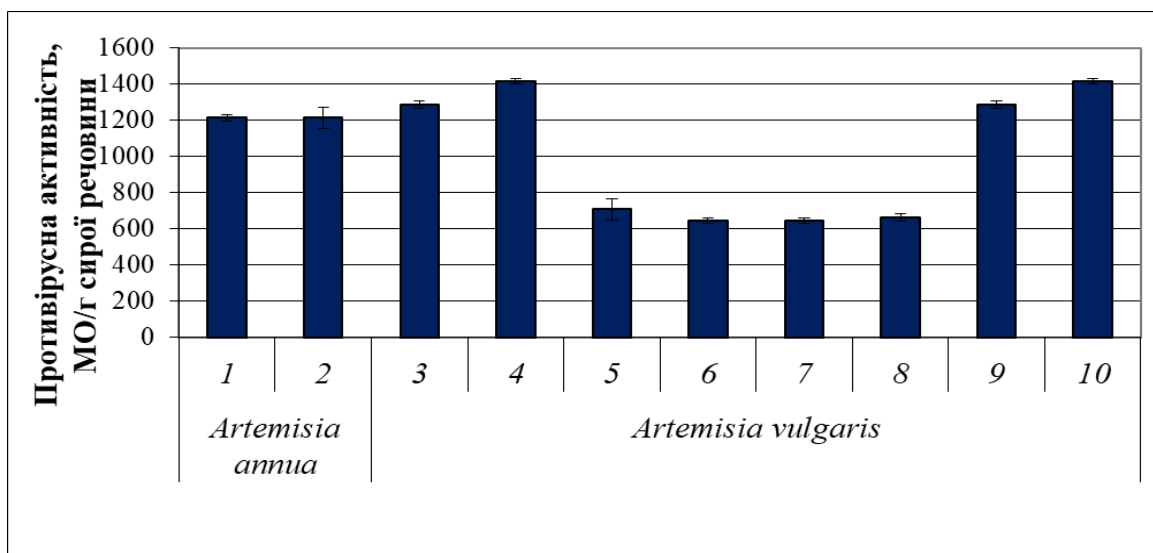


Рис. 3.20. Протівірусна активність екстрактів «бородатих» коренів *Artemisia* проти вірусу везикулярного стоматиту при тестуванні на перевивній культурі кітин тестикул поросят:

1-10 – протівірусна активність екстрактів з «бородатих» коренів полину; К – протівірусна активність екстрактів з коренів контрольних рослин

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

відповідно [456-457]. Такі суттєві відмінності, очевидно, є видоспецифічними та пов'язані з місцем вбудовування та активністю перенесеного гена інтерферону. Слід зазначити, що екстракти з контрольних рослин противірусної активності при тестуванні на клітинах ПТП проти вірусу везикулярного стоматиту не мали.

Відомо, що у рослинах полину синтезується артемізинін, який має не тільки протималарійну, але й противірусну активність. Нами раніше було визначено, що трансгенні корені *A. vulgaris* накопичують артемізинін у кількості до 0,001% сухої речовини, а «бородаті» корені *A. annua* — до 0,0016% сухої речовини. Однак, відмінності у виявленій нами активності проти вірусу везикулярного стоматиту у різних лініях та видах полину, вірогідно, не пов'язані з відмінностями у синтезуванні артемізиніну у цих досліджуваних рослинних зразках. Натомість, відмінності у противірусній активності можуть бути видоспецифічними та пов'язані з особливостями структури білка інтерферону, синтезованого у рослинах різних видів виходячи з видових особливостей метаболізму та синтезу вторинних метаболітів і інших сполук.

Стандартний зразок рекомбінантного інтерферону-а2b людини в усіх експериментах проявляв високу противірусну активність в обраній культурі клітин, що свідчило про чутливість до інтерферону клітин ПТП.

Відомо, що екстракти з трансгенних рослин, до яких перенесено ген інтерферону людини, можуть проявляти противірусну активність [458]. У трансгенних рослинах моркви [360] та женьшеню [459] рівень противірусної активності рослинних екстрактів сягав до 50000 МО/г сирової речовини та 60000 МО/мл відповідно.

Такі широкі межі противірусної активності, вірогідно, пов'язані з видоспецифічністю синтезу інтерферону, а також з відмінностями у способах його екстрагування та тестування на різних культурах клітин. Противірусна активність залежить від типу (корені, листки, насіння) та віку досліджуваного матеріалу (наприклад, молоді або зрілі листки [360]), а також може значно відрізнятися у рослинах різних видів.

Таким чином, було виявлено як міжвидові відмінності у противірусній активності, так і відмінності серед екстрактів різних трансгенних ліній в межах одного виду. Ці відмінності можуть бути як наслідком *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації, так і фізіологічними особливостями кожного виду.

Результати, подані у цьому розділі, опубліковані у таких працях:

*Статті:*

1. **Drobot K.** Artemisinin content in *Artemisia vulgaris* L. *in vitro* cultivated plants and “hairy” roots / **K. Drobot**, A. Ostapchuk, N. Matvieieva // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research , education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2016. – № 1 – P. 518-520.
2. Study of artemisinin and sugars accumulation in *Artemisia vulgaris* and *Artemisia dracunculus* "hairy" root cultures / **K. Drobot**, N. Matvieieva, A. Ostapchuk, M. Kharkhota // Preparative Biochemistry and Biotechnology – 2017 – Vol.47, №8. – P. 776-781.
3. Порівняльна оцінка вмісту поліфруктанів у бородатих коренях та рослинах роду *Artemisia* / В.П. Дуплій, **К.О. Дробот**, Я.І. Ратушняк, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика – 2017. – Т.49, №4. – С. 321-327.
4. Вплив *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст біологічно активних сполук у трансгенних коренях *Artemisia vulgaris* / **К.О. Дробот**, А.М. Остапчук, В.П. Дуплій, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика. – 2016. – Т. 48, № 5. – С. 450-455.
5. Artemisinin and total flavonoid content in *in vitro* cultivated *Artemisia annua* L. “hairy” root culture / **K. Drobot**, N. Matvieieva, M. Kharkhota, A. Shakhovsky, Ya. Ratushnyak // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development

programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality». – 2017. – № 1 – P. 91-94.

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

7. Flavonoids content in sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) “hairy” root culture / **К.О. Drobot**, N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky // Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June, 2017 – Kyiv, 2017. – P.67.

8. Матвєєва Н.А. Противірусна активність екстрактів трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* / Н.А. Матвєєва, **К.О. Дробот**, О.П. Трохименко // Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості», 17-18 жовтня, 2017 р. – Харків, 2017. – С 68-71

9. “Hairy” root cultures as a source of biologically active substances / N. Matvieieva , **К. Drobot** , A. Shakhovsky , A. Ostapchuk, Yu. Kudryavets // International Conference «Smart Bio», 18-20 May, 2017. – Каунас, 2017. – P. 38

### 3.4. Вибір ліній-продуцентів біологічно активних сполук

Ми визначали вміст біологічних сполук (артемізиніну, флавоноїдів, фруктанів, інуліну) у рослинах полину трьох видів: *A. annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris*. У результаті роботи було отримано ряд ліній трансгенних коренів зазначених видів зі збільшеним вмістом біологічно активних сполук. Окрім того, важливим параметром відбору продуктивних ліній була швидкість росту.

За параметром накопичення фруктанів (рис. 5.1) ми відібрали лінії *A. vulgaris* №2, №3 та №6 (136,1 мг/г, 129,6 мг/г та 111 мг/г відповідно), *A. annua* №1 (160,8 мг/г), а також *A. dracunculus* №3 (181,3 мг/г) та №4 (132,7 мг/г).

Вміст сахарози (рис 5.3) був вищим за такий у контролі у трансгенній лінії *A. vulgaris* №2 (40,2 мг/г). Одна з ліній *A. dracunculus* №3 накопичувала фруктозу майже втричі більше, ніж корені нетрансформованих рослин (48,3 мг/г).

Найбільший вміст інуліну було зафіксовано у лінії «бородатих» коренів *A. vulgaris* №3 (70,07 мг/г) та лінії №2 у *A. dracunculus* (79,79 мг/г) (рис 5.4). За вмістом флавоноїдів було відібрано *A. vulgaris* 45,3 мг/г *A. annua* 35,6 мг/г, *A. dracunculus* 15,6 мг/г сухої речовини. Відібрано лінії кожного з видів з найвищим вмістом артемізиніну: *A. annua* (1,64 мг/г), *A. vulgaris* (1,02 мг/г) та *A. dracunculus* (1,05 мг/г).

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

Таблиця 3.4.

**Відібрані лінії «бородатих» коренів полину та вміст біологічно активних сполук у них**

Вид	<i>A. vulgaris.</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. dracunculus</i>
Вміст фруктанів, мг/г сух м	111	160,8	132,7
Вміст флавоноїдів, мг/г сух м	45,3	35,6	15,6
Вміст артемізиніну, мг/г сух м	1,02	1,64	1,05
Приріст сухої маси за 21 добу, г	0,15	0,104	0,035

Екстракти з досліджуваних ліній коренів проявляли антиоксидантну та протівірусну активності.

З огляду на підвищений вміст фруктанів, флавоноїдів та артемізиніну у порівнянні з таким у коренях нетрансформованих рослин, а також на біологічну активність екстрактів з цих коренів, відібрані лінії «бородатих» коренів *Artemisia* spp. можуть слугувати джерелом біологічно активних сполук.

## АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сучасні біотехнології дозволяють створювати рослини з корисними властивостями задля потреб людства. Одним з напрямків біотехнології є збільшення продуктивності рослин з метою накопичення у них біологічно активних сполук. Використання природніх популяцій рослин в якості джерел біологічно активних сполук не завжди є можливим та доцільним, а також не дозволяє отримати велику кількість рослин за короткий проміжок часу. Подолати ці обмеження дозволяють інструменти біотехнології, зокрема генетична трансформація.

Така трансформація може бути здійснена за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* — фітопатогену, який інфікує рослини у природніх умовах. Результатом інфікування є формування у місці інфекції так званих «бородатих» коренів. Цю природну властивість агробактерій використовують у біотехнологічних дослідженнях для отримання культури «бородатих» коренів. Трансформовані корені здатні продукувати біологічно активні сполуки, тому їх можна використовувати як джерело таких сполук. Особливий інтерес становить отримання «бородатих» коренів лікарських рослин, зокрема, рослин полину.

Зважаючи на багатий фітохімічний склад рослин *Artemisia* spp., а також на брак робіт з ініціювання та дослідження культури «бородатих» коренів деяких представників *Artemisia* spp, у даній роботі було проведено комплексне вивчення впливу *A. rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації на вміст та накопичення біологічно активних сполук у трансформованих коренях представників цього роду — *A. annua*, *A. vulgaris* та *A. dracuncululus*; вивчення біологічної активності екстрактів з цих коренів (антиоксидантної та противірусної активностей), а також дослідження вмісту БАС (флавоноїдів, фруктанів, інуліну, складу цукрів та артемізиніну).

Представлені у цій роботі дослідження умовно можна розділити на три блоки:



1. Уведення рослин *Artemisia* в культуру *in vitro* та оптимізація мікроклонального розмноження цих рослин з метою отримання стерильного матеріалу для подальших досліджень;

2. Генетична трансформація *A. annua*, *A. vulgaris* та *A. dracuncululus* з метою створення колекції культур «бородатих» коренів;

3. Дослідження фізіологічних та біохімічних особливостей нетрансформованих та «бородатих» коренів *Artemisia*, а також відбір найбільш продуктивних ліній – джерел БАС.

У першому блоці дисертаційної роботи подано результати досліджень щодо уведення в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння. Показано, що методика стерилізації за використання водного розчину хлорвмісного препарату «Білизна» була ефективною та призводила до проростання до 100% насіння. З метою мультиплікації рослинного матеріалу та прискорення мікроклонального розмноження було досліджено вплив регуляторів росту рослин на швидкість росту проростків. За результатами роботи показано, що додавання регуляторів росту БАП та НОК у концентрації 0,5 та 0,05 мг/л відповідно призводило до прискорення формування нових пагонів у всіх трьох досліджуваних видах.

Другий блок роботи було присвячено створенню культур «бородатих» коренів досліджуваних рослин полину шляхом генетичної трансформації; проведенню ПЛР-аналізу з метою підтвердження перенесення генів. Даний етап був важливим у роботі, оскільки наявність ефективною методики дозволяє скорочувати час, необхідний для створення трансформованих ліній, а також отримувати максимальну кількість кореневих ліній. Показано, що за описаних умов трансформації та використання оптимального типу експланту (листки) можна отримати «бородаті» корені полину з частотою до 100%.

