

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 581.143.6:581.9

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**
« _____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему _____ **«Вплив мінерального живлення на ріст культури "бородатих" коренів рослин м'яти водяної *Mentha aquatica* L. »**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Виконала

_____ **Сніжана ПАВЛИК**
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття**

Олена КВАСКО

“ _____ ” _____ **2025 р.**

ЗАВДАННЯ

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Павлик Сніжані Сергіївні

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Вплив мінерального живлення на ріст культури "бородатих" коренів рослин м'яти водяної *Mentha aquatica* 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 бакалаврської кваліфікаційної роботи: пагони м'яти водяної, штам A4 *Agrobacterium rhizogenes*, протоколи введення в культуру *in vitro*, *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, полімеразно-ланцюгової реакції.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини м'яти водяної.
3. Отримати культуру “бородатих” коренів *M. aquatica* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.
3. Дослідити вплив мінерального живлення на ріст культури “бородатих” коренів *M. aquatica*

Дата видачі завдання 23 жовтня 2024 року

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(підпис)

Олена КВАСКО

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

Сніжана ПАВЛИК

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на тему «Вплив мінерального живлення на ріст культури "бородатих" коренів рослин м'яти водяної *Mentha aquatica* L. » в обсязі 50 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 5 рисунків, 4 таблиці, 73 використаних джерела. Складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури;
2. Матеріали та методи дослідження;
3. Результати дослідження та їх обговорення.

Метою даної роботи було дослідити вплив компонентів мінерального живлення на ріст культури "бородатих" коренів рослин м'яти водяної *Mentha aquatica* L.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини м'яти водяної.
2. Отримати культуру "бородатих" коренів *M. aquatica* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.
3. Дослідити вплив мінерального живлення на ріст культури "бородатих" коренів *M. aquatica*

Об'єктом дослідження ріст "бородатих" коренів м'яти водяної на середовищах різного мінерального складу.

Предметом дослідження культура "бородатих" коренів м'яти водяної

В роботі застосовано такі **методи дослідження** як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Біологічні особливості <i>Mentha aquatica</i> L.	10
1.2. Культура “бородатих” коренів: значення та перспективи застосування	12
1.3. Роль мінерального живлення у формуванні вторинних метаболітів	23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	27
2.1. Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин <i>M. aquatica</i> L.	27
2.2. Отримання культури “бородатих” коренів	29
2.3. Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз “бородатих” коренів	29
2.4. Визначення впливу вмісту фосфору та азоту на ріст культури “бородатих” коренів м’яти водяної.	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	33
3.1. Ефективність введення в культуру та отримання “бородатих” коренів рослин м’яти водяної	33
3.2. Вплив мінерального живлення (фосфору та азоту) на ріст культури “бородатих” коренів м’яти водяної.	37
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ВСТУП

Лікарські рослини родини М'ятних (Lamiaceae) відомі як цінні джерела різноманітних вторинних метаболітів. Рід М'ята (*Mentha*) є одним з найбільш важливих представників цієї родини з точки зору виробництва вторинних метаболітів. До даного роду належить економічно значущий вид - *M. aquatica* (м'ята водяна, м'ята звичайна) яка також відома як *M. hirsute* Huds., *M. acuta* Opiz та *M. acutata* [1]. Ця ароматична рослина з широким поширенням і значним комерційним значенням культивується на всіх п'яти континентах світу [2-5]. *M. aquatica* синтезує широкий спектр біоактивних сполук, таких як терпени, фенольні кислоти та терпеноїди, що визначає її протизапальну, антиоксидантну, антибактеріальну, протигрибкову та гепатопротекторну активність. Дослідження демонструють її потенційну протипухлинну дію проти новоутворень молочної залози, легенів та шкіри, а також нейропротекторний ефект при депресії, хворобі Альцгеймера та Паркінсона. Основними компонентами ефірної олії *M. aquatica* є ментол і піперітон, що забезпечують характерний ароматичний профіль рослини. У традиційній медицині м'ята водяна використовувалася для лікування респіраторних захворювань, зокрема застуди. Сучасні фармакологічні дослідження підтверджують ефективність застосування екстрактів цієї рослини в косметичних та фармацевтичних продуктах завдяки їх вираженим антиоксидантним і протизапальним властивостям. Крім того, *M. aquatica* активно використовується у складі очищувальних, зволожувальних і захисних засобів для шкіри [6].

