

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ Олена КВАСКО
« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Отримання культури «бородатих» коренів шавлії лікарської
(*Salvia officinalis L.*)»**

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент
кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО
(підпис)

Керівник кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук, доцент
кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО
(підпис)

Виконав

_____ Кирило ЯНКОВСЬКИЙ
(підпис)

КИЇВ-2025

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ Олена КВАСКО

« ____ » _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи
студенту**

Янковському Кирилу Олеговичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Отримання культури «бородатих» коренів шавлії лікарської (*Salvia officinalis L.*)», затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024 р. № 1880 “С”.

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року.

Вихідні дані до роботи: рослини *Salvia officinalis L.*; живильне середовище Мурасіге і Скуга; бактерії *Agrobacterium rhizogenes*.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Одержати асептичні експланти *Salvia officinalis L.*
2. Отримати лінії «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.*
3. Підтвердити перенесення гену *rolB* Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* в геном рослин *Salvia officinalis L.* за допомогою ПЛР.
4. Встановити ростові показники одержаних ліній «бородатих» коренів.

Дата видачі завдання 23 жовтня 2024 року

Завдання прийняв до виконання _____
(підпис)

Кирило ЯНКОВСЬКИЙ

Керівник
кваліфікаційної роботи _____
(підпис)

Олена КВАСКО

РЕФЕРАТ

Загальний обсяг роботи 49 сторінок, вона включає вступ, три розділи, висновки, а також складається з 11 рисунків, 9 таблиць, переліку умовних позначень, списку використаних джерел та додатків.

Мета дослідження – отримання культури «бородатих» коренів шавлії лікарської (*Salvia officinalis* L.) шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

Завдання дослідження:

- Проведення огляду літератури для визначення ботаніко-біологічних характеристик *Salvia officinalis* L., БАР рослини та їх ролі в медичній галузі, дослідження бактерії *Agrobacterium rhizogenes*, а також механізму формування «бородатих» коренів, їх використання.
- Провести стерилізацію експлантів *Salvia officinalis* L., підібрати живильне середовище для росту та встановити оптимальні умови культивування.
- Здійснити *Agrobacterium rhizogenes*-опосередковану трансформацію.
- Підібрати буферні розчини, специфічні праймери, визначити умови проведення ПЛР для підтвердження наявності *rolB* гену в трансформованих коренях молекулярними методиками.
- Встановити загальний та середньодобовий приріст біомаси «бородатих» коренів *Salvia officinalis* L.

Об'єкт дослідження – *Salvia officinalis* L.

Предмет дослідження – процес *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації *Salvia officinalis* L.

Методи дослідження:

- Біотехнологічні (введення рослин в асептичну культуру, *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована трансформація).
- Молекулярно-генетичні (гель-електрофорез, ПЛР).
- Статистичні.

В результаті дослідження було отримано 8 ліній «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.* Встановлено, що лінія №7 відзначалась найвищим загальним та середньодобовим приростом біомаси «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.* (90,6 мг та 6,5 мг/добу відповідно). В ході двотижневого культивування одержано 586,3 мг «бородатих коренів», тобто загальний приріст становив 536,2 мг, а середньодобовий – 4,8 мг/лінію.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. <i>Salvia officinalis L.</i> як об’єкт дослідження	11
1.1.1. Систематичне положення, морфологічні особливості та поширення рослини.....	11
1.1.2. БАР шавлії лікарської	13
1.1.3. Використання <i>Salvia officinalis L.</i> в медичній галузі	14
1.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
1.3. Культура “бородатих” коренів та її застосування в різних галузях.....	18
1.3.1. Особливості “бородатих” коренів та механізм їх утворення	18
1.3.2. Використання в фармацевтиці	20
1.3.3. Застосування <i>Agrobacterium rhizogenes</i> в ролі вектора та дослідження функції генів	21
1.3.4. Отримання рослин-регенерантів	22
1.3.5. Залучення до фіторемедіації	22
1.3.6. Регенерація цілої рослини та вивчення взаємодії ґрунтових мікроорганізмів з рослинами	24
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1. Стерилізація експлантів	25
2.2. Живильне середовище	25
2.2.1. Підбір середовища	25
2.2.2. Приготування середовища	26
2.3. Перенесення експлантів на середовище та умови культивування	27
2.4. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> -опосередкована трансформація.....	28
2.5. Молекулярно-біологічний аналіз корневих структур <i>Salvia officinalis</i> <i>L.</i>	29

2.5.1. Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з шавлії лікарської.....	29
2.5.2. Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	31
2.5.3. Проведення ПЛР	31
2.6. Виявлення приросту біомаси «бородатих» коренів	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	34
3.1. Ефективність стерилізації, введення <i>Salvia officinalis L.</i> в асептичну культуру та отримання ліній «бородатих» коренів.....	34
3.2. Проведення ПЛР	36
3.3. Швидкість накопичення біомаси «бородатими» коренями.....	38
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41
ДОДАТКИ.....	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- dNTP – рибонуклеотидтрифосфат
ORF – відкрита рамка зчитування
Ri-плазмiда – плазмiда, що iндукує коренеутворення
ТАЕ – трис-ацетатний буфер
Taq-полiмераза – термостабильна ДНК-полiмераза I
TE – трис-ЕДТА буфер
TL-ДНК – лiва частина T-ДНК
Tris – трис(гiдроксиметил)амiнометан
Vir-регiон – вiрулентний регiон
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
2,4-ДФ – 2,4-дихлорфенол
БАП – 6-бензиламiнопурин
БАР – бiологiчно активнi речовини
ДДТ – дихлордифенiлтрихлороетан
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА – етилендiамiнтетраоцтова кислота
МС – Мурасiге i Скуг
НОК – α -нафтилоцтова кислота
ПЛР – полiмеразна ланцюгова реакцiя
T-ДНК – перенесена дезоксирибонуклеїнова кислота
ЦТАБ – цетилтриметиламонiйбромiд
ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Отримання культури «бородатих» коренів є перспективним біотехнологічним напрямком. Актуальність пов'язана з накопиченням цільових вторинних метаболітів у кореневих структурах. Для останніх притаманний плагіотропний ріст, утворення великої кількості бічних коренів, інтенсивне галуження, формування корневих волосків та посилений ріст за короткий проміжок часу. До того ж, вони характеризуються ростом на живильному середовищі без екзогенних регуляторів росту, здатністю розвиватись в темнових умовах та існувати без надземного сегменту рослини. Окрім фармацевтичної галузі цей підхід може бути використаний при проведенні фітореMediaції в контексті біореMediaції, дослідженні функції генів при створенні штучних генетичних конструкцій, регенерації цілого рослинного організму, а також дослідженні взаємодій між культурами та мікроорганізмами, одержанні трансформованих рослин зі зміненими фенотиповими ознаками.

Подібні зміни досягаються шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Т-ДНК *Ri*-плазмиди бактеріального агенту інтегрується в геном рослинного організму. До складу вектора входять *rol*-гени, які кодуєть ферменти, що індують ріст специфічних коренів, а також відповідають за синтез фітогормонів тканинами. Окрім цього, *rol*-гени сприяють початку транскрипції та активізують синтез вторинних метаболітів.

Salvia officinalis L. (шавлія лікарська) – багаторічна трав'яниста рослина, що набула поширення на території Європи та Азії. Вона характеризується високим вмістом БАР (жирні кислоти, алкалоїди, фенольні сполуки, вуглеводи, глікозиди та їх похідні, стероїди, поліацетилени, моно-, ди-, три-, сесквітерпеноїди, віск), що переважно використовуються у медицині для лікування хвороб очей, шкіри, легень, розладів ШКТ, лихоманки, запалень ротової порожнини, як аналог стандартним антибіотикам, в профілактичних цілях для зменшення ймовірності виникнення раку.

Зважаючи на широкий спектр застосування «бородатих» коренів, відносно простий у виконанні процес отримання трансгенних культур, швидкі темпи росту кореневих структур, а також важливість *Salvia officinalis L.* як лікарської рослини, було прийнято рішення провести *Agrobacterium rhizogenes*-опосередковану трансформацію шавлії лікарської для індукції утворення «бородатих» коренів та накопичення в них вторинних метаболітів рослини.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. *Salvia officinalis* L. як об'єкт дослідження

1.1.1. Систематичне положення, морфологічні особливості та поширення рослини

Шавлія (*Salvia* L.) являє собою чагарник, напівчагарник, чи трав'янисту рослину, яка відноситься до родини губоцвітих (*Lamiaceae*). Кількість представників роду сягає 1000. Приблизно 10 видів можна зустріти на просторах Середньої Європи.

Батьківщиною шавлії лікарської (*Salvia officinalis* L.) прийнято вважати Середземномор'я. З метою виділення ефірної олії та біологічно активних речовин, а також в якості декоративної рослини її культивують в Україні, Північному Кавказі, Молдові [1]. Згідно зі статистикою, найбільша кількість задокументованих рослин знаходиться в Іспанії, Чехії, Швейцарії та Словаччині [2].