Проведені дослідження з генетичної трансформації є важливими з огляду на те, що досі роботи з генетичної трансформації естрагону (*A. dracuncululus*) відсутні у науковій літературі. Є лише одна публікація з трансформації рослин *A. vulgaris* з використанням *A. rhizogenes*. У роботі вперше показано можливість отримання

«бородатих» коренів полину з геном, який кодує синтез інтерферону людини *ifn- $\alpha$ 2b* — сполуки, яка має лікувальні властивості. Перенесення *rol* генів агробактерій було підтверджено результатами ПЛР-аналізу для усіх «бородатих» коренів. Також за результатами ПЛР було підтверджено наявність гену *ifn- $\alpha$ 2b* у коренях, що були отримані після трансформації *A. rhizogenes* A4 з векторами pCB124 або pCB161.

Робота, викладена у третьому блоці дисертації, була спрямована на дослідження фізіологічних та біохімічних особливостей «бородатих» коренів рослин роду *Artemisia*. Ці корені можна розглядати як біореактор для накопичення БАС: вони невибагливі до умов вирощування, не потребують додавання екзогенних регуляторів росту рослин, додаткового освітлення, їм притаманні висока ступінь галуження та генетична стабільність. Тому для оцінки можливості використання культури «бородатих» коренів полину у якості джерела біологічно активних сполук ми дослідили швидкість росту таких коренів, вплив регуляторів росту на приріст маси, особливості накопичення артемізиніну, флавоноїдів, вуглеводів (моно- та дицукрів, фруктанів, інуліну) у трансгенних коренях, а також біологічну активність екстрактів (антиоксидантну та протівірусну активності).

«Бородаті» корені різних видів відрізнялись за морфологією. Так, корені естрагону значно галузились та відрізнялись вираженим негативним геотропізмом, у той час як корені полину звичайного вросли у середовище, та мало галузились. Корені також відрізнялися за швидкістю росту. Найбільш високі темпи росту були притаманні трансформованим кореням *A. vulgaris* та *A. annua*, в той час як кореням *A. dracunculoides* був характерний більш повільний темп росту. Варіабельність цього параметру всередині кожного виду була значною та не залежала від використаного вектора. Слід відзначити, що застосування індолілоцтової та індоділмасляної кислот у живильних середовищах пришвидшувало ріст «бородатих» коренів та збільшувало приріст маси. Вірогідно, такі відмінності у швидкості росту можуть бути проявом особливостей

у накопиченні сполук вторинного метаболізму у різних лініях трансгенних коренів, що дає підстави для дослідження останніх.

Відомо, що генетична трансформація може призводити до змін у клітинному метаболізмі. Тому ми досліджували вплив трансформації на вміст БАС у «бородатих» коренях полину. Виявлено збільшення вмісту фруктанів (у «бородатих» коренях *A. annua* та *A. dracuncululus*), артемізиніну (*A. vulgaris*) та флавоноїдів (*A. annua* та *A. vulgaris*). У той же час, спостерігалось зменшення вмісту інуліну у всіх досліджуваних лініях коренів. Окрім того, у результаті генетичної трансформації було показано можливість отримання нехарактерних для контрольних коренів сполук у деяких лініях «бородатих» коренів *A. vulgaris* та *A. dracuncululus*, зокрема, манітолу та галактози.

Результатом трансформації було збільшення антиоксидантної активності у 50% коренів, а також поява противірусної активності у коренях, які були трансформовані вектором з геном синтезу інтерферону *ifn- $\alpha$ 2b*. З огляду на це можна зробити висновок, що *Agrobacterium*-опосередковану генетичну трансформацію можна використовувати в якості інструменту для підвищення вмісту цінних сполук у трансгенних коренях рослин роду *Artemisia*, а отримані в результаті такої трансформації культури «бородатих» коренів можуть бути джерелом біологічно активних сполук.

## ВИСНОВКИ

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

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

галактози (*A. dracunculus*) у кількості до  $18.72 \pm 0.20$  мг/г та  $0,9 \pm 0,07$  мг/г сухої речовини відповідно.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clive J. Global Status of Commercialized Biotech [Електронний ресурс] / James Clive // ISAAA Brief. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/download/isaaa-brief-49-2014.pdf>.
2. Goddijn J.P. Plants as bioreactors / J.P. Goddijn, J.M. Oscar // Trends Biotechnol. – 1995. – Vol. 13, № 9. – P. 379–387.
3. Weathers P.J. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products / P.J. Weathers, M.J. Towler, J. Xu // Appl Microbiol Biotechnol. – 2010. – Vol. 85. – P. 1339–1351.
4. Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge / V. Gomord, C. Sourrouille, A.-C. Fitchette [et al.] // Plant Biotechnol J. – 2004. – Vol. 2, № 2. – P. 83–100.
5. Boyhan D. Low- cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C- peptide / D. Boyhan, H. Daniell // Plant Biotechnol J. – 2011. – Vol. 9, № 5. – P. 585–598.
6. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue / A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson [et al.] // Plant Mol Biol. – 1986. – Vol. 6. – P. 347–357.
7. Willis J. Transgenic Plant-Produced Hydrolytic Enzymes and the Potential of Insect Gut-Derived Hydrolases for Biofuels / J. Willis, M. Mazarei, C. Stewart // Front Plant Sci. – 2016. – Vol. 7, № 675. – P. 1–18.
8. *Arabidopsis* Cytochrome P450 Monooxygenase 71A13 Catalyzes the Conversion of Indole-3-Acetaldoxime in Camalexin Synthesis / M. Nafisi, S. Goregaoker, C. Botanga [et al.] // The Plant Cell. – 2007. – Vol. 19, № 6. – P. 2039–2052.
9. Schillberg S. Molecular farming of recombinant antibodies in plants / S. Schillberg, R. Fischer, N. Emans // Cell Mol Life Sci. – 2003. – Vol. 60. – P. 433–445.

10. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris* / T. De Myer, B. Laukens, J. Nolf [et al.] // Plant Biotechnol J. – 2015. – Vol. 13. – P. 938–947.
11. Rybicki E. Plant-produced vaccines: promise and reality / E. Rybicki // Drug Discov Today. – 2009. – Vol. 14. – P. 16–24.
12. Yao J. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges / J. Yao, Y. Weng, A. Dickey // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol. 16, № 12. – P. 28549–28565.
13. Кунах В. А. Основні напрями біотехнології рослин // Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Под ред. В. А. Кунаха. – К.: Логос, 2005. – С. 730.
14. *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genome of the host plant root cells / M. Chilton, D. Tepfer, A. Petit [et al.] // Nature. –1982. – Vol. 295. – P. 432–434.
15. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool / S.B. Gelvin // Microbiol Mol Biol Rev. –2003. – Vol. 67, № 1. – P. 16–37.
16. Christey M.C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants / M.C. Christey // In Vitro Cell Develop Biol. – 2001. – Vol. 37. – P. 687–700.
17. Shanks J. V. Plant “hairy root” culture / J. V. Shanks, J. Morgan // Curr. Opin. Biotechnol. – 1999. – Vol. 10, № 2. – P. 151–155.
18. Zhou M-L. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant “hairy root” culture / Zhou Mei-Liang, Zhu Xue-Mei, Shao Ji-Rong // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 90, № 4. – P. 1229–1239.
19. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua* / A. Giri, S. Ravindra, V. Dhingra [et al.] // Curr. Sci. – 2001. – Vol. 81. – P. 378–382.

20. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: implications for metabolic engineering / J. V. Shanks, R. Bhadra, J. Morgan [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 1998. – Vol. 58. – P.333–338.
21. Individual and combined effects of the *rolA*, *rolB*, and *rolC* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli / Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2008. – Vol. 100. – P. 118–125.
22. Thwe A. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) / A. Thwe, M. Valan Arasu, X. Li [et al.] // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 318.
23. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities / Q-Y. Gai, J. Jiao, M. Luo [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – ID. e0119022.
24. Kim Y.B. *Production of triterpenoid saponin in hairy root cultures of Silene vulgaris* / YB Kim, DW Reed, PS Covello // *Nat Prod Commun.* – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. 1919–1922.
25. Ruiz-May E. Differential secretion and accumulation of *terpene* indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate / E. Ruiz-May, R. M. Galaz-Avalos, V. M. Loyola-Vargas // *Mol Biotechnol.* – 2009. – Vol. 41, № 3. – P. 278–285.
26. Wongsamuth R. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots / R. Wongsamuth, P. M. Doran // *Biotechnol Bioeng.* – 1997. – Vol. 54. – P. 401–415.
27. *Edible vaccines*: current status and future / P. Lal, V. Ramachandran, R. Goyal [et al.] // *Indian J Med Microbiol.* – 2007. – Vol.25, № 2. – P. 93–102.
28. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals / H. Daniell, N. Singh, H. Mason [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14, № 12. – P. 669–679.



29. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs / C. Veeresham // J Adv Pharm Technol Res. – 2012. – Vol. 3, № 4. – P. 200–201.
30. Dias D. A historical overview of natural products in drug discovery / D. Dias, S. Urban, U. Roessner // Metabolites. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 303–336.
31. Ivanescu B. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis / B. Ivanescu, A. Miron, A. Corciova // J Anal Methods Chem. – 2015. – ID: 2015:247685.
32. Comparison of *Artemisia annua* bioactivities between traditional medicine and chemical extracts / A. Nageeb, A. Al-Tawashi, A-H. Mohammad Emwas [et al.]. // Curr Bioact Compounds. – 2013. – Vol. 9, № 4. – P. 324–332.
33. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France / F. Juteau, I. Jerkovic, V. Masotti [et al.] // Planta Med. – 2003. – Vol. 69. – P. 158–161.
34. Joshi R.K. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India / R.K. Joshi // Pharm Biol. – 2013. – Vol. 51, № 7. – P. 888–892.
35. Bora K. S. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury / K.S. Bora, A.Sharma // J Ethnopharmacol. – 2010. – Vol. 129, № 3. – P. 403–409.
36. Characteristics, clinical effect profile and tolerability of a nasal spray preparation of *Artemisia abrotanum* L. for allergic rhinitis / P. Remberg, L. Björk, T. Hedner [et al.] // Phytomed. – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 36–42.
37. Chemical characterization by GC-MS and *in vitro* activity against *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia dracuncululus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris* / D. Obistioiu, R. T.Cristina, I. Schmerold // Chem Cent J. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 6.
38. *In vitro* activity of *Artemisia abrotanum* extracts against *Malassezia Spp.*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* / K. Brodin, H. Alahyar, T. Hedner [et al.] // Acta Derm Venereol. – 2007. – Vol. 87, № 6. – P. 540–542.

39. Extracts of *Artemisia abrotanum* and *Artemisia absinthium* inhibit growth of *Naegleria fowleri* *in vitro* / J. Mendiola, M. Bosa, N. Perez [et al.] // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 1991. – Vol. 85, № 1. – P. 78–79.
40. Abad M. J. The *Artemisia* L. Genus: a review of bioactive essential oils / M. J. Abad, L. M. Bedoya // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 2542–2566.
41. Su X. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine / X. Su, L. H. Miller // *Science China Life sciences.* – 2015. – Vol. 58, № 11. – P.1175–1179.
42. Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (*cyp71av1*) and cytochrome P450 reductase (*cpr*) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae) / Q. Shen, Y. F. Chen, T. Wang [et al.] // *Genet Mol Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 3298–3309.
43. Enhancement of artemisinin biosynthesis by overexpressing *dxr*, *cyp71av1* and *cpr* in the plants of *Artemisia annua* L. / L. E. Xiang, L. X. Zeng, Y. Yuan [et al.] // *Plant Omics J.* – 2012. – Vol. 5. – P. 503–507.
44. Promotion of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* by overexpressing *ADS*, *CYP71AV1* and *CPR* genes / X. Lu, Q. Shen, L. Zhang [et al.] // *Ind Crop Prod.* – 2013. – Vol. 49. – P. 380–385.
45. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing / L. Zhang, F. Y. Jing, F. P. Li [et al.] // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2009. – Vol. 52. – P. 199–207.
46. Artemisinin biosynthesis enhancement in transgenic *Artemisia annua* plants by downregulation of the beta-caryophyllene synthase gene / J. L. Chen, H. M. Fang, Y. P. Ji [et al.] // *Planta Med.* – 2011. – Vol. 77. – P. 1759–1765.
47. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer / J. F. S. Ferreira, D. L. Luthria, T. Sasaki [et al.] // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15. – P. 3135–3170.
48. Vergauwen R. Properties of Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferases from Chicory and Globe Thistle, Two Asteracean Plants Storing Greatly Different

- Types of Inulin / R. Vergauwen, A. Van Laere, W. Van den Ende // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 133, № 1. – P. 391–401.
49. Pollock C.J. Fructan metabolism in grasses and cereals / C.J. Pollock, A.J. Cairns // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 42, № 1. – P. 77–101.
50. Effects of different carbohydrate sources on fructan metabolism in plants of *Chrysoleaena obovata* grown *in vitro* / Trevisan F, Oliveira VF, Carvalho MAM [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – ID: 2015.00681.
51. Hughes R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon / R. Hughes, I.R Rowland. // *Carcinogen*. – 2001. – Vol. 22, № 1. – P. 43–47.
52. Kelly G. Inulin-type prebiotics: a review / G. Kelly // *Alternative Medicine Review*. – 2008. – Vol. 13, № 4. – P. 315–329.
53. Roberfroid M. B. Introducing inulin-type fructans / M. B. Roberfroid // *British Journal of Nutrition*. – 2005. – Vol. 93, № 1. – P. 13–25.
54. Kaur N. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition / N. Kaur, A. K. – // *Journal of Bioscience*. – 2002. – Vol. 27, № 7. – P. 703–714.
55. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and Essential oil analysis / G. Sujatha, S. Zdravkovic-Korac, D. Calic [et al.] // *Industrial Crops and Prod.* – 2013. – Vol. 44, №1. – P. 643–652.
56. Genetic Transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with *rol* Genes Enhances Artemisinin Accumulation / E. Dilshad, R. M. Cusido, K. R. Estrada [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, №10. – ID: e0140266.
57. Morsy, N. M. Phytochemical analysis of biologically active constituents of medicinal plants / Morsy, N. M. // *Main Group Chem*. – 2014. – Vol. 13, № 7–21.
58. Pyrethrins protect pyrethrum leaves against attack by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* / Yang T, Stoopen G, Wieggers G [et al.] // *J Chem Ecol*. – 2012. – Vol. 38, № 4. – P. 370–377.

59. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds / S. Sreekumar, H. Sithul, P. Muraleedharan [et al.] // BioMed Research International. – 2014. – Vol. 1. – Article ID 686921.
60. Svarcova I. Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea* / I. Svarcova, J. Heinrich, K. Valentova // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. – 2007. – Vol. 151, № 2. – P. 163–174.
61. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review / A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E-M. Pferschy-Wenzig [et al.] // Biotechnology advances. – 2015. – Vol. 33, № 8. – P.1582–1614.
62. Hefferon K. Plant biotechnology patents: applications in agriculture and medicine / K. Hefferon // Recent Pat Biotechnol. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 136–152.
63. Molecular farming of recombinant antibodies in plants / S. Schillberg, R.Fischer, N. Emans [et al.] // Cell Mol. Life Sci. – 2003. – Vol. 60. – P. 433–445.
64. Goldstein D. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants / D. Goldstein, J. Thomas // QJM. – 2004. – Vol. 97. – P. 705–716.
65. Sharma A. Transgenic plants as bioreactors / A. Sharma, D. Jani, A. Tyagi // Ind J Biotechnol. – 2004. – Vol. 3. – P. 274–290.
66. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens / S. Tiwari, P. C. Verma, P. K. Singh [et al.] // Biotech adv. – 2009. – Vol. 27, № 4. – P. 449–467.
67. Advancements in the production of secondary metabolites / Vijaya SN, Udayasri PV, Aswani KY [et al.] // J Nat Prod. – 2010. – Vol. 3. – P. 112–123.
68. Rodney C. Natural Products (secondary metabolites) / C. Rodney, M. Toni, N.Kutchan [et al.] // Biochemistry and molecular biology of plants. – 2000. – P. 1253–1348.
69. Phillips R. L. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls / R. L. Phillips, S. M. Kaeppler, P. Olhoft // Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America. 1994. – Vol. 91, № 12. – P. 5222–5226.
70. George J. Biotechnological production of plant-based insecticides / J. George, H. P. Bais, G.A. Ravishankar // *Crit Rev Biotechnol.* – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 49–77.
71. Fischer R. Production of antibodies in plants and their use for global health / R. Fischer, R. Twyman., S. Schillberg. // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21, № 7–8. – P. 820–825.
72. Overexpression of *Medicago sativa* TMT elevates the  $\alpha$ -tocopherol content in *Arabidopsis* seeds, alfalfa leaves, and delays dark-induced leaf senescence / J. Jiang, H. Jia, G. Feng [et al.] // *Plant science.* – 2016. – Vol. 249. – P. 93–104.
73. GmTMT2a from soybean elevates the  $\alpha$ -tocopherol content in corn and *Arabidopsis* / L. Zhang, Y. Luo, Y. Zhu [et al.] // *Transgenic Res.* – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 1021–1028.
74. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm / X. Ye, S. Al-Babili, A. Klöti [et al.] // *Science.* – 2000. – Vol. 287. – P. 303–305.
75. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet / R. Sévenier, R. Hall, I. M. van der Meer [et al.] // *J Nat Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16, № 9. – P. 843–846.
76. T. Yoshihara. Development of Iron-Rich Crops by Genetic Engineering / T. Yoshihara, F. Goto, T. Masuda [et al.] // *Impacts of agriculture on human health and nutrition* – Vol. II. – P. 138–141.
77. DellaPenna D. Biofortification of plant-based food: enhancing folate levels by metabolic engineering / D. DellaPenna // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Vol. 104, № 10. – P. 3675–3676.
78. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants / O. Edelbaum, D. Stein, N. Holland [et al.] // *J Interferon Res.* – 1992. – Vol. 12, № 6. – P. 449–453.

79. Brodsky B. Shining Light on Collagen: Expressing Collagen in Plants / B. Brodsky, D.L. Kaplan // *Tissue Engineering Part A*. – 2013. – Vol. 19, № 13–14. – P. 1499–1501.
80. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds / C. Nykiforuk, G. Boothe, J. Murray [et al.] // *Plant Biotechnology Journal*. – 2006. – Vol. 4. – P. 77–85.
81. Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants / G. Stefanova, M. Vlahova, A. Atanassov // *Biol Plant*. – 2008. – Vol. 52. – P. 423–430.
82. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts / J. M. Staub, B. Garcia, J. Graves [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2000. – Vol. 18, № 3. – P. 333–338.
83. Expression of the human milk protein  $\alpha$ -casein in transgenic potato plants / D. Chong, W. Roberts, T. Arakawa [et al.] // *Transgenic Res*. – 1997. Vol. 6. – P. 289–296.
84. Control of foreign polypeptide localization in specific layers of protein body type I in rice seed / A. Sasou, T. Shigemitsu, Y. Saito [et al.] // *Plant Cell Rep*. – 2016. – Vol. 35. – P. 1287–1295.
85. Expression and functional validation of heat-labile enterotoxin B (LTB) and cholera toxin B (CTB) subunits in transgenic rice (*Oryza sativa*) / Soh HS, Chung HY, Lee HH [et al.] // *Springer Plus*. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 148.
86. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris* / De Myer T, Laukens B, Nolf J [et al.] // *Plant Biotechnol J*. – 2015. – Vol. 13, № 7. – P. 938–947.
87. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor* / K. M. Cox, J. D. Sterling, J. T. Regan [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2006. – Vol. 24, № 12. – P. 1591–1597.
88. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes / C. Tacket, H. Mason, G. Losonsky [et al.] // *J Infect Dis*. – 2000. – Vol. 182. – P. 302–305.

89. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1 / V. Yusibov, A. Modelska, K. Steplewski [et al.] // Proc Natl Acad Sci. – 1997. – Vol. 94, № 11. – P. 5784–5788.
90. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life / S. Khan, M. W. Ullah, R. Siddique [et al.] // International Journal of Genomics. – 2016. – ID: 2016:2405954.
91. Use of Somatic Hybridization to Transfer Resistance to Late Blight and Potato Virus Y (PVY) into Cultivated Potato / R. Thieme, U. Darsow, L. Rakosy-Tican [et al.] // Plant Breeding and Seed Science. – 2004. – Vol. 50, № 1. – P. 113–118.
92. Johnson R. Somatic Hybridization and Application in Plant Breeding / R. Johnson, R. Veilleux // Plant Breeding Rev 20, John Wiley & Sons. – 2001. – P. 167–225.
93. Navrátilová B. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae—a review / B. Navrátilová // Hortic. Sci. – 2004. – Vol. 31. – P. 140–157.
94. Fertile introgression products generated via somatic hybridization between wheat and *Thinopyrum intermedium* / Li, C., Cheng, A., Wang, M [et al.] // Plant Cell Rep. – 2014. – Vol. 33. P. 633.
95. Somatic hybrid plants of *Nicotiana* × *sanderiae* (+) *N. debneyi* with fungal resistance to *Peronospora tabacina* / Patel D, Power JB, Anthony P [et al.] // Annals of Botany. – 2011. – Vol. 108, № 5. – P. 809–819.
96. Somatic hybrid plants between sexually incompatible species of the genus *Nicotiana* / D. A. Evans, C. E. Flick, R. A. Jensen // Science. – 1981. – Vol. 213. – P. 907–909
97. Bravo, J. E. Protoplast fusion for crop improvement / J. E. Bravo, D. A. Evans // Plant Breeding Rev. – 1985. – Vol. 3. – P. 193–218.
98. Analysis of Remote Asymmetric Somatic Hybrids between Common Wheat and *Arabidopsis thaliana* / J. Deng, H. Cui, D. Zhi [et al.] // Plant Cell Reports. – 2007. – Vol. 26, №. 8. – P. 1233–1241.

99. Lorence A. Gene Transfer and Expression in Plants / A. Lorence, R. Verpoorte // Recombinant Gene Expression. Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 267. – P. 329–350.
100. Moustafa K. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations / K. Moustafa, A. Makhzoum, J. Trémouillaux-Guiller // Crit Rev Biotechnol. – 2016. – Vol. 36, № 5. – P. 840–850.
101. Liu Y.-C. Efficient Polyethylene Glycol (PEG) Mediated Transformation of the Moss *Physcomitrella patens* / Y.-C. Liu, L. Vidali // J Vis Exp. – 2011. – Vol. 50. – P. 25-60.
102. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells / T.M. Klein, E.D. Wolf, R. Wu [et al.] // Nature. – 1987. – Vol. 327, № 6117. – P. 70 – 73.
103. Alsaggar M. Physical methods for gene transfer / Alsaggar M, Liu D // Adv Genet. 2015;89:1-24.
104. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus / G. Ishigaki., T. Gondo, K. Suenaga [et al.] // J. Plant Physiol.– 2012. – Vol. 169, № 5. – P. 546–549.
105. Coonrod A. On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses / A. Coonrod, F.-Q. Li, M. Horwitz // Gene Therapy. – 1997. – Vol. 4. – P. 1313–132
106. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis / M.D. Chilton, M.H. Drummond, D.J. Merlo [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1977. – Vol. 11, № 2. – P. 263 – 271.
107. T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants / B. Ulker, Y. Li, M. G. Rosso [et al.] // Nat Biotechnol (2008) 26:1015–1017
108. Sparks C.A. Genetic Transformation of Wheat via *Agrobacterium*-Mediated DNA Delivery / C. A. Sparks, A. Doherty, H.D. Jones // Methods in Molecular Biology. – 2014. – Vol. 1099. – P. 235–250.



109. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to monocots and dicots / B. Hohn, Z. Koukolíková-Nicola, G. Bakkeren [et al.] // *Genome*. – 1989. – Vol. 31, № 2. – P. 987–993.
110. *Agrobacterium*-mediated transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus / H. Fukuoka, T. Ogawa, I. Mitsuhashi [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 815–820.
111. Shrawat A. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers / A. Shrawat, H. Lörz // *Plant Biotechnol J.* – 2006. – Vol. 4, № 6. – P. 575–603.
112. Sood P. Problems and possibilities of monocot transformation / P. Sood, A. Bhattacharya, A. Sood // *Biologia Plantarum*. – 2011. – Vol. 55, № 1. – P. 1–15.
113. Hwang H-H. *Agrobacterium* biology and its application to transgenic plant production / H-H. Hwang, S. B. Gelvin, E-M. Lai. // *Front Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – Article ID 265.
114. Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants expressing IbMYB1, a sweet potato transcription factor / Y.J. Cheng, M.D. Kim, X.P. Deng [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 23, № 12. – P.1737–1746.
115. Engineered plant virus resistance / L.C. Galvez, J. Banerjee, H. Pinar [et al.] // *Plant Sci.* – 2014. – Vol. 228. – P. 11–25.
116. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi [et al.] // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 61. – P. 839 – 851.
117. “Hairy” root culture for massproduction of high-value secondary metabolites / S. Srivastava, A. K. Srivastava // *Crit Rev Biotechnol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 29–43.
118. Curtis I.S. Leaf disk transformation / I.S. Curtis, M. L. R. Davey, J. B. Power // *Meth. in Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 44, № 1. – P. 59–70.
119. Shahin E A. Gene transfer system for potato / E A. Shahin, R. B. Simpson // *Hort. Sci.* – 1986. – Vol. 21. – P. 1199–1201.