Вторинні метаболіти рослин викликають великий інтерес завдяки численними лікувальними перевагами та властивостями [2]. Рослини, що належать до родини м'ятних, привертають увагу через те, що вони є джерелом поліфенольних сполук, таких як розмаринова кислота та

ефірні олії з різноманітними лікувальними та терапевтичними властивостями [7, 8].

Методи культури рослинних клітин та тканин *in vitro* є основою для створення альтернативних технологій виробництва вторинних метаболітів фармакологічно цінних рослин. До таких методів належить використання культури трансгенних “бородатих” коренів. Така культура є перспективною сировиною для отримання біологічно активних речовин та може слугувати альтернативою для їх масштабного виробництва. Утворення таких коренів у рослин відбувається за участі ґрунтової бактерії *A. rhizogenes*, яка здатна інфікувати дводольні рослини та переносити частину свого геному до геному рослин. “Бородаті” корені мають певні характерні ознаки, зокрема, здатність рости швидко та на безгормональному середовищі, відсутністю геотропізму, формуванням значної кількості бічних коренів та генетичною стабільністю. Разом з тим, культура “бородатих” коренів здатна синтезувати метаболіти, які зазвичай синтезуються тканинами рослини на більш високих рівнях у порівнянні з вихідною рослиною [9-11]. На ріст та синтез вторинних метаболітів рослин впливає низка факторів, зокрема, генотип вихідної рослини та ліній “бородатих” коренів, склад живильного середовища, а також фактори навколишнього середовища. Серед компонентів живильного середовища найбільший вплив на ріст культури здійснюють вуглець, азот та фосфор, які відіграють ключову роль у рості та метаболізмі рослин. [12].

Враховуючи вище зазначене, **метою даної роботи** було дослідити вплив компонентів мінерального живлення на ріст культури “бородатих” коренів рослин м’яти водяної *Mentha aquatica* L.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини м’яти водяної.

2. Отримати культуру “бородатих” коренів *M. aquatica* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.

3. Дослідити вплив мінерального живлення на ріст культури “бородатих” коренів *M. aquatica*

Об’єктом дослідження ріст “бородатих” коренів м’яти водяної на середовищах різного мінерального складу.

Предметом дослідження культура “бородатих” коренів м’яти водяної.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

Практична значущість даної роботи полягає у використанні результатів для оптимізації культивування “бородатих” коренів м’яти водяної з метою більшого виходу біомаси та відповідно більшої кількості цільового продукту.

Робота виконувалась на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості *Mentha aquatica* L.

Mentha aquatica L., або водяна м'ята, є багаторічною трав'янистою рослиною родини Глухокропивових (*Lamiaceae*). Вона поширена в більшій частині Європи, Північно-Західної Африки та Південно-Західної Азії, зростаючи в достатньо зволжених місцях, таких як береги річок, струмків, каналів, боліт та стоячих водойм. В Україні м'ята водяна зустрічається майже по всій території, зокрема берегами водойм та на мулистих ґрунтах, дуже



рідко у південних областях та Криму.

Рис. 1.1.1. Рослини м'яти водяної *Mentha aquatica* в природних умовах зростання.

М'ята водяна досягає висоти до 90 см і має повзуче кореневище. Стебло пряме, чотиригранне, часто темно-червонувате, може бути як волохатим, так і майже голим. Листя супротивне, від широко яйцеподібної до еліптичної форми, розміром 2–4 × 1,5–3 см, з зубчастими краями та тупими верхівками. Квіти дрібні, фіолетово-червоні, зібрані в щільні напівсферичні суцвіття на верхівках стебел. Цвіте у липні-серпні. *Mentha aquatica* віддає перевагу вологим місцям проживання з добре зволженими

грунтами, часто зустрічається на берегах водойм, у канавах та болотах. Вона може рости як на слабокислих, так і на вапнякових ґрунтах, демонструючи широку екологічну пластичність. Рослина здатна до вегетативного розмноження за допомогою повзучих кореневищ, що сприяє її поширенню в сприятливих умовах. *Mentha aquatica* легко гібридується з іншими видами м'яги. Зокрема, її схрещування з *Mentha spicata* (м'ята колосиста) призводить до утворення *Mentha × piperita* (м'ята перцева), яка широко використовується в кулінарії та медицині. Також відомі гібриди з *Mentha suaveolens* та *Mentha arvensis*.