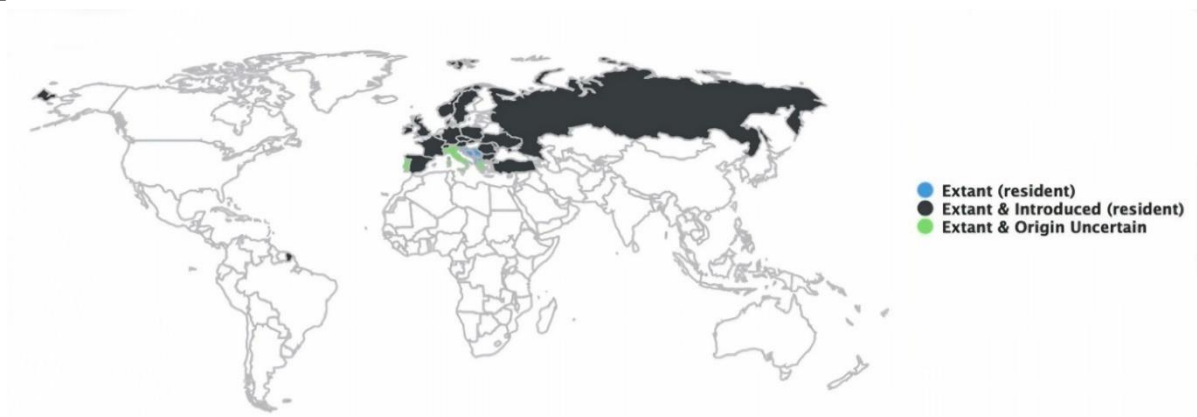


Рис. 1.1. Території поширення *Salvia officinalis* L. [3].

Таблиця 1.1

Систематичне положення *Salvia officinalis* L. [4].

Домен	Еукаріоти
Царство	Рослини (<i>Plantae</i>)
Відділ	Судинні рослини (<i>Tracheophyta</i>)

Клас	Дводольні/Магноліопсиди (<i>Magnoliopsida</i>)
Порядок	Губоцвіті (<i>Lamiales</i>)
Родина	Губоцвіті/Глухокропівові (<i>Lamiaceae</i>)
Рід	Шавлія (<i>Salvia L.</i>)
Вид	Шавлія лікарська (<i>Salvia officinalis L.</i>)

Salvia officinalis L. – багаторічна рослина заввишки близько 60-70 см, що має дерев'янисту основу. Візуально кущ округлий, для нього притаманна ширина до 70 см. Гілки, які беруть початок від основи – чотиригранні. Стебло чотиригранне подібно до гілок, чагарникове та розгалужене. Листя довге, товсточерешкове, сильно опушене, зазвичай верхня його частина має сіро-зелене забарвлення, проте іноді присутні фіолетові, рожеві, жовті, чи кремові відтінки. Нижня сторона біла або блідо-зелена. Обидві сторони листа вкриті білими волосками. Листя супротивне, товсте, зубчасте, зморшкувате, яйцевидно-ланцетне, округле біля основи, має виражене сітчасте жилкування. Пластинка еліпсоїдна, довжиною 3-7 см, не надто гостра на верхівці. Стандартна ширина листків – 2,5 см, проте ті, які знаходяться біля основи, мають меншу ширину та довжину відповідно [5].



Рис. 1.2. *Salvia officinalis L.* [6].

Черешок довжиною 4-5 см, з'єднує стебло та листя, вкритий волосками. Квіти характеризуються синьо-фіолетовим кольором, подекуди з білим вкрапленням. Кількість пелюсток варіюється від 6 до 12, а кількість рядів, у які вони зібрані – 4-8. Квіти розташовуються на довгих колосках, у віддалених колотівках, кожна з яких містить кілька квіток та гострі, овальні приквітки. Трубчаста чашечка має 2 губи, нижня серед яких має 2 гострих зубця, а верхня, в свою чергу – 3. Віночок кільцеподібний, трубчастий, аналогічно до чашечки має 2 губи. Верхня – увігнута, а нижня – розділена на 3 круглі частинки. Квітконіжка прикріплена до тичинкової нитки строго посередині, підтримуючи її [7].

1.1.2. БАР шавлії лікарської

Більшість сполук, які містяться в тканинах рослини, добре ідентифіковані. Визначено, що до складу *Salvia officinalis L.* входить велике різноманіття біологічно активних речовин, а саме: жирні кислоти, алкалоїди, фенольні сполуки (флавоноїди, кумарини, таніни), вуглеводи, глікозиди (флавоноїдні, серцеві) та їх похідні (сапоніни), стероїди, поліацетилени, моно-, ди-, три-, сесквітерпеноїди, віск [8].

Переважає більшість описаних вище сполук виділена з настоїв, спиртового та водного екстрактів, ефірних олій рослини. Останні одержують з надземного сегмента шавлії. В ефірних оліях міститься приблизно 120 компонентів серед яких найбільш вивчені – борнеол, цинеол, пінен, камфару, елемен, каріофілен, гумулен, туйон та леден. Виявлено, що екстракти *Salvia officinalis L.* містять флавоноїди (хлорогенова, елагова, розмаринова кислоти, лютеолін-7-глюкозиди, епікатецин, кверцетин, епігалокатехінгалат, рутин), фенольні кислоти (3-кофеїлхінна та кавова), леткі органічні сполуки. До складу настоїв з різних частин шавлії входять леткі органічні сполуки (туйон, цинеол, борнеол, камфара). В екстракті настоя фіксуються найвищі рівні елагової та розмаринової кислот, трохи нижчий відсоток кверцетину, рутину та хлорогенової кислоти.

Серед вуглеводів найбільш поширені галактоза, арабіноза, маноза, глюкоза, рамноза, ксилоза та уронові кислоти.

Вчені при порівнянні БАР надземної частини *Salvia officinalis L.* відзначили, що ліналоол – ключова біологічно активна сполука в стеблі, цинеол і α -пінен – основні речовини, які містяться в квітах, камфен, гумулен, борнілацетат, камфора, туйон і лімонен – компоненти листя рослини. Варто зазначити, що не зважаючи на існуючі дослідження, склад шавлії різниться залежно від місця вирощування та умов середовища (тип ґрунту і його кислотність, відсоток вологи, доступність води, температура, вплив біотичних та абіотичних стресових факторів) [9].

1.1.3. Використання Salvia officinalis L. в медичній галузі

Шавлію з давніх часів застосовували в традиційній медицині через антимікробну дію. Основне спрямування – антисептична, протизапальна, протисифілітична дія. До того ж, екстракти на основі рослини та її ефірні олії використовують при захворюваннях очей, шкіри, розладах ШКТ і для лікування лихоманки.

Нині велика кількість досліджень націлена на детальніше вивчення антимікробних властивостей ефірних олій, оскільки існує ймовірність, що завдяки своїм ефектам вони стануть аналогами звичних антибіотиків. Варто зазначити, що ефірні олії на відміну від останніх не спричиняють бактеріальну резистентність. БАР *Salvia officinalis L.* здатні пригнічувати *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureous*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania major*.

Протизапальна дія шавлії лікарської обумовлена наявністю в тканинах урсолової кислоти. Відвари на основі рослини застосовують для лікування стенокардії, бронхіту, запалення ротової порожнини, астми. Ефірні масла наносять на поверхню тканин для усунення фарингіту, стоматиту, гінгівіту, Окрім

цього, вони мають спазмолітичну, вітрогінну дію. Перерольний прийом ефірних масел актуальний при надмірному потовиділенні.

Настої *Salvia officinalis* L. використовують через їх антиневрологічні, естрогенні, кровоспинні, гіпоглікемічні ефекти. Іноземні експерименти доводять, що метанольний екстракт шавлії лікарської можна використовувати в профілактичних цілях, щоб знизити ризик появи лейкемії. Ацетилгорміон та розмаринова кислота спричиняють зменшення числа онкогенних клітин, ймовірність появи раку товстої кишки, легень, молочних залоз [10].

1.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes – це грамнегативна бактерія, яку вперше виділив Райкер в 1930 році. Вона має паличкоподібну форму та розміри близько 0,6-1×1,5-3 мкм. Мікроорганізм аеробний та рухливий завдяки наявності 1-4 перитрихальних джгутиків. Назва “*rhizogenes*” походить від двох грецьких слів: “*rhizo*” – корінь та “*gennaō*” – робити, що вказує на властивість організму індукувати ріст коренів [11].