120. Sustained ethylene production in *Agrobacterium*-transformed carrot disks caused by expression of the T-DNA *tms* gene products / T. C. Goodman, A. L. Montoya, S. Williams [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1986. – Vol. 167. – P. 387–388.
121. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato orange gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance / Z. Wang, Q. Ke, M.D. Kim [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 5. – Article ID e0126050.
122. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco / P. Gallois, P. Marinho // *Methods Mol Biol.* – 1995. – Vol. 49. – P. 39–48.
123. Location and stability of *Agrobacterium* mediated T-DNA insertion in the lycopersicon genome / Y.-S. Chyi, R.A. Jorgensen, D. Goldstein [et al.] // *Mol. and Gen. Genet.* – 1986. – Vol. 204, № 1. – P. 64–69.
124. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* / Y.T. Yamamoto, N. Rajbhandari, X.H. Lin [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2001. – Vol. 37, № 3. – P. 349–353.
125. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system / N. S. Nehra, R. N. Chibbar, K. K. Kartha [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1990. – Vol. 9, № 6. – P. 293–298.
126. Production of herbicide-resistant medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* transformed with the bar gene / Y. Liu, S.X. Yang, Y. Cheng [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2015. – Vol. 177, № 7. – P. 1456–1465.
127. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. / M. Długosz, E. Wiktorowska, A. Wiśniewska [et al.] // *Acta Biochim Pol.* – 2013. – Vol. 60, № 3. – P. 467–473.
128. Drake P.M. Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N / P.M. Drake, L. de Moraes Madeira, T.H. Szeto [et al.] // *Transgenic Res.* – 2013. – Vol. 22, № 6. – P. 1225–1229.

129. Christey M.C. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / M. C. Christey, R. H. Braun // *Methods Mol Biol.* – 2005. – Vol. 286, №1. – P. 47–60.
130. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era / S. Guillon, P. Kumar Pati, M. Rideau [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2006. – 24, № 9. – P. 403–409.
131. Georgiev M.I. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances / M. I. Georgiev, A. I. Pavlov, T. Bley // *Appl. Microbiol Biotechnol.* – 2007. – 74, № 7. – P. 1175–1185.
132. Canto-Canche B. Chemicals from roots, hairy roots, and their application / B. Canto-Canche, V.M. Loyola-Vargas // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1999. – Vol. 464, №1. – P. 464–475.
133. Sevón N. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation: Root Cultures as a Source of Alkaloids / N. Sevón, K. M. Oksman-Caldentey // *Planta Med.* – 2002. – Vol. 68, № 10. – P. 859–868.
134. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on Hairy Root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) / A. Thwe, M. Valan Arasu, X. Li [et al.] // *Frontiers in Microbiology.* – 2016. – Vol. 14, № 7. – Article ID 27014239.
135. Farkya S. Exogenous hormones affecting morphology and biosynthetic potential of hairy root line (LYR2i) of *Linum album* / S. Farkya, V.S. Bisaria // *J. Biosci. Bioeng.* – 2008. – Vol. 105, № 2. – P. 140–146.
136. Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra* / S-H. Huang, R.K Vishwakarma, T-T. Lee [et al.] // *Botanical Studies.* – 2014. – Vol. 55, № 17. – Article ID 28510924.
137. *Artemisia tilesii* ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / Matvieieva N.A., Shakhovsky A.M., Belokurova V.B. [et al.]. // *Prep Biochem Biotechnol.* – 2016. – Vol. 46, №4. – P.342–345.

138. Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue plasminogen activator in hairy roots of Oriental melon (*Cucumis melo*) / S.R. Kim, J.S. Sim, H. Ajjappala [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – Vol. 113, № 1. – P. 106–111.
139. Klimek-Chodacka M. A protocol for sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of haploid and diploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) explants / M. Klimek-Chodacka, R. Baranski // Acta Biochim. Pol. – 2014. – Vol. 61, № 1. – P.13–17.
140. Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b / Iu.S. Luchakivskaia, Z.M. Olevinskaia, E.M. Kishchenko [et al.] // Citol. Genet. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 15–20.
141. Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes* / R. Visser, E. Jacobsen, B. Witholt [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1989. – Vol. 78, № 4. – P. 594–600.
142. Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase / Y.K. Kim, Y.B. Kim, M.R. Uddin [et al.] // ACS Synth. Biol. – 2014. – Vol. 3, № 10. – P. 773–779.
143. Długosz M. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. / M. Długosz, E. Wiktorowska, A. Wiśniewska [et al.] // Acta Biochim. Pol. – 2013. – Vol. 60, № 3. – P. 467–473.
144. Kuzma L. Genetic transformation of *Salvia austriaca* by *Agrobacterium rhizogenes* and diterpenoid isolation / Ł. Kuźma, W. Kisiel, A. Królicka [et al.] // Pharmazie. – 2011. – Vol. 66, № 11. – P. 904–907.
145. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. / C.O. Tacket, H.S. Mason, G. Losonsky [et al.] // Nat. Med. – 1998. – Vol. 4. – P. 607–609.

146. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. / H.S. Mason, J.M. Ball, J.J. Shi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1996. – Vol. 93. – P. 5335–5340.
147. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. / H.S. Mason, T.A. Haq, J.D. Clements [et al.] // *Vaccine* – 1998. – Vol. 16. – P. 1336–1343.
148. Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. / S. Wirth, G. Calamante, A. Mentaberry [et al.] // *Mol. Breed.* – 2004. – Vol. 13. – P. 23–35.
149. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. / I. Farran, J.J. Sanchez-Serrano, J.F. Medina [et al.] // *Transgenic Res.* – 2002. – Vol. 11. – P. 337–346.
150. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. / N.S. Magnuson, P.M. Linzmaier, R. Reeves [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 1998. – Vol. 13. – P. 45–52.
151. Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. / J. Huang, L. Wu, D. Yalda [et al.] // *Transgenic Res.* – 2002. – Vol. 11. – P. 229–239.
152. Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. / S. Nandi, D. Yalda, S. Lu [et al.] // *Transgenic Res.* – 2005. – Vol. 14. – P. 237–249.
153. Rosales-Mendoza S. An overview of tuberculosis plant-derived vaccines. / S. Rosales-Mendoza, R. Ríos-Huerta & C. Angulo // *Expert Review of Vaccines* – 2015. – Vol. 14. – Iss. 6.
154. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus / J. Kapusta, A. Modelska, M. Figlerowicz [et al.] // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13, № 13. – P. 1796 – 1799
155. Verma D. Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. / D. Verma, H. Daniell. // *Plant Physiology.* – 2007. – Vol. 145, №4. – P. 1129–1143.

156. Adem M. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. / M. Adem, D. Beyene, T. Feyissa. // *Plant Methods*. – 2017. – Vol.13, № 30.
157. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. / H. Daniell, C-S. Lin, M. Yu [et al.] // *Genome Biol*. – 2016. – Vol. 17, № 134.
158. Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. / P.A. Arlen, M. Singleton, J.J. Adamovicz [et al.] // *Infect. Immun*. – 2008. – Vol. 76, № 8. – P. 3640–3650.
159. Molina A. Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. / A. Molina, J. Veramendi, S. Hervás-Stubbs. // *Virology* – 2005. – Vol. 342, № 2. – P. 266–275.
160. The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors. / H.B. Shao, D.M. He, K.X. Qian [et al.] // *C. R. Biol*. – 2008. – Vol. 331, № 3. – P. 179–184.
161. A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. / Y.X. Zhou, M.Y. Lee, J.M. Ng [et al.] // *World J. Gastroenterol*. – 2006. – Vol. 12. – P. 306–312.
162. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. / A. Fernandez-San Millan, S.M. Ortigosa, S. Hervas-Stubbs [et al.] // *Plant Biotechnol. J*. – 2008. – Vol. 6. – P. 427–441.
163. High-performance liquid chromatographic quantification of plumbagin from transformed rhizoclones of *Plumbago zeylanica* L.: inter-clonal variation in biomass growth and plumbagin production. / P. Nayak, M. Sharma, S.N. Behera [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol*. – 2015. – Vol. 175, № 3. – P. 1745–1770.
164. Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolD gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / P. Bettini, S. Michelotti, D. Bindi [et al.] // *Theor. Appl. Genet*. – 2003. – Vol. 107, № 3. – P. 831–836.

165. A review on factors affecting the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes / M.J. Koetle, J.F. Finnie, E. Balázsa [et al.] // *S. African J. Botany* – 2015. – Vol. 98. – P. 37–44.
166. Lutova L.A. *Agrobacterium*-mediated Transformation as a Way to Change Hormonal Metabolism in Higher Plants. / L.A. Lutova, Z.B. Pavlova, M.M. Ivanova. // *Genetika* – 1998. – Vol. 34, № 2. – P. 109–123.
167. Boeckner L.S. Inulin: a review of nutritional and health implications. / L.S. Boeckner, M.I. Schnepf, B.C. Tungland // *Adv. Food Nutr. Res.* – 2001. – Vol. 43. – P. 1–63.
168. Fructan synthesis in excised barley leaves; identification of two sucrose: sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases. / U. Simmen, D. Obenland, T. Boller [et al.] // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101, № 2. – P. 459–468.
169. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. / J. Muir, S. Shepherd, O. Rosella [et al.] // *J. Agr. Food.Chem.* – 2007. – Vol. 55. – P.6619–6627.
170. Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the *Poaceae*. / G.D. Bonnet, L.M. Sims, R.J. Simpson [et al.] // *New Phytol.* – 1997. – Vol.136, №. 1. – P. 11– 17.
171. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. / W. Van den Ende, A. Michiels, J. De Roover [et al.] // *Sci. World J.* – 2002. – Vol.11, №2. – P. 1281–95.
172. Bancal P. Differences in fructan accumulation in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis / P. Bancal, N.C. Carpita, J.P. Gaudillère // *New Phytol.* – 1992. – Vol. 120, № 3. – P. 313–321.
173. Pontis H.G. Fructans. In: *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants* / H.G. Pontis, E. del Campillo; Edited by P.M. Dey and R.A. Dixon. – NY: Academic Press, 1985. – P. 205–227.

174. Pollock C.J. Fructan metabolism in grasses and cereals / C.J. Pollock, A.J. Cairns // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 42, № 1. – P. 77–101.
175. Koops A.J. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* "Colombia". I. Fructan: fructan 1-fructosyltransferase. / A.J. Koops, H.H. Jonker // *J. Exp. Botan.* – 1994. – Vol. 45. – P. 1623–1631.
176. Darwen C.E. Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). / C.E. Darwen, P. John // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 89, № 2. – P. 658–663.
177. Improved performance of transgenic fructan accumulating tobacco under drought stress. / E.A.H. Pilon-Smits, M.J.M. Ebskamp, M.J. Paul [et al.] // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 107, №1. – P. 125-130.
178. Livingston D.P. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. / D.P. Livingston, D.K. Hinch, A.G. Heyer // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66, № 13. – P. 2007–2023.
179. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor. / A.G. Enikeev, T.V. Kopytina, L.A. Semenova [et al.] // *J. Stress Physiol. & Biochem.* – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 11–19.
180. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. / F.J. Alarcon-Aguilar, A. Fortis-Barrera, S. Angeles-Mejia [et al.] // *J Ethnopharmacol.* – 2010. – Vol. 132, № 2. – P. 400–407.
181. Structural characterization and anti-tumor effects of an inulin-type fructan from *Atractylodes chinensis*. / J. Xu, D. Chen, C. Liu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 82. – P. 65–71.
182. Kaur N. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition / N. Kaur, A.K. Gupta // *J. Biosci.* – 2002. - Vol. 27, № 7. – P. 703–714.



183. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile / S.A. Reis, L.L. Conceição, D.D. Rosa [et al.] // *Nutr. Hosp.* – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 528–534.
184. Inulin-type fructans with different degrees of polymerization improve lipid metabolism but not glucose metabolism in rats fed a high-fat diet under energy restriction / K.H. Han, H. Tsuchihira, Y. Nakamura [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2013. – Vol. 58, № 8. – P. 2177–2186.
185. Shang H.M. Effects of inulin on performance, egg quality, gut microflora and serum and yolk cholesterol in laying hens / H.M. Shang, T.M. Hu, Y.J. Lu, H.X. Wu // *Br. Poult. Sci.* – 2010. – Vol. 51, № 6. – P. 791–796.
186. Özer D. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus–bifidus yoghurt / D. Özer, S. Akin, B. Özer // *Food Sci. & Tech. Intl.* – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 19–24.
187. Franco-Robles E. Implication of fructans in health: immunomodulatory and antioxidant mechanisms. / E. Franco-Robles, M.G. López // *The Sci. World. J.* – 2015. – ID. 289267
188. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans. / M.B. Roberfroid // *Br. J. Nutr.* – 2005. - Vol.93, № 1. – P.13–25.
189. Reis S.A. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile / S.A. Reis, L.L. Conceição, D.D. Rosa // *Nutrición Hospitalaria.* – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 528–534.
190. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of a fructan from the roots of *Arctium lappa* L. / W. Liu, J. Wang, Z. Zhang [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 446–453.
191. World Malaria Report. Geneva: World Health Organization, 2016. – 186 p.
192. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. / C.J. Paddon, P.J. Westfall, D. Pitera [et al.] // *Nature* – 2013. – Vol. 496. – P. 528–532.