М'ята здавна застосовується в народній медицині, переважно для лікування респіраторних захворювань. Однак, попри численні дослідження, що свідчать про її ширший терапевтичний потенціал, комплексний огляд її властивостей досі відсутній.

M. aquatica синтезує широкий спектр біоактивних сполук, таких як терпени, фенольні кислоти, феноли та терпеноїди, які забезпечують їй різноманітні корисні властивості. Серед них – протизапальна, антиоксидантна, антибактеріальна, протигрибкова та гепатопротекторна активність. Крім того, дослідження вказують на її потенційну протиракову дію щодо деяких видів пухлин (молочної залози, легенів та шкіри), а також позитивний вплив на нервову систему, що може бути корисним у лікуванні депресивних розладів, хвороби Альцгеймера та Паркінсона.

M. aquatica містить ефірні олії, багаті на ментол, піперітон та інші терпенові сполуки, що надають їй характерного аромату та смаку. У традиційній медицині її використовували для лікування респіраторних захворювань, таких як застуда. Сучасні дослідження виявили, що м'ята водяна має антиоксидантні, протизапальні, антибактеріальні та протигрибкові властивості, що робить її перспективною для використання в косметичних та фармацевтичних продуктах [13].

Окрім медичного застосування, водяна м'ята має значний косметичний потенціал. Вона входить до складу очищувальних, зволожувальних та захисних засобів завдяки своїм освіжаючим, заспокійливим і очищувальним властивостям, що пов'язані з її протизапальною та антиоксидантною активністю [13].

Таким чином, *Mentha aquatica* є важливим представником роду м'ята з характерними морфологічними та екологічними особливостями, а також значним потенціалом для використання в різних галузях завдяки своєму хімічному складу. *M. aquatica* є надзвичайно багатофункціональною рослиною, а її екстракти та ефірні олії мають перспективне застосування в медицині та косметології. Враховуючи зростаючу популярність косметичних засобів на її основі, подальші дослідження повинні зосередитися на її лікувальних властивостях, що може сприяти включенню цієї рослини до офіційних терапевтичних схем у майбутньому.

1.2. Культура «бородатих» коренів: значення та перспективи застосування

Культура «бородатих» коренів, отримані шляхом трансформації рослин за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*, є ефективним інструментом у біотехнології для вивчення та виробництва біологічно активних сполук. Індукція таких коренів передбачає інфікування рослинних тканин штамми *A. rhizogenes*, що містять Ri-плазмиду, яка інтегрується в геном рослини та спричиняє утворення кореневих структур з високою проліферативною активністю. Ці культури здатні синтезувати широкий спектр вторинних метаболітів, включаючи алкалоїди, фенольні сполуки та терпеноїди, що робить їх перспективними для фармацевтичної та косметичної промисловості.

Вирощування «бородатих» коренів можливе як у рідких, так і в твердих живильних середовищах без додавання фітогормонів, що спрощує

процес культивування та знижує витрати . Крім того, ці культури демонструють високу генетичну стабільність протягом тривалого культивування, що дозволяє їх використання для генетичних модифікацій з метою підвищення продуктивності або зміни спектру синтезованих метаболітів .

Завдяки високій абсорбційній здатності, «бородаті» корені можуть бути використані для очищення ґрунтів і водних середовищ від важких металів та органічних забруднювачів . Розробка біореакторів для масового культивування таких культур відкриває можливості для промислового виробництва цінних метаболітів, що може знизити залежність від природних ресурсів та забезпечити стабільне постачання біологічно активних сполук [14, 15, 16, 17].

У період з 1930-х до 1960-х років культура «бородатих» коренів розглядалася переважно як фізіологічна відповідь садових рослин на зараження патогенними мікроорганізмами [18]. Лише у 1970–1980-х роках було встановлено, що *Agrobacterium rhizogenes* є бактеріальним збудником цього феномену, що здійснює перенос генів Ri-плазмиди у геном рослин [19]. Це відкриття стало основою для розробки технології отримання культур бородатих коренів, які широко використовуються у біотехнологічних дослідженнях.

На сьогодні встановлено, що формування культур бородатих коренів відбувається у місцях пошкодження тканин рослин, спричиненого інфікуванням актерією *A. rhizogenes*, яка наразі класифікується як *Rhizobium rhizogenes* [15, 16]. Механізм інфекції полягає у перенесенні специфічних фрагментів Т-ДНК з Ri-плазмиди у клітини рослини, що ініціює утворення коренів специфічного фенотипу. Незважаючи на активацію захисних механізмів рослин, включаючи синтез захисних білків, *R. rhizogenes* має здатність долати ці бар'єри та навіть використовувати захисні білки рослини у власних інтересах [20].