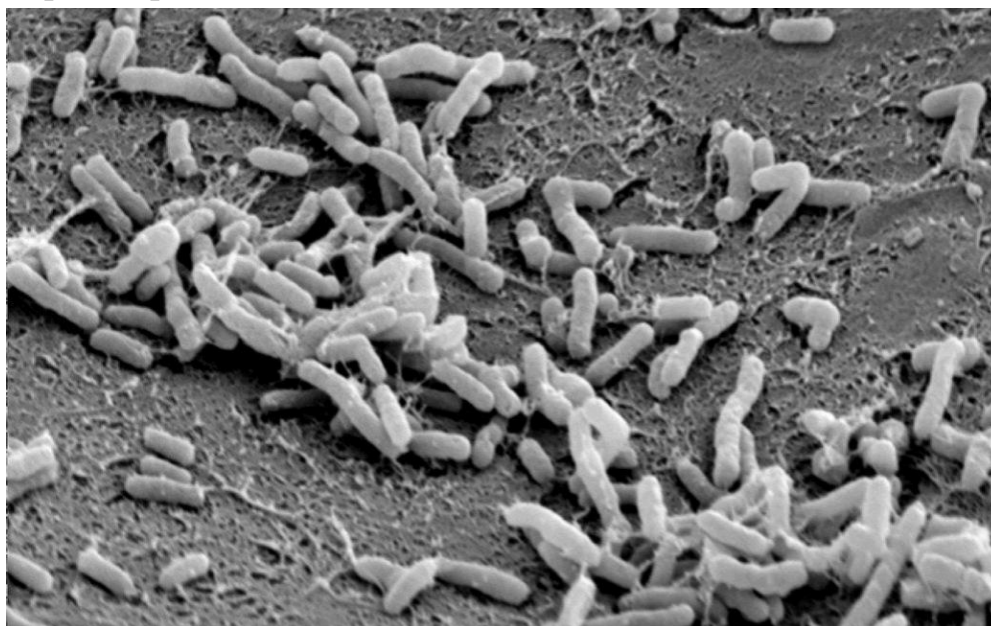


Рис. 1.3. *Agrobacterium rhizogenes* під мікроскопом [12].

Рослини-господарі бактерії ростуть як у вологих, так і в сухих регіонах Африки з тропічним та субтропічним кліматом. Найвідоміші культури в коренях яких локалізується *Agrobacterium rhizogenes* – томати, огірки, яблуни, дині.

Мікроорганізми цього виду розмножуються шляхом бінарного поділу, тобто генетичний матеріал (ДНК) материнської клітини копіюється, клітинний вміст подвоюється. Потім материнська клітина розділяється і формуються дві ідентичні їй дочірні клітини. Зміна генетичного матеріалу відбувається внаслідок горизонтального перенесення бактеріальних генів до рослини. Генетична мінливість передбачає посилення адаптаційних можливостей *Agrobacterium rhizogenes*. Варто зазначити, що бактерії, які є продуцентами агроцину здатні вступати в конкурентну взаємодію зі штамми агробактерій, що призводить до фактичної неможливості передачі генів від *Agrobacterium rhizogenes* до рослинного організму. На відміну від патогенних форм, що провокують виникнення корончатих галів, описаний мікроорганізм є корисним для культур, оскільки сформовані корені полегшують поглинання поживних речовин, води та сприяють кращому закріпленню рослин в ґрунтовому середовищі. Таким чином, *Agrobacterium rhizogenes* оздоровлює ґрунт та запобігає появі хвороб, підвищує стійкість рослин до стресів [12].

Таблиця 1.2

Систематичне положення *Agrobacterium rhizogenes* [13].

Домен	Бактерії
Тип	Протеобактерії (<i>Proteobacteria</i>)
Клас	Альфапротеобактерії (<i>Alphaproteobacteria</i>)
Порядок	<i>Rhizobiales</i>
Родина	<i>Rhizobiaceae</i>
Рід	<i>Agrobacterium</i>
Вид	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>

Agrobacterium rhizogenes в якості кінцевого акцептора електронів використовує кисень. Джерелом вуглецю виступають $C_{11}H_{21}NO_9$ та $C_{11}H_{19}NO_8$. Мікроорганізм містить катаболічну плазмиду *pArA4*, яка надає йому можливість застосовувати названі хімічні сполуки для живлення [14].

Якщо оцінювати морфологічні особливості колоній *Agrobacterium rhizogenes* на середовищі, то слід зауважити, що колір зазвичай є або білим (колонія непігментована) або світло-коричневим. Колонії випуклі та гладкі, мають рівні краї [11].



Рис. 1.4. *Agrobacterium rhizogenes* на середовищі після 4 днів інкубування [12].

Оптимальною температурою для культивування бактерії прийнято вважати проміжок 25–28 °С. рН може бути на 2 одиниці нижче або вище, ніж нейтральний показник, тому оптимальна кислотність середовища зберігається на рівні 5-9. Основним фактором росту виступає біотин. Мікроорганізм не здатний продукувати 3-кетолактозу, а також не росте на середовищі з додаванням 2% NaCl. Згубна температура для росту та розвитку *Agrobacterium rhizogenes* становить 35 °С. Побічними продуктами, які продукує бактерія прийнято вважати опіни, за вироблення яких відповідає *Ri*-плазміда. Опіни слугують джерелом енергії та азоту [11,14].

1.3. Культура “бородатих” коренів та її застосування в різних галузях

1.3.1. Особливості “бородатих” коренів та механізм їх утворення

Бактерії *Agrobacterium rhizogenes* здатні інфікувати поранені тканини через синтез фенольних сполук рослинами. Переміщення мікроорганізмів до місця поранення здійснюється за допомогою хемотаксису. В ході інфікування відбувається передача генетичного матеріалу від бактерії до рослини та її вбудовування в геном останньої. Подібна взаємодія призводить до формування “бородатих” коренів. Для них притаманний плагіотропний ріст, утворення великої кількості бічних коренів, інтенсивне галуження, формування корневих волосків та посилений ріст за короткий проміжок часу. До того ж, вони характеризуються ростом на живильному середовищі без екзогенних регуляторів росту, здатністю розвиватись в темнових умовах та існувати без надземного сегменту рослини. Деякі порівнюють їх з дедиференційованою масою калюсних клітин, проте “бородаті” корені зберігають функціональний стан та залишаються диференційованими [15].

Одержання “бородатих” коренів виконується за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Суть полягає в інтеграції T-ДНК *Ri*-плазмиди в геном рослинного організму. До складу вектора входять *rol*-гени. Останні кодують ферменти, що індукують ріст “бородатих” коренів, а також відповідають за продукування фітогормонів (цитокініни та ауксини). Окрім цього, *rol*-гени сприяють початку транскрипції та активізують синтез вторинних метаболітів. Існують 4 підтипи *rol*-генів, кожний з яких має специфічну функцію:

- *rolA* кодує білок, що є фактором транскрипції та приймає участь в метаболічних перетвореннях гіберелінів.
- *rolB* викликає посилений ріст корневих структур при експресії. До того ж, спостерігається кореляція між ефективністю експресії та розвитком

“бородатих коренів”. Тобто наслідком високої, чи низької експресії гену є послаблення росту.

- *rolC* має безпосередній вплив на чутливість рослин до фітогормонів, регулює їх вміст в тканинах, оскільки задіяний в метаболічних перетвореннях.
- *rolD* відповідає за формування меристемних тканин (приклад – пазушні бруньки) в постембріональній стадії [16].

Фланкування ділянок Т-ДНК повтарами довжиною 25 п.н. є потрібним для перебігу трансфекції. Перенесення ділянок Т-ДНК відбувається за участі *vir*-регіону плазміди у поранених областях. Загалом лінії “бородатих” коренів одержано у більше, ніж 150 видів рослин з яких переважна кількість (близько 100 видів) належать до лікарських [17]. Вибір культур для трансформації обумовлений посиленням накопиченням вторинних метаболітів в підземному сегменті рослини при дії *Agrobacterium rhizogenes*. Таким чином, у лікарських культурах фіксуються вищі рівні цінних БАР, ніж при стандартному культивуванні [18].

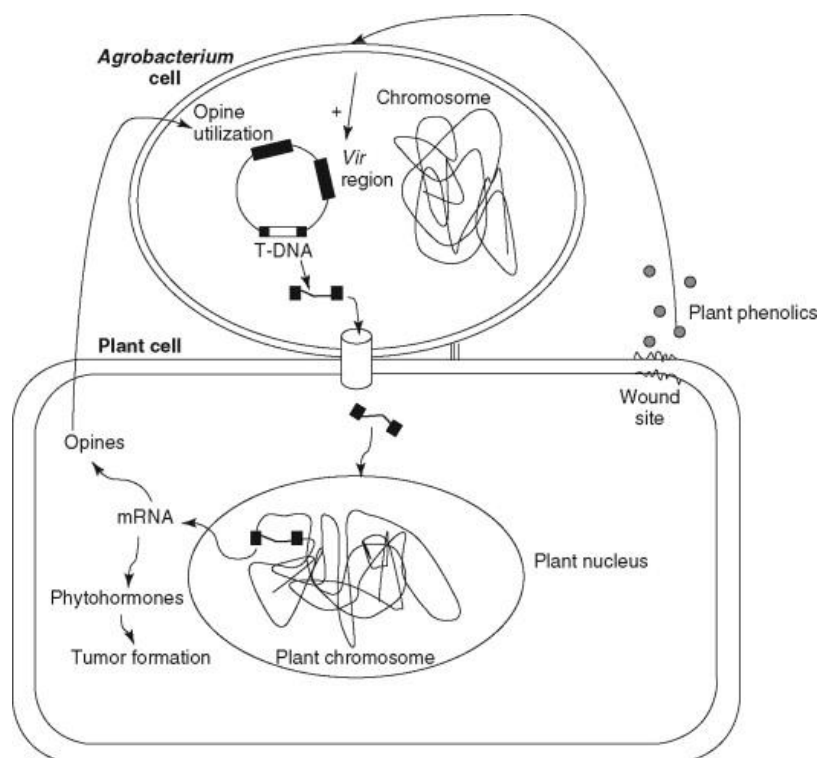


Рис. 1.5. Схема інфікування рослини *Agrobacterium rhizogenes* [19].