193. Barbacka K. Searching for artemisinin production improvement in plants and microorganisms. / K. Barbacka, W. Baer-Dubowska // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2011. – Vol.12, № 11 – P. 1743–1751.
194. Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. / T. Nafis, M. Akmal, M. Ram [et al.] // *Plant Biotechnol. Rep.* – 2011. – Vol. 5. – P. 53–60.
195. Aquil S. Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. / S. Aquil, A.M. Husaini, M.Z. Abdin // *Planta Med.* – 2009. – Vol. 75. – P. 1453–1458.
196. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. / W. Banyai, C. Kirdmanee, M. Mii [et al.] // *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* – 2010. – Vol. 103. – P. 255–265.
197. Enhancement of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* L. by overexpressed HDR and ADS genes. / Y.X. Wang, S.P. Long, L.X. Zeng [et al.] // *Yao Xue Xue Bao.* – 2014. – Vol. 49, № 9. – P. 1346–1352.
198. Terpenoid metabolic profiling analysis of transgenic *Artemisia annua* L. by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-offlight mass spectrometry. / C. Ma, H. Wang, X. Lu [et al.] // *Metabolomics* – 2009. – Vol. 5. – P. 497–506.
199. Patent CN201210249469, China. Overexpression AaWRYK1 gene increased artemisinin content in *Artemisia annua* L. Published 14.11.2012.
200. AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. / X. Lu, L. Zhang, F. Zhang [et al.] // *New Phytol.* – 2013. – Vol. 198. – P. 1191–1202.

201. Enhanced artemisinin yield by expression of rol genes in *Artemisia annua*. / E. Dilshad, R.M. Cusido, J. Palazon [et al.] // *Malaria J.* – 2015. – Vol.14. – ID. 424.
202. Kiani B.H. Cellular engineering of *Artemisia annua* and *Artemisia dubia* with the rol ABC genes for enhanced production of potent anti-malarial drug artemisinin. / B.H. Kiani, J. Suberu, B. Mirza. // *Malaria Journal.* – 2016. – Vol. 15. – ID. 252.
203. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua* / S.K. Gupta, P. Singh, P. Bajpai [et al.] // *Ind. Crop. Prod.* – 2002. – Vol. 16 – P. 217–224.
204. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua*. / M.V. Duke, R.N. Paul, H.N. Elsohly [et al.] // *I. Int. J. Plant Sci.* – 1994. – Vol. 155. – P. 365–372.
205. Pandey, N., Meena, R.P., Rai, S.K. [et al.] *In vitro* generation of high artemisinin yielding salt tolerant somaclonal variant and development of SCAR marker in *Artemisia annua* L. / N. Pandey, R.P. Meena, S.K. Rai [et al.] // *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* – 2016. – Vol. 127. – ID. 301.
206. Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. / K. Tang, Q. Shen, T. Yan [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2014. – Vol. 33, № 4. – P. 605–615.
207. Xie D. Selection of hairy root clones of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. / D. Xie, H. Ye, G. Li // *Isr. J. Plant Sci.* – 2001. – Vol. 49. – P.129–134.
208. Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production. / D.H. Chen, C.J. Liu, H.C. Ye [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 1999. – Vol. 57. – P. 157.
209. Pandey K.B. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. / K.B. Pandey, S.I. Rizvi // *Oxidative Med. Cell. Longevity.* – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 270–278.

210. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. / I. Fernandes, R. Pérez-Gregorio, S. Soares [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 2. – Article ID E292.
211. Flavonoids in food and their health benefits. / L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi [et al.]. // *Plant Foods Hum. Nutr.* – 2004. – Vol. 59, № 3. – P. 113–122.
212. Winkel-Shirley B. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. / B. Winkel-Shirley // *Seed Sci. Res.* – 1998. – Vol. 8, № 4. – P. 415–422.
213. Holton T.A. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. / T.A. Holton, E.C. Cornish // *Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7, № 7. – P. 1071–1083.
214. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. / B. Winkel-Shirley // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5, № 3. – P. 218–223.
215. Peterson J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. / J. Peterson, J. Dwyer // *Nutrition Res.* – 1998. – Vol. 18. – P. 1995–2018.
216. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. / D. Amic, D. Davidovic-Amic, D. Beslo [et al.] // *Croatica Chemica Acta* – 2003. – Vol. 76. – P. 55–61.
217. Kumar S. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. / S. Kumar, A.K. Pandey // *Sci. World J.* – 2013. – Article ID 162750.
218. Yan A. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. / A. Yan, A. Kohli, M.A. Koffas // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – P. 5610–5613.
219. Leonard E. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. / E. Leonard, Y. Yan, M.A. Koffas // *Metab. Eng.* – 2006. – Vol. 8, № 2. – P. 172–181.

220. Agarwal M. Studies of flavonoid production using *in vitro* cultures of *Momordica charantia* L. / M. Agarwal, R. Kamal // Indian J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 6. – P. 277–279.
221. Callus cultivation and determination of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum*. / A.F. Lu, M.J. Qi, Z.L. Li [et al.] // Zhong Yao Cai. – 2010. – Vol. 33, № 7. – P. 1042–1045.
222. Unusual flavonoids produced by *callus* of *Hypericum perforatum*. / A.C.P. Dias, F.A. Tomas-Barberan, M.F. Ferreira [et al.] // Phytochem. – 1998. – Vol. 48, № 7 – P. 1165–1168.
223. Sevón N. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. / N. Sevón, K.M. Oksman–Caldentey. // Planta Medica. – 2002. – Vol. 68. – P. 859–868.
224. Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* / Y. Zhou, M. Hirotani, T. Yoshikawa [et al.] // Phytochem. – 1997. – Vol. 44. – P. 83–87.
225. Flavonoid Production in Transformed *Scutellaria baicalensis* roots and ways of its regulation. I.N. Kuzovkina, A.V. Guseva, I.E. Alterman [et al.] Russ. J. Plant Physiol. – 2001. – Vol. 48. – P. 448–452.
226. Forkmann G. Metabolic engineering and applications of flavonoids. / G. Forkmann, S. Martens // Curr. Opin. Biotechnol. – 2001. – Vol. 12, № 2. – P. 155–160.
227. Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes *in Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine. / K.V. Kiselev, A.P. Tyunin, A.Y. Manyakhin [et al.] // Plant Cell. Tiss. Organ. Cult. – 2011. – Vol. 105. – P. 65–72.
228. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only. / V. Bonhomme, D. Laurain-Mattar, J. Lacoux [et al.] // J. Biotechnol. – 2000. – Vol. 81. – P. 151–158.

229. Bioconversion of stilbenes in genetically engineered root and cell cultures of tobacco. / D. Hidalgo, A. Martínez-Márquez, E. Moyano [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – ID. 45331.
230. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. / H.N. Murthy, C. Dijkstra, P. Anthony [et al.] // J. Int. Plant Biol. – 2008. – Vol. 50. – P. 975–981.
231. Sircar D. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. / D. Sircar, A. Roychowdhury, A. Mitra // J. Plant Physiol. – 2007. – Vol. 164. – P. 1358–1366.
232. The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. / J.W. Wang, L.P. Zheng, R.X. Tan RX // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao – 2006. – Vol. 22. – P. 829–834.
233. Enhanced production of an anti-malarial compound artesunate by hairy root cultures and phytochemical analysis of *Artemisia pallens* wall. / Z. Pala, S. Vishnu, A. Anshu [et al.] // 3 Biotech. – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 1–8.
234. Gangopadhyay M. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. / M. Gangopadhyay, S. Dewanjee, S. Bhattacharya // J. Biosci. Bioeng. – 2011. – Vol. 111. – P. 706–710.
235. *Solanum chrysotrichum* hairy root cultures: characterization, scale-up and production of five antifungal saponins for human use. / L. Caspeta, I. Nieto, A. Zamilpa [et al.] // Planta Med. – 2005. – Vol. 71. – P. 1084–1087.
236. Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. / Z. Jaremicz, M. Luczkiewicz, A. Kokotkiewicz [et al.] // Biotechnol. Letters. – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 843–853.
237. Growth and Ginsenoside Production in Hairy Root Cultures of *Panax ginseng* using a Novel Bioreactor. / J. Palazón, A. Mallol, R. Eibl [et al.] // Planta Med. – 2003. – Vol. 69, № 4. – P. 344–349.

238. Bonhomme V.L. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. / V.L. Bonhomme, D. Laurain-Mattar, M.A. Fliniaux // *Planta* – 2004. – Vol. 218. – P. 890–893.
239. Alkaloid production by transformed root cultures of *Cinchona ledgeriana*. / J.D. Hamill, R.J. Robins, M.J. Rhodes // *Planta Med.* – 1989. – Vol. 55. – P. 354–357.
240. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. / M. Taya, K. Mine, M. Kino-Oka [et al.] // *J. Ferment Bioeng.* – 1992. – Vol. 73. – P. 31–36.
241. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: implications for metabolic engineering. / J.V. Shanks, R. Bhadra, J. Morgan [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – Vol. 58. – P. 333–338.
242. Benjamin B.D. Alkaloid synthesis by root cultures of *Rauwolfia serpentina* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. / B.D. Benjamin, G. Roja, M.R. Heble // *Phytochem.* – 1994. – Vol. 35. P. – 381–383.
243. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. / F. Medina-Bolivar, J. Condori, A. Rimando [et al.] // *Phytochem.* – 2007. – Vol. 68. – P. 1992–2003.
244. Grzegorzczuk I. Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. / I. Grzegorzczuk, A. Królicka, H. Wysokińska // *Z Naturforsch* – 2006. – Vol. 61. – P. 351–356.
245. Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds *In Vitro* / B.A. Triplett, S.C. Moss, J.M. Bland [et al.] // *Cell. Dev. Biol.-Plant* – 2008. – Vol. 44, № 6. – P. 508–517
246. Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. / M. Gangopadhyay, D. Sircar, A. Mitra [et al.] // *Biol. Plant.* – 2008. – Vol. 52, № 3. – P. 533–537.

247. Ayadi R. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*. / R. Ayadi, J. Tremouillaux-Guiller // Tree Physiol. – 2003. – Vol. 23. – P. 713–718.
248. Enhanced production of valerenic acids and valepotriates by *in vitro* cultures of *Valeriana officinalis* L. / S.E. Tousei, T. Radjabinb, H. Ebrahimzadeha [et al.] // Int J Plant Prod – 2010. – Vol. 4. – P. 209–222.
249. Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants / S. Srivastava, X.A. Conlan, A. Adholeya [et al.] // Plant Cell Tiss Organ Cult – 2016. – Vol. 126. № 1. – P. 19–32.
250. Marzouk A. M. Hepatoprotective triterpenes from hairy root cultures of *Ocimum basilicum* L. / A.M. Marzouk // Z Naturforsch. – 2009 – Vol. 64, № 3-4. – P. 201–209.
251. Hairy roots of *Hypericum perforatum* L.: a promising system for xanthone production / O. Tusevski, J.P. Stanoeva, M. Stefova [et al.] // Cent Eur J Biol. – 2013 – Vol. 8. – P. 1010–1022.
252. Chichester J. A. Plants as alternative systems for production of vaccines / J. A. Chichester, V. Yusibov // Human Vaccines. – 2007 – Vol. 3,, № 4. – P. 146–148.
253. Mason H. S. Transgenic plants as vaccine production systems / H. S. Mason, C. J. Arntzen // Trends Biotechnol. – 1995. – Vol. 13, № 9. – P. 388–392.
254. Wongsamuth R. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots / R. Wongsamuth, P. Doran // Biotechnol Bioeng. – 1997 – Vol. 54. – P. 401–415.
255. Cooke D. E. Stability of 35S *GUS* gene expression in birds foot trefoil hairy root cultures under different growth conditions / D. E. Cooke, K. J. Webb // Plant Cell Tiss Org Cult. – 1997 – Vol. 47. – P. 163–168.
256. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots / P. Drake, D. M. Chargelegue, N. Vine [et al.] // Plant Mol Biol. – 2003. – Vol. 52. – P. 233–241.



257. Woods R. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase / R. Woods, B. Geyer, T. Mor // BMC Biotechnol. – 2008. – Vol. 8. – P. 95–101.
258. Sunil Kumar G. B. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots / G. B. Sunil Kumar, T. R. Ganapathi, L. Srinivas // Plant Sci. – 2006. – Vol. 170. – P. 918–925.
259. Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. / P. D. Gurusamy, H. Schäfer, S. Ramamoorthy [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 8. – Article ID e0182367.
260. Expression of a recombinant anti-HIV and anti-tumor protein, MAP30, in *Nicotiana tabacum* hairy roots: a pH-stable and thermophilic antimicrobial protein / Moghadam A, Niazi A, Afsharifar A [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, №7. – Article ID e0159653.
261. Ngoc B. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures / B. Ngoc, S. Holger, M. Wink // Biotechnology J. – Vol. 7, № 4. – P. 537–545.
262. Wongsamuth R. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots / Wongsamuth R, Doran PM // Biotechnol Bioeng. – 1997. – Vol. 54. – P. 401–415.
263. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots / G. B. Sunil Kumar, T. R. Ganapathi, L. Srinivas // Plant Sci. – 2006. – Vol. 170. –P. 918–925.
264. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor / C. Z. Liu, M. J. Towler, G. Medrano [et al.] // Biotechnol Bioeng. – 2009 – Vol. 102. – P. 1074–1086.
265. Production of human epidermal growth factor (hEGF) by in vitro cultures of *Nicotiana tabacum* effect of tissue differentiation and sodium nitroprusside addition / J. Parsons, S. Wirth, M. Dominguez [et al.] // Int J Biotechnol Biochem. – 2010. – Vol. 6. – P. 131–138.