Застосування культури “бородатих” коренів має низку переваг, зокрема генетичну та фенотипову стабільність, а також можливість секреції біологічно активних речовин у культуральне середовище (ризосекреція), що значно спрощує очищення цільових білкових продуктів [21]. Завдяки здатності синтезувати складні сполуки та легкій масштабованості, культура “бородатих” коренів є перспективним біотехнологічним інструментом для експресії рекомбінантних білків та синтезу власних біологічно активних сполук у контрольованих умовах біореакторів [22, 23].

Трансформація, здійснена за допомогою *Rhizobium rhizogenes*, продемонструвала ефективність у продукуванні різноманітних хімічних сполук, відомих як спеціалізовані або вторинні метаболіти — складні молекули рослинного походження, що характеризуються цінними фармакологічними, косметичними та нутрицевтичними властивостями. Згідно з оглядом наукової літератури, упродовж останніх тридцяти років метод трансформації *R. rhizogenes* активно застосовується для дослідження фізіологічних процесів та біосинтетичних шляхів у рослин, створення цільових молекул рослинного походження, удосконалення молекулярної селекції, оптимізації фітореMediaційних стратегій, а також для біосинтезу рекомбінантних терапевтичних білків [24, 25].

Отримання рекомбінантних білків

Першим експериментальним підтвердженням концепції використання культур “бородатих” коренів стала успішна експресія мишачих моноклональних антитіл у коренях трансформованого тютюну (*Nicotiana tabacum*) [26]. Було встановлено, що синтезовані антитіла секретуються у культуральне середовище та накопичуються в ньому. У подальших дослідженнях “бородаті” корені тютюну слугували ефективною платформою для експресії та секреції різноманітних рекомбінантних білків, зокрема зеленого флуоресцентного білка (GFP) [27], людської

ацетилхолінестерази [28], мишачого інтерлейкіну [29], солодкого білка тауматину [30], інтерферону альфа-2b людини [31], рекомбінантного еритропоетину людини (rhEPO) [32] та рекомбінантної альфа-L-ідуронідази [33]. Крім того, було продемонстровано можливість синтезу складних глікозильованих білків із високою однорідністю посттрансляційних модифікацій. Зокрема, у роботі Cardon та співавт. (2019) [33] детально охарактеризовано профілі N- та O-глікозилювання лізосомального ферменту людини, експресованого в культурі "бородатих" коренів, показавши, що всі сайти N-глікозилювання були модифіковані пауциманнозними структурами з надзвичайно високим ступенем гомогенності. Подібні глікозильовані профілі мають важливе значення для виробництва біофармацевтичних препаратів, зокрема для лікування лізосомних захворювань, таких як хвороба Гоше та хвороба Фабрі. Отже, системи експресії на основі культур "бородатих" коренів були успішно застосовані для створення широкого спектру гетерологічних білків, включаючи антигени, антитіла, ферменти та імуномодулятори.

Розробка генної конструкції, що використовується для експресії рекомбінантного білка, є ключовим етапом у створенні ефективної системи експресії. Типова конструкція включає промотор, сигнальний пептид для направлення гетерологічного білка на необхідний шлях (зокрема, секреторний), послідовність, що кодує цільовий білок, а також сайт поліаденілування. Генетичні конструкції зазвичай оптимізуються для включення сильних промоторів з метою забезпечення високого рівня експресії. З цією метою часто застосовують промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S) або його модифіковану версію (deCaMV35S), що є найбільш поширеними для стимуляції трансгенних процесів у культурах "бородатих" коренів [24]. Окрім конститутивних промоторів, також використовуються індукційні системи регуляції експресії генів, зокрема промотори, активовані глюкокортикоїдами або термічно індуковані

промотори, які забезпечують контрольовану експресію в заданий момент розвитку культури [34]. Додатково для підвищення експресії можуть застосовуватися енхансери, такі як омега-енхансер вірусу мозаїки тютюну (TMV). Для запобігання деградації білків та підвищення їх внутрішньоклітинної концентрації у конструкцію можуть бути включені сигнали утримання в ендоплазматичному ретикулумі, наприклад послідовності KDEL або HDEL. Така стратегія довела свою ефективність, зокрема використання сигналу KDEL на С-кінці антитіла 14D9 призвело до значного підвищення рівня його накопичення в культурах "бородатих" коренів тютюну [35]. У випадках, коли необхідно спрямувати білок на секрецію, у генетичну конструкцію інтегрують спеціальні сигнальні пептиди, такі як сигнальний пептид ER cal (N-кінцева послідовність калретикуліну). Наприклад, включення цього пептиду виявилось критичним для ефективної секреції людського еритропоєтину в культуральне середовище "бородатих" коренів *Nicotiana tabacum* [32].