Хоча ключовою проблемою є нестабільний врожай, виокремлюють ряд переваг використання «бородатих» коренів:

- Висока стабільність порівняно з суспензійними культурами.
- Швидке розмноження рослин.
- Ефективне отримання цінних вторинних метаболітів [18].

1.3.2. Використання в фармацевтиці

Відповідно до іноземних досліджень, *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована трансформація може застосовуватись з метою накопичення в коренях артемізиніну (*Aquilegia vulgaris*), фруктанів (*Artemisia dracunculus*, *Artemisia annua*), флавоноїдів (*Artemisia annua*, *Aquilegia vulgaris*). Доведено, що експресія гену леггемоглобіну А знижує накопичення йонів кадмію в рослинах сої, що формували «бородаті» корені. До того ж, фіксувалось посилення стійкості до інших важких металів. В ході досліджень було одержано «бородаті» корені цикорію, що включали гени туберкульозних білків *Ag85B* та *ESAT6* мікроорганізму *Mycobacterium tuberculosis* та людський ген *a2b* інтерферону. Частина рослин цикорію характеризувалась стійкістю до гербіцидів [20].



Рис. 1.6. Культура «бородатих» коренів цикорію [21].

Культура «бородатих» коренів є перспективною при проведенні біотрансформації. Серед основних реакцій біотрансформації виокремлюють відновлення, конденсацію, глікозилювання та глікозилування. Штами *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, A4, LBA9402 вважаються найефективнішими при проведенні процесу [22].

1.3.3. Застосування *Agrobacterium rhizogenes* в ролі вектора та дослідження функції генів

Коінтегровані *Ri*-плазмиди, що застосовуються в процесі перенесення генів за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* відзначаються високою стабільністю. Тобто зміни, які внесені в геном, передаються наступним поколінням. Через цю властивість векторна конструкція на основі *Ri*-плазмиди з додатковими генами використовується з метою перенесення генів в наступних культурах: томати, тютюн, картопля. В процесі передаються гени *eGFP*, *GUS*, репортерні гени, маркерні гени *NPT II*, *HPT* та гени, що відповідають за синтез антоціанів (*ANI*, *4CL*, *PAL*, *C4H*). Створення подібних штучних генетичних конструкцій відкриває шлях до отримання рослин з бажаними властивостями [23].

До того ж, генні конструкції з матеріалом *Agrobacterium rhizogenes* дозволяють вивчати процеси експресії, фактори їх пригнічення та диференційовані рівні експресії промоторів у різних умовах. В одному з експериментів промотор, що індукований глюкокортикоїдом, застосовували для одержання «бородатих» коренів *Catharanthus roseus*. При внесенні дексаметазону (глюкокортикоїд) до середовища промотор відзначався двозалежною реакцією [24]. В іншому дослідженні вчені при дослідженні «бородатих» коренів сої виявили різницю у відповіді промотору алкогольдегідрогенази, що був злитий з геном *GUS*. Відмінності відповіді обумовлені пошкодженням тканин рослини, оксидативним стресом, різною температурою, наявністю абсцизової кислоти [25].

1.3.4. Отримання рослин-регенерантів

Рослини-регенеранти одержані внаслідок *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації характеризуються звичайним фенотипом, чи зміненим внаслідок наявності TL-ДНК. З 18 існуючих відкритих рамок зчитування TL-ДНК 4 (ORF 10,11, 12, 15 генів *rolA*, *B*, *C*, *D* відповідно) активізують утворення «бородатих» коренів. Експресія названих генів спричиняє візуальні зміни. Трансформовані рослини поділяють на 2 групи: нетрансгенні (містять тільки *rol*-гени) та трансгенні (в комплексі з *rol*-генами містять додаткові гени).

Штучні генетичні конструкції створюють з метою отримання культур з покращеними фенотиповими властивостями (поліпшене цвітіння, гілкування важливих в агрономії видів), чи рослин зі зміненими фізіологічними особливостями (здатність до акумуляції важких металів у тканинах, надсинтезу цінних вторинних метаболітів, підвищення стійкості до біотичних та абіотичних стресових факторів). Не зважаючи на описані переваги, впровадження великомасштабного одержання трансгенних культур має ряд обмежень. До них слід віднести ретельне дослідження відсутності синтезу сторонніх шкідливих сполук рослиною, аналіз ризиків, фінансування для розробки оптимальних генетичних конструкцій [26].

1.3.5. Залучення до фіторемедіації

Фіторемедіація є підходом, що передбачає ліквідацію забруднень шляхом висаджування у ґрунтове середовище рослин, які накопичують в своїх тканинах токсиканти та перетворюють їх на безпечні метаболіти.

Згідно з науковими працями, «бородаті» корені здатні підвищувати ефективність біоремедіації. Визначено, що види *Cichorium intybus*, *Helianthus annuus*, *Brassica juncea* в разі формування «бородатих» коренів ефективно усувають забруднення довкілля пестицидами (ДДТ, 2,4-ДФ) [27]. При попередньому внесенні в живильне середовище оксибензону та наступному

висаджуванні трансгенної культури *Armoracia rusticana* спостерігалась акумуляція сполуки в тканинах рослини. Подібний результат досягнуто при перенесення трансформантів соняшника на середовище з тетрацикліном та окситетрацикліном. «Бородаті» корені *Cichorium intybus* та *Brassica juncea* приймають участь в біодеградації ДДТ [28].

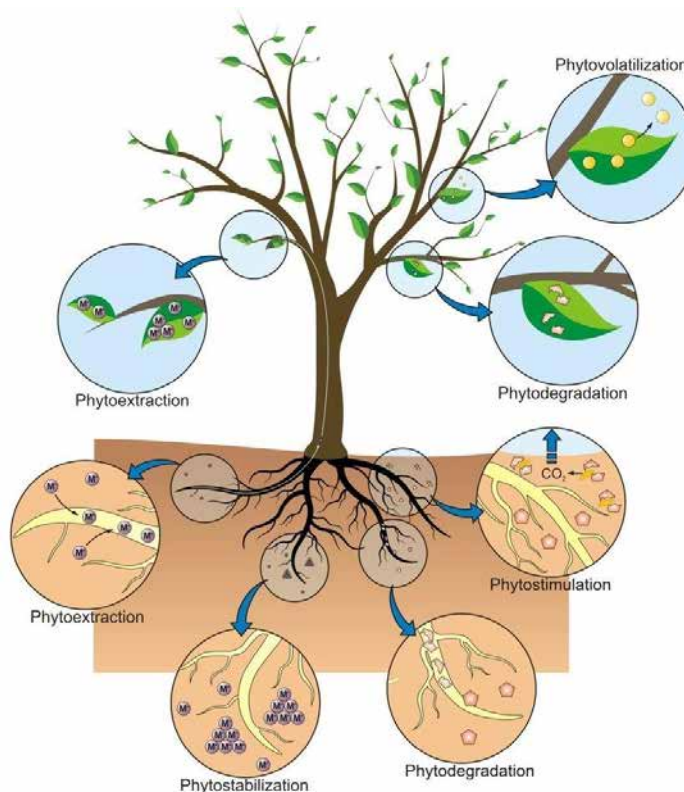


Рис. 1.7. Стратегії фітореMediaції [29].

Варто зазначити, що використання культури «бородатих» коренів є доцільним при дослідженні клітинних сигналів, клітинної відповіді, фізіологічних змін при накопиченні токсикантів. Іноді трансформовані рослини застосовують для отримання кінцевих продуктів, що багаті на важкі метали. При цьому підході транспорт речовин до верхнього сегменту рослин є обмеженим. Генетичні зміни обумовлені підвищенням експресії специфічних білків, що відповідають за акумуляцію та перенесення йонів. Тобто експресію посилюють або створюють нову сталу генетичну конструкцію з додатковими чужорідними генами [30].

1.3.6.Регенерація цілої рослини та вивчення взаємодії ґрунтових мікроорганізмів з рослинами

Згідно з експериментальними даними, внесення екзогенних регуляторів росту до живильного середовища (НОК, БАП, 2,4-Д) індукує утворення «бородатих» коренів ще до моменту проліферації листя та пагонів, формування соматичних ембріодів [31]. На противагу, в одному з досліджень зазначали, що внесення 2,4-Д у кількостях 7,5-10 мг/л активізували одержання соматичних ембріодів у культурі «бородатих» коренів *Astragalus sinicus* [32].