266. *Agrobacterium*-mediated transformation of chicory using vector constructions with various selective and target genes and peculiarities of transgenic plants / N. Matvieieva, O. Kvasko, A. Shachovsky [et al.] / Biotechnology and plant breeding perspectives Ed R. K. Bell, Edward Arseniuk. – Jondhpur: Agrobios (Intern.), 2014. – P. 269–274.
267. Matvieieva N. A. Features of lettuce transgenic plants with *ifn2b* 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.
268. Дробот К.О. Створення культури бородатих коренів рослин алтеї лікарської *Althaea officinalis* L. з використанням різних векторних конструкції з геном *ifn-2b* людини / К.О. Дробот, Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – Т.15 – 2014. – С. 59-63.
269. *Artemisia tilesii* ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation / Matvieieva N.A., Shakhovsky A.M., Belokurova V.B. [et al.]. // Prep Biochem Biotechnol. – 2016. – Vol. 46, №4. – P.342–345.
270. A quick and efficient system for antibiotic-free expression of heterologous genes in tobacco roots / S. Komarnytsky, A. Gaume, A. Garvey [et al.] // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22. – P. 765–773.
271. Torregrosa L. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus A / L. Torregrosa, L. Bouquet // Plant Cell Tiss Org Cult. – 1997. – Vol. 49. – P. 53–62.
272. Obtaining of the transgenic *Heliantus tuberosus* L. plants, callus and “hairy” root cultures able to express the recombinant human interferon alpha-2b gene / O. M. Maistrenko, Y. S. Luchakivska, N. M. Zholobak [et al.] // Cytol Genet. – 2015. – Vol. 49. – P. 308–313.

273. Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin / A. Tavizi, M. J. Javaran, A. Moieni [et al.] // *Mol Biol Rep.* – 2015 – Vol. 42, № 5. – P. 1013–1023.
274. Samuel C. E. Antiviral actions of interferons / C. E. Samuel // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2001. – Vol. 14, № 4. – P. 778–809.
275. Fensterl V. Interferons and viral infections / V. Fensterl, G. C. Sen // *BioFactors.* – 2009. – Vol. 35. – P. 14–20.
276. IFN- $\alpha$  and IFN- $\lambda$  differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity / S. G. Maher, F. Sheikh, A. J. Scarzello [et al.] // *Cancer biology & therapy.* – 2008. – Vol. 7, № 7. – P. 1109–1115.
277. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. / X. Wang, W. Peng, J. Ren [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 19, № 4. – P. 424–429.
278. Diaz M.O. Nomenclature of the Human Interferon Genes / M.O. Diaz, S. Bohlander, G. Allen // *Journal of Interferon & Cytokine Research.* – 2009. – Vol. 16, № 2. – P. 179–180.
279. The receptor of the type I interferon family / G. Uzé, G. Schreiber, J. Piehler [et al.] // *Current topics in microbiology and immunology.* – 2007. – Vol. 316. – P. 71–95.
280. Heterologous expression, immunochemical and computational analysis of recombinant human interferon alpha 2b / I. Gull, Z. Q. Samra, M. S. Aslam [et al.] // *SpringerPlus.* – 2013. – Vol. 2. – P. 1–8. – Article ID 23875128.
281. Rong L. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling / L. Rong, A. S. Perelson // *Critical reviews in immunology.* – 2010. – Vol. 30, № 2. – P. 131–148.
282. Губський Ю. І. Біологічна хімія. Підручник / Ю. І. Губський; під редакцією О.В.Марчука. – В.: Нова Книга, 2007. – 422 с.
283. Overproduction of human  $\alpha$ -2b interferon in a soluble form in *Escherichia coli* cells using the bacteriophage T7 RNA polymerase-base expression system /

- I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko, N. V. Vorobey [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2003. – Vol. 19, № 4. – P. 367–373.
284. Orchansky P. Human interferons protect plants from virus infection / P. Orchansky, M. Rubinstein, I. Sela // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1982. – Vol. 79, № 7. – P. 2278–2280.
285. Генетическая трансформация *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, несущей плазмиду с геном  $\beta$ -интерферона человека / В.А. Рудас, Н.М. Пивень, М.И Ривкин. [и др.] // *Цитология и генетика.* – 1997. – Т. 31, № 2. – С. 17–22.
286. Wilken L.R. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins / L.R. Wilken, Z.L. Nikolov // *Biotechnol. Adv.* – 2011. – Vol. 30, № 2. – P. 419–433.
287. Strasser R. Plant protein glycosylation / R. Strasser // *Glycobiology.* – 2016. – Vol. 26, № 9. – P. 926–939.
288. N-Glycosylation of plant-produced recombinant proteins / D. Bosch, A. Castilho, A. Loos [et al.] // *Current Pharmaceutical Design* – 2013. – Vol. 19, № 31. – P. 5503–5512.
289. Singhabahu S. Expression of functional human adenosine deaminase in tobacco plants / S. Singhabahu, J. George, D. H. Bringloe // *Transgenic Res.* – 2013. – Vol. 22, № 3. – P. 643–649.
290. Rybicki E. P. Plant-produced vaccines: promise and reality / E. P. Rybicki // *Drug Discov Today.* – 2009. – Vol. 14. – P. 16–24.
291. Expression of two subtypes of human ifn- $\alpha$  in transgenic potato plants / K. Ohya, T. Matsumura, K. Ohashi [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2001. – Vol. 21, № 8. – P. 595–602.
292. Production of biologically active human interferon- $\alpha$  in transgenic rice / T. Masumura, S. Morita, Y. Miki [et al.] // *Plant Biotechnol.* – 2006. – Vol. 23, №.1. – P. 91–97.

293. Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha-2b interferon gene / L.O. Sakhno, O.Y. Kvasko, Z.M. Olevinska [et al.] // *Tsitol Genet.* – 2012. – Vol. 46, №6 – P. 342–346.
294. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* / W. Lowther, K. Lorick, S. D. Lawrence [et al.] // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21, № 6. – P. 1349–1357.
295. Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b / Iu. S. Luchakivskaia, Z. M. Olevinskaia, E. M. Kishchenko [et al.] // *Tsitol Genet.* – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 18–26.
296. High-yields and extended serum half-life of human interferon- $\alpha$ 2b expressed in tobacco cells as arabinogalactan-protein fusions / J. Xu, L. Tan, K. J. Goodrum [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 2007. – Vol. 97, № 5. – P. 997–1008.
297. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- $\alpha$ 2b / P. A. Arlen, R. Falconer, S Cherukumilli [et al.] // *Plant Biotech J.* – 2007. – Vol. 5, № 4. P. 511–525.
298. Expression of two subtypes of human ifn- $\alpha$  in transgenic potato plants / K. Ohya, T. Matsumura, K. Ohashi [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2001. – Vol. 21, № 8. – P. 595–602.
299. Lowther W. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* / W. Lowther, K. Lorick, S.D., Lawrence W.S. Yeow // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21, № 6. – P. 1349–1357.
300. Lin Y. R. Anthemideae // *Flora of China*. Eds: Z. Y. Wu, P. H. Raven, D. Y. Hong – Beijing: Science Press & Missouri Botanical Garden Press, 2011. – P. 653–773.
301. Phylogeny in *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae) inferred from nuclear ribosomae DNA (ITS) sequences / Torrell, M., Garcia-Jacas, N., Sussanna, A. [et al.] // *Taxon.* – 1999. – Vol. 48, №. 4. – P. 721–736.

302. Бойко Г.В. Рід *Artemisia* L. (Asteraceae Bercht. & J. Presl) у флорі України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаніка» / Г.В. Бойко. – К., 2011. – 20 с.
303. Molecular phylogeny of Subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera / Watson LE, Bates PL, Evans TM [et al.] // BMC Evol Biol. – 2002. – Vol. 2, № 17. – P. 1-12.
304. Heywood V.H. Anthemideae systematic review / The Biology and Chemistry of the Compositae. Ed: V. H. Heywood, C.J. Humphries – London: Academic Press, 1997. – 868 p.
305. Su X. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine / X. Su, L. H. Miller // Science China Life sciences. –2015. – Vol. 58, № 11. – P. 1175–1179.
306. Ethnomedical knowledge of plants used by Kunabi tribe of Karnataka / V. H. Harsha, S. S. Hebbar, G. R. Hegde [et al.] // India Fitoterapia. – 2002. –Vol. 73. – P. 281–287.
307. Mohammadreza V.-R. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran / V.-R. Mohammadreza // Botany Research Journal. – 2008. – Vol.1, № 2. – P. 33–35.
308. Kapelev I.G. Brief results from the introduction of essential oil plants of the wormwood genus / I.G. Kapelev // Bulletin Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada. – 1984. – Vol. 54. – P. 60–65
309. Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties / A. R. Bilia, F. Santomauro, C. Sacco // J Evid Based Complementary Altern Med. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–7. – Article ID 159819.
310. Bioassay-guided chromatographic isolation and identification of antibacterial compounds from *Artemisia annua* L. that inhibit *Clostridium perfringens* growth / E. Ivarsen, X. C. Fretté, K. B. Christensen [et al.] // J AOAC Int. – 2014. – Vol. 97, № 5. – P. 1282–1290.

311. Жигжитжапова С.В. Биологически активные вещества *Artemisia annua* L. / С.В. Жигжитжапова, Т.Э. Рандалова, Л.Д. Раднаева // Фундаментальные исследования. – 2008. – №. 1. – С. 73–76
312. Kooy F. The complexity of medicinal plants: The traditional *A. annua* formulation, current status and future perspectives / F. Kooy, S.E. Sullivan // Journal of Ethnopharmacology. – 2013. – Vol. 150, № 1. – P. 1–13.
313. Singh N: Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferin toward human breast cancer cells / N. Singh, H. Lai // Life Sciences. – 2001. – Vol. 70. – P. 49–56.
314. Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells / G. S. Wu, J. J. Lu, J. J. Guo [et al.] // Pharmacol Rep. – 2013. – Vol. 65, № 2. – P. 453–459.
315. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity / R.S. Bhakuni, D.C. Jain, R.P. Sharma [et al.] // Curr Sci. – 2001. – Vol. 80, №. 1. – P. 35–48.
316. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: Agricultural, chemical and clinical aspects / M. S. Mueller, I. B. Karhagomba, H. M. Hirt [et al.] // Ethnopharm J. – 2000. – Vol. 73, № 3. – P. 487–493.
317. Гродзинський А. М. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред.: А.М.Гродзинський. – К.: УРЕ, 1989. – 544 с.
318. Bisset R. G. Herbal drugs and phytopharmaceuticals a handbook for practice on a scientific basis / R. G. Bisset; Ed: Max Wichtl. – Boca Raton: CRC Press, 2000. – 566 p.
319. Erichsen-Brown C. Medicinal and other uses of north american plants: a historical survey with special reference to the eastern indian tribes / Ed. C. Erichsen-Brown. – NY: Dover Publications Inc., 1979. – 513 p.
320. Williams J. D. Composition of the essential oil of wild growing *Artemisia vulgaris* from Erie. Pennsylvania / J. D. Williams, A. M. Saleh, D. N: Acharya // Nat Prod Commun. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 637–640.