Трансформація рослин за допомогою *Rhizobium rhizogenes* є потужною біотехнологічною стратегією для інтеграції гетерологічних генів без істотного порушення природної генетичної структури рослин-реципієнтів, що забезпечує можливість синтезу ними цільових рекомбінантних білків. Найбільш поширеною є стратегія попередньої модифікації штамів *R. rhizogenes* шляхом введення гена інтересу з використанням класичних методів молекулярної біології. Інфікування рослин здійснюється за допомогою стандартних бінарних векторів для рослинної експресії, які містять специфічну T-ДНК із включеним гетерологічним геном. Такий підхід забезпечує стабільну трансформацію, однак через випадковий характер інтеграції трансгену у геном рослини необхідним є ретельний відбір трансформованих клонів з оптимальними показниками росту та рівнем продуктивності, як це зазначено у дослідженні Huet та співавт. (2014) [36]. Альтернативною методикою є

пряме інфікування вже трансгенних рослин, що експресують цільовий білок, немодифікованими штамми *R. rhizogenes* дикого типу, що дозволяє уникнути попередньої маніпуляції з бактеріальними геномами [37]. У цьому контексті використання колекцій мутантних рослинних ліній значно розширює спектр можливостей для експериментальної оптимізації трансформаційних процесів та створення нових біотехнологічних платформ.

Рекомбінантні білки, що експресуються в системах "бородатих" коренів, можуть як акумулюватися всередині клітинної маси, так і секретуватися у культуральне середовище. Експресія та ефективна секреція білків великої молекулярної маси в культуральне середовище була продемонстрована на прикладі складних білкових молекул, зокрема альфа-L-ідуронідази людини (молекулярна маса 72 кДа), яка успішно секретується в середовище при культивуванні "бородатих" коренів [33]. Це свідчить про можливість виробництва широкого спектра рекомбінантних білків із використанням даної системи. Однак для білків із молекулярною масою понад 110 кДа секреція у середовище ускладнюється і потребує застосування додаткових технологічних підходів, зокрема методів проникнення через клітинну стінку, таких як обробка диметилсульфоксидом (ДМСО) [38]. Крім того, фізико-хімічні властивості білкових молекул, зокрема гідрофобність та електричний заряд, суттєво впливають на ефективність їх секреції або акумуляції у біомасі. Для підвищення стабільності рекомбінантних білків у культуральному середовищі перспективним є застосування стабілізаторів білкової природи та інгібіторів протеаз. До таких агентів належать бичачий сироватковий альбумін (БСА), желатин, поліетиленгліколь (ПЕГ), полівінілпіролідон (ПВП) та інші полімери, які захищають білки від денатурації під впливом компонентів рослинного середовища. Додатково використання маніту

сприяє регуляції осмотичного тиску, що допомагає зменшити рівень лізису клітин і, відповідно, стабілізувати середовище культивування [39].

Таким чином, для ефективного виробництва рекомбінантних білків у системах "бородатих" коренів необхідно забезпечити всебічну біотехнологічну оптимізацію процесу на всіх етапах — від вибору вихідного рослинного матеріалу до розробки молекулярної конструкції. Стратегія експресії має враховувати не лише структурні особливості гетерологічного гена, але й функціональні властивості цільового білка, включаючи його стабільність, локалізацію та способи подальшої очистки. Інтеграція цих параметрів у процесний дизайн дозволяє підвищити ефективність експресії, забезпечити високу якість кінцевого продукту та сприяти масштабуванню виробництва функціонально активних білків.