Індукція утворення «бородатих» коренів відкриває шлях для вивчення взаємодії між мікроорганізмами, що мешкають у ризосфері, та трансформованими рослинами. Так на культурі *Convolvulus sepium L* [33]. були вирощені мікоризні гриби видів *Gigaspora margarita* та *Glomus mosseae*. Вчені досягли набутої стійкості цукрових буряків до *Heterodera schachtii* при введенні в культури гену *Hs1pro1* [34].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Стерилізація експлантів

Основними стерилізуючими речовинами для одержання незараженого рослинного матеріалу є сполуки на основі активного хлору (гіпохлорити кальцію та натрію, хлорне вапно, хлорамін), розчини, що містять ртуть (як-от сулема, діацид, мертіюлят, фамосепт). В певних випадках фіксується застосування фенолу, бромю та антибіотичних речовин в якості стериліантів [35].

В якості основного стериліанта обрано 5% розчин NaClO, в який поміщали рослинні тканини на 3 хв. Для посилення дії гіпохлориту натрію проводили попередню обробку етиловим спиртом. У 70% C₂H₅OH експланти поміщали на 1 хв. Варто зазначити, що експлантами виступали сегменти пагонів *Salvia officinalis* L.. Після їх обробки стерилізуючими речовинами здійснювали три послідовні промивання у дистильованій воді. Тривалість кожного промивання складала 5 хв.

2.2. Живильне середовище

2.2.1. Підбір середовища

Живильним середовищем, яке найчастіше використовується для культивування рослинних тканин є середовище Мурасіге і Скуга. В нашому випадку обрано безгормональне середовище МС.

Таблиця 2.1

Склад живильного середовища Мурасіге і Скуга [36].

Компонент	Концентрація (мг/л)
Макроелементи	
NH ₄ NO ₃	1650

KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	37
KH_2PO_4	170
Мікроелементи	
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Залізо в хелатованій формі	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Вітаміни	
Тіамін	0,1
Піридоксин	0,5
Нікотинова кислота	0,5
Мезоінозит	100
Біотин	0,01
Са-пантотенат	1
Інші компоненти	
Сахароза	30000
Агар	7000

2.2.2. Приготування середовища

Для того, щоб приготувати 1 л середовища колбу ставили на магнітний змішувач, вливали 250 мл дистильованої води та додавали макро- та

мікроелементи, залізо в хелатованій формі, вітаміни у чітко визначених концентраціях, які вказані у таблиці.

Наважки мезоінозиту та сахарози спочатку розчиняли в невеликих порціях дистильованої води, а потім доповнювали ними середовище. Агар переносили в термостійкий стакан, заливали 300 мл дистильованої води та витримували приблизно 20 хв для набухання. При цьому розчин агару піддавався нагріванню для повного розчинення компоненту.

Оскільки кислотність середовища має коливатися в межах 5,6-5,8, то рН регулювали за допомогою NaOH та HCl.

Розчинений агар вносили до основного середовища, додавали дистильовану воду для того, щоб довести об'єм до 1 л. Проводили нагрівання.

Тепле середовище розливали у ємності, які закривали кришками. Стерилізацію здійснювали вологим жаром. Автоклавування тривало 25 хв, тиск становив 1 атм, а температурне значення складало 121 °C [37].

2.3. Перенесення експлантів на середовище та умови культивування

Для одержання асептичних рослин їх висаджували на середовище Мурасіге і Скуга. Всі дії проводились в ламінарному боксі доволі близько до полум'я спиртівки. Попередньо знезаражені фрагменти пагонів відбирали за допомогою стерильних пінцетів, переміщали у банки, які були заповнені живильним середовищем на 1/8.

Ключові параметри культивування:

- Температура 25 °C
- Біле холодне флуоресцентне світло
- Фотоперіод 16/8 (світло/темрява)
- Час культивування 3 тижні

Метою стадії було отримання рослин, які б мали розвинені пагони та сформовані листки.

2.4. *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована трансформація

Після тритижневого культивування рослин-регенерантів відбирали листки, морфофізіологічні ознаки яких були задовільними (збереження фотосинтетичної активності, що виявляється у нормальному кольорі листкових пластин, великий розмір та відсутність дефектів). На експлантах робили насічки, що займали всю площу пластини.

Проведення генетичної трансформації *Salvia officinalis* L. передбачало застосування нічної культури *Agrobacterium rhizogenes*. Культивування агробактеріальної суспензії проводили за кімнатної температури (приблизно 18-22 °C) протягом 30 хв. Осадження культури здійснювали за допомогою центрифуги. Температура при цьому була достатньо низькою та становила 4 °C, обрана кількість обертів – 6000 об/хв. Час процесу складав 10 хв. Надалі отриманий осад ресуспендували у середовищі Мурасіге і Скуга, в яке не вносили ущільнювач (агар).

Потім експланти переміщали у чашки Петрі, що були заповнені безгормональним живильним середовищем Мурасіге і Скуга. Кокультивування частин листків шавлії, що були одержані в умовах *in vitro* та суспензії на основі *Agrobacterium rhizogenes* тривало рівно добу. Нічна культура була розведена приблизно у 3,5 рази.

Після проведення спільного культивування агробактерії з листковими сегментами останні поміщали на щільне поживне середовище Мурасіге і Скуга, яке було доповнене антибіотичною речовиною – цефотаксим у кількості 600 мг/л. Цей етап здійснювали з метою загибелі *Agrobacterium rhizogenes* під дією антибіотика, до якого у використаного агента немає резистентності.

Трансгенні рослини культивували за таких умов:

- Температура 25 °C
- Інтенсивність світла 6500 люкс
- Фотоперіод 16/8 (світло/темрява)

Корені, які формувались на місцях надрізів, пересаджували на живильне середовище Мурасіге і Скуга з половинною дозою солей в яке не вносили регулятори росту. Кореневим структурам потрібно було забезпечити відсутність світла, тому їх культивування здійснювали в темряві за температурного значення 25 °C [38].

2.5. Молекулярно-біологічний аналіз корневих структур *Salvia officinalis L.*

2.5.1. Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з шавлії лікарської

З метою доведення трансгенної природи утворених корневих структур шавлії застосовували полімеразну ланцюгову реакцію. В ході ПЛР аналізували ДНК рослинного організму. Дезоксирибонуклеїнову кислоту виділяли з трансформованих коренів, використовуючи при цьому ЦТАБ-метод. Варто зазначити, що виділення ДНК проводили з трьох ліній “бородатих коренів” досліджуваної культури. Окрім цього, нуклеїнова кислота була виділення зі звичайних коренів *Salvia officinalis L.* та відігравали роль контролю.

Підготовлені наважки:

- Лінія 1, маса 119 мг
- Лінія 2, маса 136 мг
- Лінія 3, маса 131 мг
- Контроль, маса 62 мг

Рослинні сегменти розтирали у фарфорових ступках за допомогою товкачика. Однорідну субстанцію додавали до епендорфів, що мали об’єм 1,5 мл, вносили буферну суміш для екстракції ДНК. Інкубація суспензії тривала 20 хв за

температурного значення 56 °С. Вливали суміш ізоамілового спирту та хлороформу у співвідношенні 24:1 для проведення депротеїнізації (звільнення від білкових продуктів) [39].

Таблиця 2.2

2% ЦТАБ-буфер для екстракції ДНК з рослинного матеріалу [39].

Компонент	Концентрація (на 100 мл)
2-меркаптоетанол	280 мл
Цетилтриметиламонійбромід	29 г
5M NaCl	28 мл
1M Tris-HCl (pH=8)	10 мл
0,5M NaEDTA	4 мл

Екстраговану суміш центрифугували до утворення двох видимих фаз. Процес тривав 5 хв при 14000 об/хв. Верхня фаза була відокремлена. До неї додавали суміш ізоамілового спирту та хлороформу у співвідношенні 24:1 з метою доочищення розчиненої ДНК. Водна фаза була перенесена до епендорфів об'ємом 1,5 мл. В них вносили буфер для осадження ДНК. Інкубація суміші тривала 40 хв за кімнатної температури (18-22 °С). Після цього проводили осадження при 14000 об/хв протягом 5 хв [39].

Таблиця 2.3

1% ЦТАБ-буфер для осадження ДНК [39].

Компонент	Концентрація (на 100 мл)
Цетилтриметиламонійбромід	1 г
1M Tris-HCl (pH=8)	5 мл
0,5M NaEDTA	2 мл

ДНК, що міститься у водній фазі, осаджували за допомогою внесення двох об'ємів етилену (96%). Процес тривав всю ніч. Підсушений осад розчиняли у 40 мкл бідистильованої води. Розчинення осаду проводили з додаванням 1,2М NaCl у кількості 400 мкл [39].

2.5.2. Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з *Agrobacterium rhizogenes*

В якості позитивного контролю при проведенні полімеразної ланцюгової реакції обрано тотальну ДНК *Agrobacterium rhizogenes*.