321. Adams J. D. Mugwort (*Artemisia vulgaris*, *Artemisia douglasiana*, *Artemisia argyi*) in the treatment of menopause, premenstrual syndrome, dysmenorrhea and attention deficit hyperactivity disorder / J. D. Adams, C. Garcia, G. Garg // Chin Med. – 2012. – Vol. 3. – P. 116–123.
322. *In vitro* cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line Ayman / M. Saleh, A. Aljada, S. A-A Rizvi [et al.] // BMC Complement Altern Med. – 2014. – Vol. 14. – P. 1–15. – Article ID 25002129.
323. Govindaraj S. Composition and larvicidal activity of *Artemisia vulgaris* L. stem essential oil against *Aedes aegypti* // S. Govindaraj, B. D. Ranjitha Kumari // Jordan Bio Sci J. – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 11–16.
324. Hepatoprotective activity of aqueous-methanol extract of *Artemisia vulgaris* / A. H. Gilani, S. Yaeesh, Q. Jamal [et al.] // Phytother Res. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 170–172.
325. Boiko A. V. Specific features of *Artemisia* L. species distribution of the flora of Ukraine / A. V. Boiko // Industrial Botany. – 2013. – Vol. 13. – P. 73–79.
326. Uhl S. R. Handbook of Spices, Seasonings and Flavorings / S. R. Uhl, S. Strauss – Lancaster: Technomic Publishing, 2000. – 330 p.
327. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aerial parts of *Artemisia dracuncululus* in mice / Eidi A., Oryan S., Zaringhalam J. [et al.] // Pharm Biol. – 2016. – Vol. 54, № 3. – P. 549–554.
328. Агларова А. М. Сравнительный анализ метаболитов вторичного обмена *Artemisia dracuncululus* L. сортов «Французский» и «Русский»: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / А.М. Агларова. – М., 2006. – 22 с.
329. Mohsenzadeh M. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium / M. Mohsenzadeh // Pak J Biol Sci. – 2007. – Vol. 10, № 20 – P. 3693-3697



330. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori* / R. O'Mahony, H. Al-Khtheeri, D. Weerasekera [et al.] // World J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11, № 47. – P. 7499-7507.
331. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts / K. Duric, E. E. Kovac-Besovic, H. Niksic [et al.] // Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. – 2015. – Vol. 15, № 2. – P. 9–14.
332. Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan / A. Mannan, I. Ahmed, W. Arshad [et al.] // Malar J. – 2010. – Vol. 9. – P. 318–334.
333. Joshi R. K. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India / R. K. Joshi // Pharm Biol. – 2013. – Vol. 51, № 7. – P. 888–892.
334. Bora K. S. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury / K. S. Bora, A. Sharma // J Ethnopharmacol. – 2010. – Vol. 129, № 3. – P. 403–409.
335. Saxena M. Reversal of carbon tetrachloride-induced hepatic injury by aqueous extract of *Artemisia absinthium* in Sprague-Dawley rats / M. Saxena, S. Shukla // J Environ Pathol Toxicol Oncol. – 2012. – Vol. 31, № 4. – P. 325–334.
336. Thring T. Medicinal plants use in the Bredasdorp/Elim region of the southern Overberg in the Western Cape Province of South Africa / T. Thring, F. Weitz // J Ethnopharmacol. – 2006. – Vol. 103. – P. 261–275.
337. Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract / D. Jeong, Y. S. Yi, G. H. Sung [et al.] // J Ethnopharmacol. – 2014. – Vol. 152, № 3. – P. 487–496.
338. Artemisolide from *Artemisia asiatica*: nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) inhibitor suppressing prostaglandin E2 and nitric oxide production in macrophages / A. M. Reddy, J. Y. Lee, J. H. Seo [et al.] // Arch Pharm Res. – 2006. – Vol. 29, № 7. – P. 591–597.

339. Garcia C. Healing with medicinal plants of the west: cultural and scientific basis for their use / C. Garcia, J. Adams. – La Crescenta, CA: Abedus Press, 2005. – 265 p.
340. Chemical composition and biological activities of *Artemisia judaica* essential oil from southern desert of Jordan / M. S. Abu-Darwish, C. Cabral, M. J. Gonçalves [et al.] // J Ethnopharmacol. – 2016. – Vol. 15. – P. 161–168.
341. Regeneration of the Egyptian medicinal plant *Artemisia judaica* L. / C. Z. Liu, S. J. Murch, M. EL-Demerdash [et al.] // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21, № 6. – P. 525–530.
342. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartite* / G. Xie, I. A. Schepetkin, D. W. Siemsen [et al.] // Phytochemistry. – 2008. – Vol. 69, № 6. – P. 1359–1371.
343. Anwar M. A. Anti-Hypertensive Herbs and Their Mechanisms of Action: Part II / M. A. Anwar, S. S. Al Disi, A. H. Eid // Frontiers in Pharmacology – 2016. – Vol. 7 – P. 1–25. – Article ID 27014064.
344. Roberti di Sarsina P. Tibetan medicine: a unique heritage of person-centered medicine / P. Roberti di Sarsina, L. Ottaviani, J. Mella // The EPMA Journal. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 385–389.
345. Vascular effects of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotorum* Lamotte (Compositae): *in vivo* and *in vitro* pharmacological studies in rats / V. Calderone, E. Martinotti, B Baragatti [et al.] // Phytother Res. – 1999. – Vol. 13, № 8. – P. 645–648.
346. George E. F. Plant propagation by tissue culture: Part 1. The background (3rd ed.) / Ed. E. F. George, M. A. Hall, G.-J. De Klerk – AA Dordrecht: Springer, 2008. – 501 p.
347. *In vitro* propagation of plant virus using different forms of plant tissue culture and modes of culture operation / S. M. Shih, P. M. Doran / J Biotechnol. – 2009. – Vol. 43, № 3. – P. 198–206.
348. Tan R.X. Biologically active substances from the genus *Artemisia* / R.X. Tan, W.F. Zheng, H.Q. Tang // Planta Med. – 1998. – Vol. 64. – P. 295–302.

349. Lualon W. Artemisinin production by shoot regeneration of *Artemisia annua* L. using thidiazuron / W. Lualon // Z Naturforsch. – 2008. – Vol. 63, № 1-2. – P. 96–100.
350. *In vitro* micropropagation and flowering in *Artemisia annua* / A. Gulati, S. Bharel, S.K. Jain [et al.] // Plant Biochem. Biotechnol. – 1996. – Vol. 5. – P. 31–35.
351. Weathers P. J. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots / P.J. Weathers, G. Bunk M.C. McCoy // In Vitro Cell Dev Biol Plant. – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 47–53.
352. Fernández-Lizarazo J. Efficient micropropagation of french tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) / J. Fernández-Lizarazo, T. Mosquera-Vásquez // Agronomia colombiana. – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 335–344.
353. *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology and safety / Obolskiy D., Pischel I., Feistel B. [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59. – P. 11367–11384.
354. WHO informal consultation with manufacturers of artemisinin-based pharmaceutical products in use for the treatment of malaria, 24 August 2007. – Geneva, 2007. – 33 p.
355. Studies on dynamics of growth and biosynthesis of artemisinin in hairy roots of *Artemisia annua* L. / B. Liu, H. Ye, G. Li [et al.] // Chin J Biotechnol. – 1998. – Vol. 14, № 4. – P. 249–254.
356. Patra N. Artemisinin production by plant hairy root cultures in gas- and liquid-phase bioreactors / N. Patra, A. K. Srivastava // Plant Cell Rep. – 2016. – Vol. 35, № 1. – P. 143–153.
357. Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica* / A. Mannan, N. Shaheen, W. Arshad [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, № 18. – P. 3288–3292.
358. Fructan metabolism in grasses and cereals / C.J. Pollock, A.J. Cairns // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1991. – Vol. 42, № 1. – P. 77–101.

359. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Phys. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
360. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants / Yu. Luchakivskaya, O. Kishchenko, I. Gerasymenko [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30, № 3. – P. 407–415.
361. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cichorium intybus* L. With interferon- $\alpha$ 2b gene / N. Matvieieva, A. Shakhovsky, I. Gerasymenko [et al.] // *Biopolymers and Cell.* – 2009. – Vol. 25, № 2. – P. 120–125.
362. Маниатис Т. Методи генетической инженерии / Т. Маниатис, Е.Ф. Фрич, Дж. Сэмбрук – Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
363. Дрейпер Дж. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений / Дж. Дрейпер – Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – с. 241-245.
364. Методы биохимического исследования растений / Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. [и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143 с.
365. Method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography / P. Albersheim, D.J. Nevins, P.D. English [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 1967. – Vol. 5. – P. 340–345.
366. Drobot K. Artemisinin content in *Artemisia vulgaris* L. *in vitro* cultivated plants and “hairy” roots / K. Drobot, A. Ostapchuk, N. Matvieieva // Scientific proceedings of the international network *AgroBioNet* of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2016. – № 1 – P. 518–520.
367. Дробот К.О. Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes* / К.О. Дробот, Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – Т. 19. – С.117–120.

368. Ашмарин И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев – Л.: Медгиз, 1962 – 180 с.
369. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для студентов биологических специальностей вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. школа. – 1990. – 352 с.
370. Tukey, John (1949). One degree of freedom for non-additivity. *Biometrics* 5 (3): 232–242
371. Bhadane B. Data on the cost effective surface sterilization method for *C. carandas* (L.) seeds and callus induction from aseptic seedling / B. Bhadane, R. Patil // *Data in Brief*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1551–1555.
372. Elfahmi. Optimization of genetic transformation of *Artemisia annua* L. Using *Agrobacterium* for Artemisinin production / Elfahmi, S. Suhandono, A. Chahyadi // *Pharmacogn Mag.* – 2014. – Vol. 10. – P. 176–180.
373. Seed germination of seven desert plants and implications for vegetation restoration / L. Lai, L. Chen, L. Jiang [et al.] // *AoB Plants*. – 2016. – Vol. 8. – P. 1–10.
374. Garay-Arroyo A. Hormone symphony during root growth and development / A. Garay-Arroyo, M. De La Paz Sanchez, B. Garcira-Ponce [et al.] // *Dev. Dynam.* – 2012. – Vol. 241. – P. 1867–1885.
375. Dodds J.H. Experiments in Plant Tissue Culture. / J.H. Dodds, L.W. Roberts – 2nd Ed. Cambridge University Press. – Cambridge, 1985. – 272 p.
376. Дробот Е.А. *In vitro* растения рода *Artemisia* как продуценты биологически активных соединений / Е.А. Дробот, Н.А. Матвеева // *Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality»*, Nitra, Slovakia. – 2015. – № 1 – P.127–130.

377. Gupta R. Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved / R. Gupta, S.K. Chakrabarty // *Plant Signal. Behav.* – 2013. – Vol.8, № 9. – P. 1–5. – Article ID e25504.
378. Tahir S.M. Micro Propagation Of Wormwood (*Artemisia Annu* L.) Using Leaf Primordia / S.M. Tahir, I.S. Usman, M.D. Katung [et al.]. // *Sci. World J* – 2013 – Vol. 8, № 1. – P. 1–7.
379. Holobiuc I. *In vitro* culture introduction for *ex situ* conservation of some rare plant species. / I. Holobiuc, R. Blindu // *Rom. J. Biol. – Plant Biol.* – 2007. – Vol. 51-52. – P. 13–23.
380. Zia M. Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L. / M. Zia, M. Riaz-ur-Rehman, M.F. Chaudhary // *Afr J. Biotech.* – 2007 – Vol. 6, № 16. – P. 1874–1878.
381. *In vitro* Selection and Hormonal Regulation in Cell Culture of *Artemisia annua* L. / A. Dangash, M. Ram, R. Niranjana [et al.]. // *Plant. JSM Cell. Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 1013–1020.
382. Дробот К.О. Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn-α2b* людини / К.О. Дробот, А.М. Шаховський, Н.А.Матвєєва // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2015. – Т.17. – С.145-147.
383. Drobot K. O. Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) “hairy” root culture production / K.O. Drobot, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // *Biotechnologia acta.* – 2016. – Vol.9, №2. – P. 55–60.
384. Drobot K.O. Transgenic *Artemisia dracunculus* L. “hairy” root culture construction / K.O. Drobot, A.M. Shakhovsky, N.A. Matvieieva // Тези доповідей Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології», 11-13 жовтня, 2015 р. – Львів, 2015. – С. 110.
385. Пат. КМ № 116312 Україна. Спосіб отримання культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia dracunculus* L. / Н.А. Матвєєва, **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, В.П. Дуплій – Опубл. 20. 03. 2017.

386. Nurzyńska-Wierdak R. Herb yield and bioactive compounds of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). / R. Nurzyńska-Wierdak, G. Zawiślak // *Hortorum Cultus* – 2014. – Vol.13, № 2. – P. 207–221.
387. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. / J. Han, H. Wang, H. Ye [et al.]. // *Plant Sci.* – 2005. – Vol. 168. – P. 73–80.
388. An improved *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua* L. by using stem internodes as explants. / N. Tian, S. Liu, H. Ting // *Czech J. Genet. Plant Breed.*, – 2013. – Vol. 49. – P. 123–129.
389. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of *Artemisia annua*: Production of Transgenic Plants / S. Banerjee, M. Zehra, M.M. Gupta // *Planta Med.* – 1997. – Vol. 63, № 5. – P. 467–469.
390. Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*. / P. Dupre, Y. Lacoux, G. Neutelings [et al.]. // *Physiol Plant.* – 2000. – Vol.108. – P. 413–419.
391. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root production in tea leaves *Camellia sinensis* (L.) / K.M.M. John, S.D. Joshi, A.K.A. Mandal [et al.]. // *Indian J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 8. – P. 430–434.
392. How *Agrobacterium rhizogenes* triggers *de novo* root formation in a recalcitrant woody plant: An integrated histological, ultrastructural and molecular analysis. / G. Falasca, M. Reverberi, P. Lauri [et al.]. // *New Phytol.* – 2000. – Vol. 145, № 1. – P. 77–93.
393. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. / Y.R. Danesh, G. Mohammadi, A. Alizadeh // *J. Bio. Sci.* – 2006. – Vol. 6. – P. 87–91.
394. Tu Y.Y. From *Artemisia annua* L. to artemisinin: the discovery and development of artemisinin and antimalarial agents / Edited by YouYou Tu – Cambridge: Academic Press, 2017. – 468p.