Отримання спеціалізованих метаболітів

Культивування «бородатих» коренів є одним із найбільш перспективних підходів для отримання спеціалізованих метаболітів, оскільки такі культури характеризуються високою генетичною стабільністю, значним потенціалом нарощування біомаси та збереженням ефективної біосинтетичної активності. Важливою перевагою є також їх здатність до тривалої продукції цільових метаболітів без втрати біосинтетичної активності [40]. Як правило, для синтезу спеціалізованих метаболітів використовуються нетрансгенні лінії «бородатих» коренів, отримані із рослин, які природно продукують сполуки, що представляють інтерес для дослідників. Серед прикладів таких метаболітів можна назвати азадірахтин (біопестицид) [41], беталаїни (природні пігменти для харчової промисловості) [42], камптотецин (антипухлинний агент для терапії раку яєчників та товстої кишки) [43] та вітанолід А (нейрорегенеративна сполука) [44]. Крім того, для підвищення продуктивності певних метаболітів можуть застосовуватись трансгенні підходи, що включають введення додаткових генів у культури дикого типу [45]. Серед сучасних

стратегій виділяють нокаут генів, які кодують негативних регуляторів, а також генетичну модифікацію біосинтетичних шляхів для оптимізації синтезу цільових сполук [46].

У рамках біосинтетичних досліджень надмірна експресія або коекспресія ферментів, що беруть участь у біосинтетичних шляхах метаболітів, може значно сприяти утворенню цінних і високоякісних спеціалізованих метаболітів. Такий підхід активно використовують для отримання метаболітів, які зазвичай не синтезуються певними рослинами. Одним із яскравих прикладів є виробництво тропанових алкалоїдів, таких як скополамін і гіосціамін [40, 48, 49], а також катарантін [49], гінсенозиди [50], соланозиди [51] і навіть вітамін С [52] з використанням трансгенних систем коренів.

Ці досягнення стали можливими завдяки застосуванню культури трансгенних коренів, у тому числі за допомогою підживлення субстратами для стимуляції синтезу специфічних метаболітів. Так, Сірікантарамас і Таура успішно продемонстрували можливість продукування канабіноїдів у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum*, які природно не здатні до синтезу таких сполук [53].

Останні огляди вказують на важливість використання трансгенних коренів у виробництві спеціалізованих метаболітів і на можливість застосування таких стратегій у фітореMediaції, що відкриває нові перспективи для очищення довкілля та отримання високоцінних біологічно активних сполук [54].

Така стратегія є перспективною для дослідження біосинтетичних шляхів і розвитку нових методів синтезу важливих метаболітів за допомогою генної інженерії. Незалежно від обраної стратегії (тобто використання трансгенних або нетрансгенних кореневих культур), підвищення продукції спеціалізованих метаболітів було успішно досягнуто шляхом оптимізації умов культивування. Зокрема, значну роль відіграли

такі фактори, як джерело вуглецю, рівень аерації, рН середовища, режим освітлення (світло/темрява) та склад живильного середовища. Важливими також є правильний відбір ефективних клонів та використання спеціально підібраних еліситорів [21, 55, 56].

Ефективна експресія спеціалізованих метаболітів у трансформованих коренях, як і в інших рослинних виробничих системах, вимагає ідентифікації оптимальних еліситорів і розробки схем їх застосування. Існує значна кількість літературних даних, що описують еліситори, придатні для стимуляції утворення цільових метаболітів у системах культури рослинних тканин *in vitro* [57, 58]. Окремі еліситори, такі як метил-жасмонат, жасмонова кислота, хітозан та саліцилова кислота, застосовуються частіше і демонструють високу ефективність. Варто зазначити, що індукційна активність еліситорів є специфічною для виду рослини і типу метаболіту. Крім того, деякі еліситори можуть стимулювати не лише біосинтез, а й секрецію метаболітів у середовище [59]. Розпізнавання еліситорів здійснюється через специфічні рецептори, локалізовані на поверхні рослинних клітин або всередині них, що призводить до активації сигнальних каскадів та ініціювання комплексу захисних реакцій рослини. Результати численних досліджень свідчать про наявність синергічного ефекту при комбінованому застосуванні кількох еліситорів. Зокрема, перехресне використання біотичних та абіотичних еліситорів дозволяє значно посилити продукцію спеціалізованих метаболітів. Наприклад, така стратегія сприяла підвищенню синтезу таншинонів у трансформованих коренях *Salvia miltiorrhiza* [60].