1,5 мл нічної агробактеріальної культури вносили до мікроцентрифужної пробірки. Центрифугування тривало 5 хв при 12000 об/хв. Проводили видалення супернатанта, а ресуспендування клітин здійснювали за допомогою додавання 300 мкл ТЕ-буфера. Вливали суміш ізоамілового спирту та хлороформу у співвідношенні 24:1 та загальній кількості 150 мкл. Фазового розділення досягали центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 5 хв. Водна фаза була відібрана, а її об'єм оцінений. Надалі вносили 0,05 об'єму 5М NaCl до одержання кінцевої концентрації речовини на рівні 0,25М. Етанол попередньо охолоджували при негативному температурному значенні (-20 °C). Потім додавали три об'єми етилового спирту та відстоювали всю ніч при -20 °C. Збір нуклеїнових кислот здійснювали шляхом центрифугування при 12000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант видаляли, а осад промивали 1 мл етилового спирту (70%). Після підсушування його проводили його розчинення у 50 мкл бідистильованої води [40].

2.5.3. Проведення ПЛР

Використане обладнання – ампліфікатор Mastercycler personal. Обрано праймери, які характеризуються специфічністю до гена *rolB*, а саме:

- 5' – atggatcccaattgctattcctccacga – 3'
- 5' – ttagccttcttcttcaggtttactgcagc – 3' [41].

Таблиця 2.4

Суміш для ПЛР [41].

Компонент	Концентрація (на 20мкл)
ДНК рослини	1 мкл (100 нг)
Сольовий буфер	1 мкл
dNTP	2 мкл (по 200 мкМ кожного)
Праймери	0,5 мкл кожного
Тақ-полімераза	0,1 мкл
Бідистильована вода	15 мкл

Таблиця 2.5

Склад сольового буфера [41].

Компонент	Концентрація
Tris-HCl (pH=9)	10 мМ
MgCl ₂	1,5 мМ
KCl	50 мМ
Тритон X-100	0,01%

Умови проведення ПЛР:

- Денатурація протягом 3 хв за температури 94 °С
- Три цикли ампліфікації – кожен по 30 с за температур 94 °С, 55 °С та 72 °С відповідно
- Полімеризація протягом 5 хв за температури 72 °С

Аналіз продуктів ПЛР здійснювали з використанням електрофорезу в агарозному гелі (1%) в ТАЕ (трис-ацетатний буфер). Застосовували два види контролів: позитивний – ДНК *Agrobacterium rhizogenes*, негативний – корені шавлії лікарської, які не пройшли трансформацію [41].

2.6. Виявлення приросту біомаси «бородатих» коренів

Для початку корені, довжина яких сягала 1 см зважували на аналітичних терезах. Потім їх переміщали на безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга з половинною дозою солей. Культивування тривало 2 тижні. Після проходження зазначеного проміжку проводили повторне зважування та порівнювали з початковим значенням [42].

Формула для обрахунку приросту біомаси:

$$K = \left(\frac{w_1 - w_0}{t_1 - t_0} \right) \quad (2.1)$$

- K – приріст біомаси
- w_0 – початкова маса (г)
- w_1 – кінцева маса (г)
- t_0 – початок культивування (діб)
- t_1 – кінець культивування (діб)

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Ефективність стерилізації, введення *Salvia officinalis L.* в асептичну культуру та отримання ліній «бородатих» коренів

Раніше зазначалось, що в ролі експлантів обрано сегменти пагонів *Salvia officinalis L.* Їх замочували в 70% етанолі (1 хв) та стерилізували за допомогою 5% розчину білизни (3 хв), здійснювали три промивання (5 хв кожне). Ефективність стерилізації підраховували на сьому добу від дати проведення процесу, результат наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Ефективність стерилізації експлантів *Salvia officinalis L.*

Кількість життєздатних експлантів (шт)	Кількість контамінованих експлантів (шт)	Ефективність стерилізації (%)
9	3	75
<i>Всього експлантів: 12 шт</i>		

Загалом залучений метод стерилізації виявився ефективним, некрози не формувались, що вказує на вибір стерилізанта з не надто високою концентрацією активної речовини. Незважаючи на це, ймовірно кращий показник вдалося б досягти при подовженні часу замочування сегментів пагонів у 5% розчині білизни.

В асептичну культуру було введено верхівки пагонів довжиною приблизно 5-7 мм з 3-7 справжніми листками. На початкових етапах культивування на безгормональному середовищі МС їх колір був світло-зеленим, стебло коротким, а листя – переважно овальним. Після 3 тижнів культивування відбирали листки на яких робили насічки, використовували культуру *Agrobacterium rhizogenes* для

трансформації *Salvia officinalis* L.. Мікроорганізм вилучали з середовища МС за допомогою антибіотика, продовжували культивування шавлії.

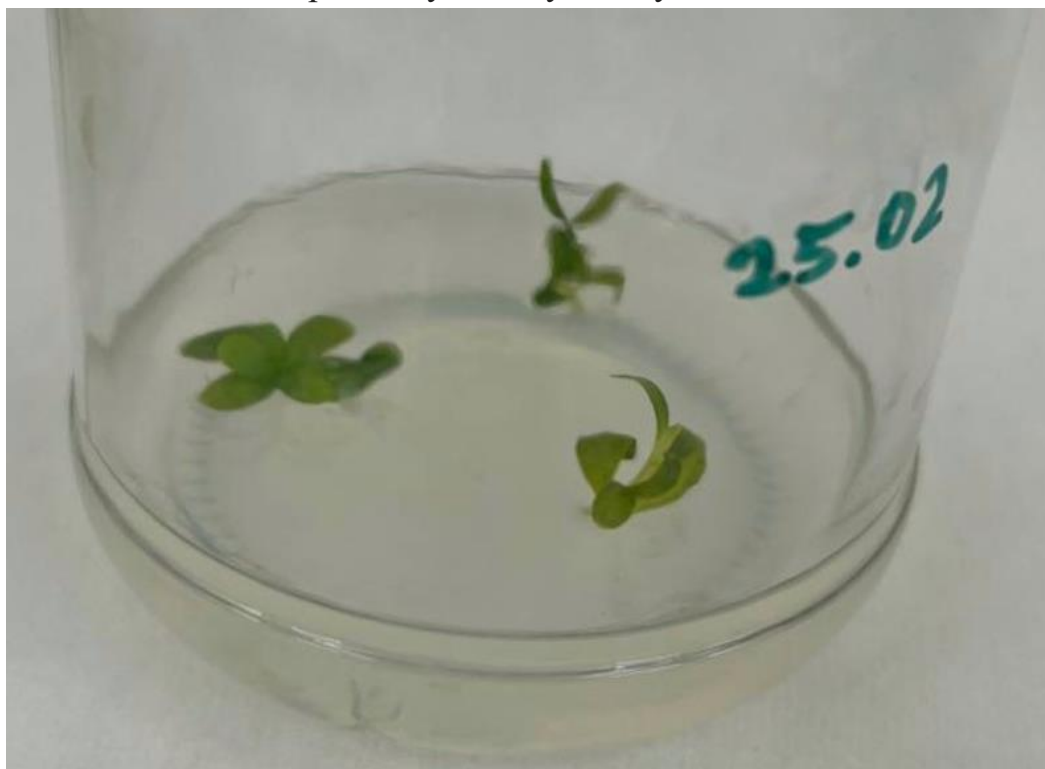


Рис. 3.1. Асептичні рослини *Salvia officinalis* L. на безгормональному живильному середовищі МС



Рис. 3.2. Культура *Agrobacterium rhizogenes*

Утворення перших «бородатих» коренів відбулось через 21 добу культивування рослин на живильному середовищі МС з половинною дозою солей. Загалом культура *Agrobacterium rhizogenes* забезпечила одержання восьми ліній «бородатих» коренів *Salvia officinalis* L. Вони мали світло-коричневе забарвлення, були довгими, тонкими та розгалуженими. Спостерігалась варіація у розвитку коренів, в одних чашках Петрі вони розвивались швидше, ніж у інших. Такий фенотиповий прояв може бути спровокований різною ефективністю трансформації, чи різною частотою експресії гену *rolB*.

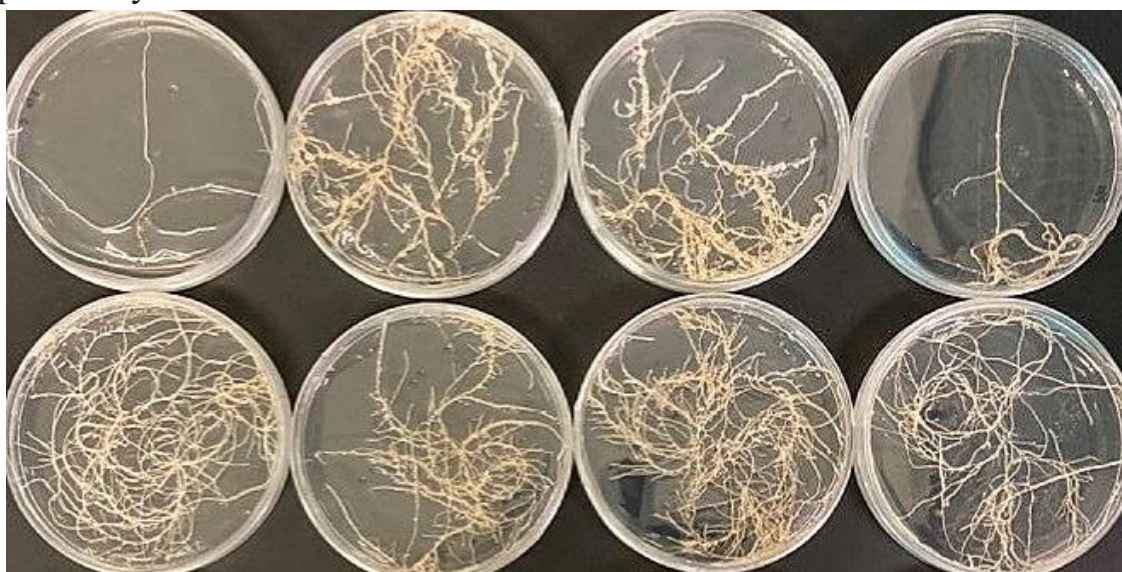


Рис. 3.3. Лінії «бородатих» коренів *Salvia officinalis* L.