395. Panda BM. Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L. / B.M. Panda, U.J. Mehta, S. Hazra // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, № 1. – Article ID 28401459.
396. Ahlawat S. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants / S. Ahlawat, P. Saxena, M. Ram [et al.]. // Afr. J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 11, – 8684–8691.
397. Pavlova O.A. Rol-genes of *Agrobacterium rhizogenes*. / O.A. Pavlova, T.V. Matveyeva, L.A. Lutova // Rus. J. Genet.: Appl. Res. – 2014. – Vol. 4, № 2. – 137–145.
398. Levesque H. Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T- DNAs of *Agrobacterium tumefaciens* / H. Levesque, P. Delepelaire, P. Rouzé [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1988. – Vol. 11. – P. 731–744.
399. Dehio C. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T- DNA / C. Dehio, K. Grossmann, J. Schell [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1993. – Vol. 23. – P. 1199–1210.
400. Nilsson O. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots / O. Nilsson, O. Olssen // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 100. – P. 463–473.
401. Altamura MM. *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: Regulation and involvement in plant development / MM. Altamura // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2004. – Vol. 77. – P. 89–101.
402. Schmulling T. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development / T. Schmulling, J. Schell, A. Spena // The EMBO J. – 1988. – Vol.7. – P. 2621–2629.
403. Kiani B.H. Comparative artemisinin analysis in *Artemisia dubia* transformed with two different *Agrobacteria* harbouring *rol ABC* genes / B.H. Kiani, N. Safdar, A. Mannan, [etal.]. // Plant Omics. – 2012. – Vol. 5, № 4. – P. 386–390.



404. Kim Y.J. Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems / Y.J. Kim, P.J. Weathers, B.E. Wyslouzil // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 83, № 4. – P. 428–443.
405. Kanokwaree K. Application of Membrane Tubing Aeration and Perfluorocarbon To Improve Oxygen Delivery to Hairy Root Cultures. / K. Kanokwaree, P.M. Doran // *Biotechnol. Prog.* – 1998. – Vol. 14. – P. 479–486.
406. Bordonaro J.L. Inhibitory role of root hairs on transport within root culture bioreactors. / J.L. Bordonaro, W.R. Curtis // *Biotechnol. Bioeng.* – 2000. – Vol. 70, № 2. – P. 176–186.
407. Shiao T.L. Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures. / T.L. Shiao, P.M. Doran // *J. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 83, № 3. – P. 199–210.
408. Towler M. J. Using an aerosol deposition model to increase hairy root growth in a mist reactor. / M.J. Towler, B.E. Wyslouzil, P.J. Weathers // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – Vol. 96, № 5. – P. 881–891.
409. Smith T. C. Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: Growth and artemisinin production / T.C. Smith, P.J. Weathers, R.D. Cheetham // *In Vitro Cell. & Dev. Bio. - Plant.* – 1997. – Vol. 33, №1. – P. 75–79.
410. 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 [et al.] // *Intl. J. of biomed.* – 2013. – Vol. 3, № 2. – P.139–144.
411. Сайт ТМ Агробиотех [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.agrobiotech.com.ua/ua/>
412. Sunflower: a potential fructan-bearing crop? / G.M.A. Martínez-Noël, G.A.A. Dosio, A.F. Puebla [et al.]. // *Front. Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – Article ID 26528295.
413. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots / E.M. Hellwege, S. Czaplá, A. Jahnke [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8699–8704.

414. Tailor-made fructan synthesis in plants: a review. / J. Van Arkel, R. Sévenier, J.C. Hakkert [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2013. – Vol. 93, № 1. – P. 48–56.
415. Baert J.R.A. Cultivation and breeding of root chicory for inulin production. / J.R.A. Baert, E.J. Van Bockstaele // Ind. Crops & Prods. – 1992. – Vol. 1, № 2–4. – P. 229–234.
416. Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyl transferase / N. Sprenger, L. Schellenbaum, K. Van Dun [et al.] // FEBS Lett. – 1997. - Vol. 400, № 3. – P.355–358.
417. Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a *Bacillus subtilis* sacB gene. / X.Y. Ye, X.W. Wu, Z.H. Zhao [et al.] // Plant Cell. Rep. – 2001. – Vol. 20, № 3. – P. 205–212.
418. Strong increase of foliar inulin occurs in transgenic lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) overexpressing the asparagine synthetase A gene from *Escherichia coli*. / A.P. Sobolev, A.L. Segre, D. Giannino [et al.] // J. of Agric. & Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 26. – P. 10827–10831.
419. Inulin-type fructan and infusion of *Artemisia vulgaris* protect the liver against carbon tetrachloride-induced liver injury. / M.L. Corrêa-Ferreira, M.H. Verdan, F.A. Dos Reis Lívero [et al.] // Phytomed. – 2017. – Vol. 24, – P. 68–76.
420. Порівняльна оцінка вмісту поліфруктанів у бородатих коренях та рослинах роду *Artemisia* В.П. / Дуплій, К.О. Дробот, Я.І. Ратушняк, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика – 2017. – Т.49, №4. – С. 321-327.
421. Cairns A.J. Fructan biosynthesis in transgenic plants / A.J. Cairns // J. Exper. Botany. – 2003. – Vol. 54, № 382. – P. 549–567.
422. Priecina, L.; Karklina, D. Determination of major sugars in fresh and dried spices and vegetables using high performance liquid chromatography / L. Priecina, D. Karklina // Proceedings of the 9th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT, May 8–9, 2014. – Jelgava, 2014. – P. 198–201.
423. Study of artemisinin and sugars accumulation in *Artemisia vulgaris* and *Artemisia dracunculus* “hairy” root cultures / K. Drobot, N. Matvieieva, A.

Ostapchuk, M. Kharkhota // Preparative Biochemistry and Biotechnology – 2017 – Vol.47, №8. – P. 776-781.

424. Chemat F. Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice / Ed.: F. Chemat, J. Strube. – NYSE: Wiley, 2015. – 384 p.

425. Galanakis C. Nutraceutical and functional food components: effects of innovative processing techniques / Ed.: Ch. Galanakis. – Cambridge: Academic Press, 2017. – 382 p.

426. Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. / G. Weyens, T. Ritsema, K. Van Dun [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2004. – Vol. 2, № 4. – P. 321–327.

427. The complement of soluble sugars in the *Saccharum* complex. / D. Glassop, L. Ryan, G. Bonnett [et al.] // Tropical Plant Biol. – 2010. – Vol.3, №2. – P. 110–122.

428. Bulgakov V.P. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with *rol* genes / V.P. Bulgakov, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik // Meth. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 643, №1. – P. 229–242

429. Analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC–MS with selected ion monitoring. / M. Wang, C. Park, Q. Wu [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, № 18. – P. 7010–7013.

430. Hsu E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. / E. Hsu // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2006. – Vol. 100. – P. 505–508.

431. Production of antileukemic agent in untransformed and transformed root cultures of *Artemisia cina*. / Aryanti, M. Bintang, T.M. Ermayanti [et al.] // Annales Bogorienses. – 2001. – Vol. 8. – P. 11–16.

432. Zia M. Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. / M. Zia, M. Abdul, M.F. Chaudhary // Pak. J. Bot. – 2007. – Vol. 39. – P. 799–805.

433. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. / H.A. Arab, S. Rahbari, A. Rassouli, [et al] // Trop. Anim. Health Prod. –2006. – Vol. 38. – P. 497–503.

434. *Artemisia annua* mutant impaired in artemisinin synthesis demonstrates importance of nonenzymatic conversion in terpenoid metabolism. / T. Czechowski, T. Larsona, T. Cataniaa [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2016. – Vol. 113, № 52. – P. 15150–15155.
435. Artemisinin and total flavonoid content in *in vitro* cultivated *Artemisia annua* L. “hairy” root culture / K.O. Drobot, T.N. Matvieieva, M. Kharkhota, A. Shakhovsky, Y.A. Ratushnyak // Scientific proceedings of the international network AgroBioNet of the institution and researcher of international research, education and development programme «Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality», Nitra, Slovakia. – 2017. – № 1 – P. 91-94.
436. Mueller M. S. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for *malaria* in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects / M. S. Mueller, I. B. Karhagomba, H. M. Hirt, E. Wemakor // J Ethnopharmacol – 2000. – Vol. 73, № 3. – P. 487–493.
437. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the medicinal halophyte *Reaumuria vermiculata* / M. Karker, H. Falleh, K. Msaada [et al.] // EXCLI Journal. – 2016. – Vol. 15. – P. 297–307.
438. Singh R. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. / R. Singh, P. K. Verma, G. Singh. // J. Intercult. Ethnopharmacol. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 101–104.
439. Xanthine oxidase-inhibitory activity and antioxidant properties of the methanol extract and flavonoids of *Artemisia asiatica*. / Z. Hajdú, A. Martins, O. Orbán-Gyapai [et al.] // Rec. Nat. Prod. – 2014. – Vol. 8, №3. – P. 299–230.
440. Qnais E. Analgesic and anti-inflammatory effects of an extract and flavonoids from *Artemisia Herba-Alba* and their mechanisms of action. / E. Qnais, D. Raad, Y. Bseiso // Neurophysiology. – 2014. – Vol. 46, №3. – P. 238–246.
441. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. / R. Baraldi, B. Isacchi, S. Predieri [et al.] // Biochem. Syst. Ecol. – 2008. – Vol. 36, №5. – P. 340–348.

442. Antioxidant Properties of *Artemisia annua* Extracts in Model Food Emulsions. / M. Skowrya, M.G. Gallego, F. Segovia [et al.]. // Antioxidants. –2014. – Vol. 3, №1. – P. 116–128.
443. Flavonoids content in sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) “hairy” root culture / K.O. Drobot, N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky // Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June, 2017 – Kyiv, 2017. – P.67
444. Gill S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 48. – P. 909–930.
445. Yildirim A. The antioxidant activity of leaves of *Cydonia vulgaris*. // A. Yildirim, M. Oktay, V. Bilaloğlu // Turk. J. Med. Sci. – 2001. – Vol. 31. – P. 23–27.
446. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. / M.S. Blois // Nat. – 1958. – Vol. 181. – P. 1199–1200.
447. “Hairy” root cultures as a source of biologically active substances / N. Matvieieva , K. Drobot , A. Shakhovsky , A. Ostapchuk , Yu. Kudryavets // International Conference «Smart Bio», 18-20 May, 2017. – Каунас, 2017. – P. 38.
448. Temraz A. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*. / A. Temraz, W.H. El-Tantawy // Pak. J. Pharm. Sci. – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 321–326.
449. Chukwurah P.N. Protective capacity of *Artemisia annua* as a potent antioxidant remedy against free radical damage. / P.N. Chukwurah, E.A. Brisibe, A.N. Osuagwu [et al.] // Asian Pac. J. Trop. Biomed. – 2014. –Vol. 4. – P. 92–98.
450. Dilshad E. *Rol* genes enhance the biosynthesis of antioxidants in *Artemisia carvifolia* Buch. / E. Dilshad, H. Ismail, I. Haq [et al.] // BMC Plant Biology. – 2016. – Vol. 16, № 125. – Article ID e0140266.

451. El-Esawi M.A. Genetic Transformation and Hairy Root Induction Enhance the Antioxidant Potential of *Lactuca serriola* L. / M.A. El-Esawi, A. Elkelish, H.O. Elansary [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2017. – Article ID. 5604746.
452. Lagrimini L.M. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants / L.M. Lagrimini, S. Bradford, S. Rothstein // *Plant Cell.* – 1990. – Vol. 2, № 1. – P. 7–18.
453. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense / V.P. Bulgakov, T.Y. Gorpenchenko, G.N. Veremeichik [et al.] // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 158, № 3. – P. 1371–1381.
454. Huang T.J. Antiviral activity of chemical compound isolated from *Artemisia morrisonensis* against hepatitis B virus *in vitro*. / T.J. Huang, S.H. Liu, Y.C. Kuo // *Antiviral Res.* – 2014. – Vol. 101. – P. 97-104.
455. Antiviral activities of aerial subsets of *Artemisia* species against Herpes Simplex virus type 1 (HSV1) *in vitro* / M.K. Karamodini, S.A. Emami, M.S. Ghannad [et al.] // *Asian Biomed.* – 2011. – Vol. 5, №. 1. – P. 63–68.
456. Матвєєва Н.А. Противірусна активність екстрактів трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* / Н.А. Матвєєва, К.О. Дробот, О.П. Трохименко // Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості», 17-18 жовтня, 2017 р. – Харків, 2017. – С 68-71
457. Противірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2B$  людини / Є.В. Ісаєва, А.А. Лісняк, О.П. Трохименко, А.О. Потрохов, К.О. Дробот, Н.А. Матвєєва // Тези доповідей ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття», 24 квітня 2015. – Київ, 2015. – С.45.
458. Ability of orally administered IFN-alpha-containing transgenic potato extracts to inhibit *Listeria monocytogenes* infection / K. Ohya, T. Matsumura, N. Itchoda [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2005. – Vol. 25, № 8. – P. 459–466.

459. Expression of human *ifn- $\alpha$ 2b* gene in ginseng cells. / Ren Qi, C.-Yi Wang, Z.-M. Song [et al.] // Chem. Res. Chinese Univ. – 2010. – Vol. 26, №3. – P. 420–426.