Підвищення продуктивності може мати різний ступінь інтенсивності: від помірного збільшення (у 4,5 рази для ізофлавоноїдів у “бородатих” коренях *Pueraria candollei* після еліцитації дріжджовим екстрактом до значного зростання, як це спостерігалось при підвищенні екскреції стильбенів у 570 разів після обробки метил-жасмонатом (MeJA) у

поєднанні з метил- β -циклодекстрином у трансформованих коренях *Vitis vinifera* [61, 62].

Крім типу використовуваного елісатора, важливими чинниками для успішної індукції метаболітів є його оптимальне дозування (щоб уникнути токсичних ефектів при надмірних концентраціях або неефективності при надто низьких), тривалість експозиції, а також фізіологічний стан і вік рослинного матеріалу на момент застосування елісатора.

Останніми роками для оптимізації продукції спеціалізованих метаболітів у культурах "бородатих" коренів активно впроваджуються методи *in silico* моделювання, зокрема моделі на основі нечіткої логіки та штучних нейронних мереж. Ці підходи комп'ютерного моделювання дозволяють ефективно оптимізувати умови хімічного культивування у трансгенних кореневих культурах [63].

Теоретично, технологія індукції "бородатих" коренів може бути застосована до більшості видів рослин, що відкриває перспективи її використання для збереження рідкісних, цінних, зникаючих або ендемічних лікарських видів рослин. Окрім цього, трансгенні кореневі культури виступають потужним інструментом для вивчення біосинтетичних шляхів рослинних молекул та мають ряд переваг перед культурами клітинних суспензій та рослинами, вирощеними у відкритому ґрунті. Культури "бородатих" коренів також демонструють значний потенціал у виробництві рекомбінантних білків і спеціалізованих метаболітів, а також у дослідженнях складних взаємодій, пов'язаних із фіторемерацією.

Сучасні молекулярно-біологічні технології дозволяють створювати високопродуктивні клони, здатні продукувати вдосконалені функціональні молекули для застосування в харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловості. З огляду на широкі можливості практичного застосування, технологія культури "бородатих" коренів має всі передумови для подальшої

комерціалізації. Проте реалізація цього потенціалу потребує створення надійних, економічно вигідних та відповідних вимогам GMP виробничих процесів із добре контрольованими умовами культивування.

Крім того, використання новітніх методів генної інженерії, зокрема технології CRISPR/Cas9, відкриває нові перспективи для розвитку трансгенних кореневих культур. Перше успішне застосування системи CRISPR/Cas9 для створення трансгенних рослин було зафіксовано у 2014 році під час розробки томатів, що експресували маркерний білок eGFP. Надалі ця технологія була використана для вивчення процесів мутагенезу у *Glycine max* та *Medicago truncatula*, а також для нокауту гена архітектури рослини *BcFLA1* у *Brassica carinata* [64].

Створення культур "бородатих" коренів із цільовими мутаціями генів сприятиме поглибленому розумінню метаболічних шляхів, підвищенню продукції спеціалізованих метаболітів та оптимізації посттрансляційних модифікацій рекомбінантних білків, наприклад, шляхом зміни глікозилювання. Попри значний потенціал, промислове використання культур "бородатих" коренів на сьогодні обмежене, головним чином через початково низьку продуктивність та труднощі зі збільшенням масштабів культивування. На даний момент відомим прикладом комерційного застосування є екстракт із базиліку, отриманий із трансгенних коренів, який використовується у косметичній промисловості для лікування випадіння волосся. Подальша оптимізація процесів культивування, масштабування біореакторів та спрямована модифікація культур для отримання індивідуальних складних молекул сприятимуть інтеграції технології трансгенних коренів у провідні біотехнологічні стратегії сучасного молекулярного рослинництва [64].

Отже, культура «бородатих» коренів є перспективним напрямом у біотехнології, що поєднує фундаментальні дослідження з практичними застосуваннями. Їх унікальні властивості роблять їх цінним інструментом

для отримання біологічно активних сполук, генетичних досліджень та екологічних програм.

1.3. Роль мінерального живлення у формуванні вторинних метаболітів

Функціонування та розвиток рослинних систем тісно пов'язані із забезпеченням їх необхідними макроелементами, зокрема фосфором і азотом. Дефіцит фосфору, що спостерігається у багатьох ґрунтах, викликає значні морфологічні та метаболічні перебудови у рослин, спрямовані на підвищення ефективності його поглинання та використання. Водночас джерело азоту також суттєво впливає на ріст кореневої системи та синтез вторинних метаболітів. З огляду на важливість волохатих корневих культур як перспективної біотехнологічної платформи, розуміння впливу мінерального живлення на їх морфогенез та метаболізм є критично важливим для оптимізації біосинтетичних процесів.