Відповідно до характерних візуальних ознак робили попередню оцінку згідно з якою частота трансформації становила 80% («бородаті» корені отримано на 8 з 10 чашок Петрі). Фенотиповий прояв не гарантує наявності *rolB* гену в рослинах, тому надалі для підтвердження трансгенності необхідно було провести ПЛР.

3.2. Проведення ПЛР

Присутність саме *rolB* гену аналізували з огляду на те, що саме він індукує формування «бородатих» коренів. Тобто при активції всіх перенесених

генів окрім *rolB* корені не формуються, тоді як при проведенні трансформації із залучення лише гену *rolB* утворюються специфічні кореневі структури.

В нашому дослідженні за допомогою ПЛР з наступним розділенням ампліфікованих фрагментів у 1% агарозному гелі вивчали наявність *rolB* гену в 3 лініях «бородатих» коренів. Очікуваний результат – візуалізація фрагменту довжиною 780 п.н.

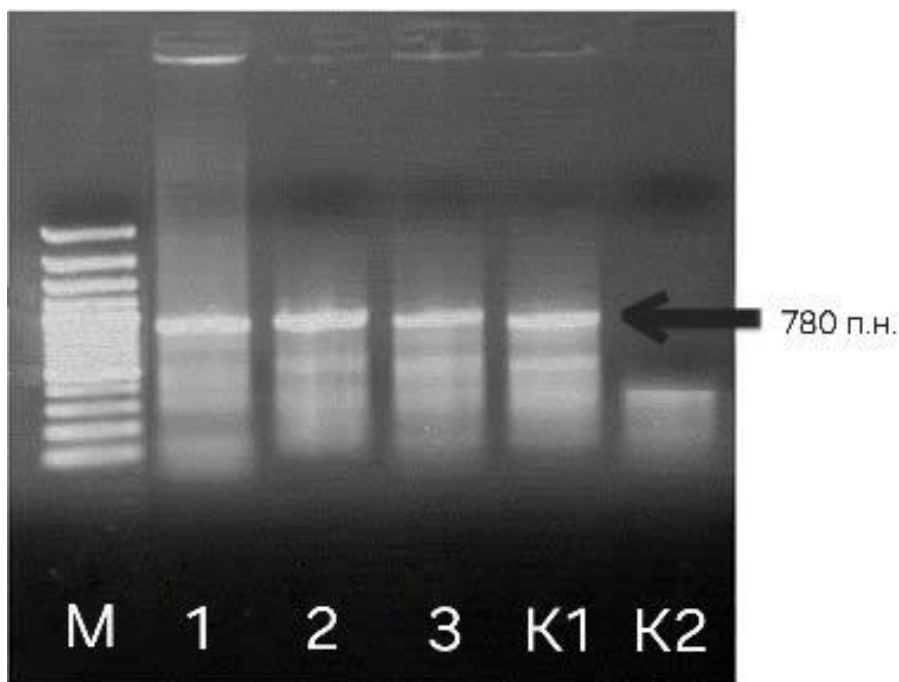


Рис. 3.4. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації при застосуванні праймерів до *rolB* гену

Аналізованим матеріалом виступала ДНК, виділена з «бородатих» коренів утворених *Salvia officinalis L.* (цифри 1, 2, 3 на рис. 3.4.). На зображенні М – це ДНК-маркер O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. К1 та К2 – позитивний контроль (тотальна ДНК виділена з *Agrobacterium rhizogenes*) та негативний контроль (ДНК виділена зі звичайних нетрансформованих коренів шавлії лікарської) відповідно.

Оскільки рис. 3.4. демонструє наявність ділянки довжиною 780 п.н. у ДНК з 3 ліній «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.*, то трансформація пройшла успішно.

3.3. Швидкість накопичення біомаси «бородатими» коренями

При оцінці швидкості приросту біомаси коренів трансформованих рослин порівнювали вихідну вагу та вагу після 2 тижнів культивування на безгормональному живильному середовищі МС. До того ж, обраховували середньодобовий показник.

Таблиця 3.2

Швидкість накопичення біомаси «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.*

Номер лінії	Початкова маса (мг)	Кінцева маса (мг)	Загальний приріст (мг)	Середньодобовий приріст (мг/добу)
1	7,2	68,4	61,2	4,4
2	6,9	71,4	64,5	4,6
3	6,2	58,6	52,4	3,7
4	6,6	85,1	78,5	5,6
5	5,8	79,2	73,4	5,2
6	5,3	52,5	47,2	3,4
7	6,7	97,3	90,6	6,5
8	5,4	73,8	68,4	4,9

Згідно з таблицею 3.2., найбільш суттєвий як загальний, так і середньодобовий приріст біомаси фіксувався у лінії №7. Також хороші результати продемонстрували лінії №4 та №5. В свою чергу, найменший приріст спостерігали у ліній №3 та №6. Інші лінії (№1, №2, №8) показали результат який можна вважати середнім. Загалом за період експерименту (14 діб) з початкової маси 50,1 мг було одержано 586,3 мг «бородатих коренів», тобто загальний приріст становив 536,2 мг, а середньодобовий – 38,3 мг для всіх ліній та 4,8 мг/лінію. Отримано на 91,5% більше кореневої біомаси порівняно з початковим значенням.

Хоча наявність *rolB* гену була підтверджена при залученні молекулярних методів (ПЛР зі специфічними праймерами), варіація у прирості біомаси може бути спричинена кількома факторами. Перший з них – рівень експресії залежно від місця вбудовування у геном. Другий – кількість синтезованих рослиною фітогормонів (основні – ауксини та цитокініни). Третій – зниження, чи підвищення ефективності експресії попередньо трансформованих генів у разі виникнення структурних змін, чи метилювання ДНК. В ході дослідження виявлено, що найбільш перспективною є лінія №7, оскільки середньодобовий приріст біомаси «бородатих» коренів становить 6,5 мг/добу.

ВИСНОВКИ

1. На основі огляду літератури визначено систематичне положення, морфологічні особливості та поширення *Salvia officinalis L.*, встановлено БАР, що містяться в тканинах шавлії та їх медичне значення, описано *Agrobacterium rhizogenes*, механізм утворення «бородатих» коренів, їх використання в фармацевтиці, фіторемедіації, різноманітних дослідженнях.
2. Проведено стерилізацію експлантів *Salvia officinalis L.* за допомогою 70% етанолу (1 хв) та 5% розчину білизни (3 хв). Встановлено, що ефективність стерилізації обраним підходом становила 75%. Визначено, що ріст експлантів активний на безгормональному середовищі МС, а оптимальні умови культивування – температура 25 °С під білим холодним флуоресцентним світлом з фотоперіодом 16/8.
3. Виконано трансформацію *Salvia officinalis L.* із залученням нічної культури *Agrobacterium rhizogenes*. Бактерію видалено з середовища МС шляхом внесення 600 мг/л антибіотика цефотаксиму.
4. Підібрано праймери які характеризуються специфічністю до гена *rolB*, буферні розчини (ЦТАБ-буфери для осадження та екстракції ДНК, сольовий буфер), суміш для ПЛР та умови проведення процесу.
5. Встановлено, що лінія №7 характеризується найвищим загальним та середньодобовим приростом біомаси «бородатих» коренів *Salvia officinalis L.* (90,6 мг та 6,5 мг/добу відповідно). В ході двотижневого культивування з 8 ліній отримано 586,3 мг «бородатих коренів», тобто загальний приріст становив 536,2 мг, а середньодобовий – 4,8 мг/лінію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Шавлія (*Salvia* L.). Фармацевтична енциклопедія. 2024. с. 1. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/44>
2. *Salvia officinalis* L. Global Core Biodata Resource. 2024. с. 1. URL: <https://www.gbif.org/species/2927004>
3. Kerkoub N., Panda S., Yang M., Lu J. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Candida Biofilm Compounds From Methanol Extracts of the Aerial Parts of *Salvia officinalis* (Annaba, Algeria). *Frontiers in Pharmacology*. 2018. с. 1–12.
4. *Salvia officinalis* L. European Environment Agency (EEA). 2024. с. 1. URL: <https://eunis.eea.europa.eu/species/173945>
5. *Salvia officinalis* L. АНПА Botanical Identity References Compendium. 2024. с. 1. URL: <http://www.botanicalauthentication.org/index.php/АНПА>
6. Alaghawani W., Naser I. Antispasmodic Effects of *Salvia officinalis* in Isolated Pleum of Rabbit. *Pharmacology & Pharmacy*. 2019. с. 223–233.
7. Silver H. *Salvia officinalis* L. Spiritual Botany. 2024. с. 1. URL: <https://www.spiritualbotany.com/plant-profiles/sage-salvia-officinalis-1/>
8. Котюк Л.А., Рахметов Д.Б. Біологічно активні речовини *Salvia officinalis* L. та *Salvia sclarea* L. при зростанні в умовах ботанічного саду ЖНАЕУ. Житомирський національний агроекологічний університет. Житомир. 2019. с. 84–89.
9. Ghorbani A., Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017. с. 433–440.
10. Lemle K. *Salvia officinalis* used in pharmaceuticals. International Conference on Applied Sciences. 2018. с. 1–6.
11. Garrity G., Brenner D., Kreig N., Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second Edition. 2005. с. 122–124.
12. *Rhizobium rhizogenes*. South African National Biodiversity Institute. 2024. с. 1. URL: <https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>

13. *Rhizobium rhizogenes* DSM 30148. BacDive. 2024. с. 1. URL: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13571>
14. Veena V., Taylor C. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007. с. 383–403.
15. Christey M.C, Braun R.H. Production of Hairy Root Cultures and Transgenic Plants by *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation. *Methods in Molecular Biology*. 2005. с. 47–60.
16. Srivastava S., Srivastava A. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2007. с. 29.
17. Li Q., Wu Z., Wong M., Li S. The Ri-plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* and its Application in Plant Science. *Biotechnology*. 2005. с. 21–25.
18. Zhang H., Liu J., Lu H., Gao S. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the overexpression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Reports*. 2009. с. 1205–1213.
19. Dow M., Slater H. Bacterial Diseases. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2003. с. 212–223.
20. Матвеева Н.А., Кищенко Е.М., Шаховский А.М., Кучук Н.В. – Синтез инсулина «бородатими корнями» цикория, трансформированного помощью *Agrobacterium rhizogenes*. *Біотехнологія*. 2011. с. 8–11.
21. Matvieieva N., Bessarabov V., Khainakov O., Duplija V., Bohdanovych T., Ratushnyak T. та ін. *Cichorium intybus* L. “hairy” roots as a rich source of antioxidants and anti-inflammatory compounds. *Heliyon*. 2023. с. 1.
22. Banerjee S., Singh S., Rahman L. Biotransformation studies using hairy root cultures—a review. *Biotechnol Advances*. 2012. с. 461–468.
23. Christey M. *Transgenic Crop Plants Using Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation*. Hardwood Acad Pub. 1997. с. 99–111.

24. Hughes E., Hong S., Shanks J., San K., Gibson S. Characterization of an inducible promoter system in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Prog.* 2002. c. 1183–1186.
25. Preiszner J., Van Toai T., Huynh L., Bolla R., Yen H. Structure and activity of a soybean Adh promoter in transgenic hairy roots. *Plant Cell Reports* 2001. c. 763–769.
26. Makhzoum A., Sharma P., Bernardis M., Trémouillaux-Guiller J. Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications. *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*. 2013. c. 95–142.
27. Agostini E., Coniglio M., Milrad S., Tigier H., Giulietti A. Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol Appl Biochem* 2003. c. 139–144.
28. Suresh B., Sherkhane P., Kale S., Eapen S., Ravishankar G. Uptake and degradation of DDT by hairy root cultures of *Cichorium intybus* and *Brassica juncea*. *Chemosphere*. 2005. c. 1288–1292.
29. Favas P., Pratas J., Varun M., D'Souza R., Paul M. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. Chapter: Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. 2014. c. 112–124.
30. Boominathan R., Saha-Chaudhury N., Sahajwalla V., Doran P. Production of nickel bio-ore from hyperaccumulator plant biomass: applications in phytomining. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004. c. 243–250.
31. Hu Z., Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2006. c. 121–127.
32. Cho H., Wildholm J. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002. c. 259–269.

33. Mugnier J., Musse B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed hairy root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*. 1987. с. 1045–1050.
34. Cai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H., Sandal N., Marcker K. та ін. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar-beet. *Science*. 1997. с. 832–834.
35. Лобова О.В., Пилипчук О.О. Сільськогосподарська біотехнологія – методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ. 2014. с. 4–5.
36. Esfandiari T., Ghavidel R., Foroghian S. The Effect of Phytohormones on Lavender (*Lavandula Angustifolia* Mill.) Organogenesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015. с. 338–344.
37. Приготування середовища Мурасиге і Скуга (МС). Біотехнологія рослин. Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ. 2015. с. 36. URL: <https://studfile.net/preview/3540559/page:36/>
38. Jun L., Huang Y., Guo Y., Fan C., Yuan G., Zhou R. та ін. Agrobacterium rhizogenes-Mediated Hairy Root Transformation in Rosa. *Horticulturae*. 2025. с. 216–229.
39. Степаненко А.І., Лахнеко О.Р., Маринченко Л.В., Банникова М.О. Основи молекулярної біології: Молекулярна біологія ДНК – Лабораторний практикум. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН. Київ. 2021. с. 87–92.
40. Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В. Основи молекулярної біології (курс лекцій). Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького. Черкаси. 2013. с. 206–210.
41. Дробот К.О. Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН. Київ. 2018. с. 1–25.

42. Власюк О.В., Шпетна К.О. Визначення впливу вмісту вуглеводів, фітогормонів на ріст «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів лікарських рослин *Bidens pilosa* і *Artemisia tilesii*. Національний авіаційний університет. Київ. 2021. с. 1–12.

ДОДАТКИ

Додаток А



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ
І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ**



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

23-24 квітня 2025 р.

Київ – 2025

<i>Янковський К.О., Кваско О.Ю.</i> АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ <i>SALVIA OFFICINALIS L.</i>.....	183
<i>Янович А.І., Таран О.П.</i> ОПТИМІЗАЦІЯ ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ЗРАЗКІВ ПОПЕЛИЦЬ <i>APHIDIDAE</i> ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВИДІВ-ВЕКТОРІВ РОСЛИННИХ ВІРУСІВ.....	184

УДК 602.6:632:631.46:633

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *SALVIA OFFICINALIS L.*

Янковський К.О., студент 4 курсу, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

Кваско О.Ю., кандидат біологічних наук, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

У контексті інтенсифікації виробництва фармакологічно цінної рослинної сировини, генетична трансформація за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* набула виняткового значення як інструмент створення високопродуктивних ліній лікарських рослин. *Salvia officinalis L.*, відома як шавлія лікарська, є джерелом вторинних метаболітів з вираженим антиоксидантним, протизапальним і протипухлинним потенціалом. Розробка ефективних біотехнологічних підходів для стабільного культивування трансформованих кореневих культур шавлії має надзвичайне значення для фармацевтичної біоінженерії. Метод *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації дозволяє ініціювати утворення «бородатих коренів», які характеризуються високою ростовою активністю, стабільною біосинтетичною продукцією та генетичною консервативністю, що робить їх перспективною платформою для отримання цільових біоактивних сполук.

Метою даної роботи була індукція *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації *Salvia officinalis L.* для отримання стабільної культури «бородатих коренів», здатної до інтенсивного росту *in vitro* та продукції біологічно активних речовин.

Корені, утворені рослиною, проявили стандартні фенотипові ознаки *Ri*-трансформантів: значну морфогенетичну активність, інтенсивне галуження, негативний геотропізм та автономний ріст на безгормональному поживному середовищі *in vitro*. Відсутність потреби в екзогенних фітогормонах вказувала на активацію *rol*-генів, які

індукують ендogenousний синтез регуляторів росту. Проведене оцінювання ростових характеристик трансформованих корневих ліній в умовах *in vitro* виявило високий рівень накопичення біомаси, що є важливою передумовою для подальшої оптимізації культивування [1].

Проведена *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація *Salvia officinalis L.* є перспективною біотехнологічною стратегією для створення стабільних продуцентів цінних біологічно активних сполук – ефірних олій, фенольних кислот, флавоноїдів, терпенів. Це відкриває можливості для використання отриманих культур як альтернативного джерела стандартизованої сировини для фармацевтичної, косметичної та харчової промисловості. Крім того, створена трансформована система може бути застосована для вивчення регуляції експресії метаболічних генів та глибшого розуміння біосинтетичних шляхів у лікарських рослин.

Таким чином, результати дослідження є вагомим внеском у розвиток прикладної рослинної біотехнології та підтверджують доцільність застосування генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes* для створення нових високопродуктивних біоінженерних систем на основі *Salvia officinalis L.*

Список використаних джерел

1. Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*/ R. Sathasivam et al. *Frontiers*. 13th ed. 2022. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.983776/full>