Фосфор є одним із ключових елементів, що визначає ріст і розвиток рослин. Однак лише 20–50 % фосфору в ґрунті присутні у доступній неорганічній формі, тоді як більша його частина перебуває у вигляді нерозчинних органічних сполук, що призводить до широкого поширення фосфорного дефіциту у світі. Для подолання нестачі фосфору рослини розвинули різноманітні адаптивні стратегії. Однією з них є стимуляція утворення вторинних коренів і подовження корневих волосків, що сприяє покращенню поглинання фосфатів із навколишнього середовища. Ця стратегія особливо важлива у випадках, коли кореневу систему використовують як лікарську сировину [65].

Метаболічна перебудова відіграє суттєву роль в адаптації рослин до умов дефіциту фосфору. Первинні метаболічні зміни, зокрема підвищення експресії генів та активності ферментів, що беруть участь у вуглеводному та ліпідному обміні, є одними з ключових адаптивних

механізмів. Ці процеси активуються у відповідь на фосфорне голодування, сприяючи більш ефективному поглинанню та використанню фосфору рослинами [65].

Окрім змін у первинному метаболізмі, дефіцит фосфору також індукує активацію вторинного метаболізму, що є важливим для адаптації рослин до несприятливих умов. Зокрема, під впливом фосфорного голодування спостерігається накопичення сайкозапонінів у *Bupleurum chinense* DC [66] та гінзенозидів у *Panax* spp. [67]. Інтенсивність індукції вторинного метаболізму залежить від ступеня адаптаційної здатності конкретного виду рослин [65].

У дослідженні Uozumi та співавт. (1995) встановлено, що зниження концентрації фосфатів у культурі коренів *Ajuga hairy* призводило до зменшення швидкості росту та одночасного збільшення вмісту вторинних метаболітів [68]. Подібні результати отримали Liu та ін. (2018), які повідомили про накопичення фенольних кислот у трансгенних коренях *Salvia miltiorrhiza* за умов дефіциту фосфору. Автори також показали, що волосисті корені *Salvia castanea* порівняно із *S. miltiorrhiza* демонструють швидшу адаптацію до низького вмісту фосфору, що супроводжувалося збільшенням біомаси [65].

Вміст специфічних фенольних кислот у культурах волосистих коренів *S. castanea* та *S. miltiorrhiza* варіював залежно від рівня фосфатів у середовищі. Зокрема, обробка 1,24 мМ фосфатів стимулювала накопичення літоспермової кислоти В у *S. miltiorrhiza*, тоді як вміст кавової та розмаринової кислот зменшувався. Зниження рівня фосфатів до 0,6 мМ не суттєво впливало на вміст розмаринової кислоти та літоспермової кислоти В, однак сприяло накопиченню кавової кислоти [65].

Азот також є критично важливим макроелементом для забезпечення гомеостазу, росту та продуктивності рослин. Рослини здатні поглинати азот у вигляді нітратів (NO_3^-) або амонію (NH_4^+), причому співвідношення між

цими формами залежить від таких факторів, як кислотність ґрунту, вологість і насиченість киснем. Після поглинання нітрати можуть відновлюватися до амонію або включатися безпосередньо в амінокислоти, транспортуватися в листя, де накопичуються у вакуолях або переміщуються в апопласт.

Використання амонію як джерела азоту вимагає менших енергетичних витрат у порівнянні з нітратами, однак при цьому збільшується потреба у кетокислотах, що може спричиняти додаткові енергетичні витрати для рослини. Крім того, тривале використання амонію як єдиного джерела азоту є токсичним для більшості культурних і дикорослих рослин.

Джерело азоту значно впливає на ріст коренів та продукцію вторинних метаболітів. Так, Długosz та ін. (2018) показали, що у культурах волосистих коренів *Calendula officinalis* використання нітрату як джерела азоту сприяло кращому росту, накопиченню та секреції сапонінів порівняно з амонієм, хоча ефективність залежала від конкретної клітинної лінії [69].

На біосинтез розмаринової кислоти також впливають джерело азоту та співвідношення $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Зокрема, за даними Ільєвої та Павлової (1999), використання середовища з пониженим вмістом амонію (0,09 г/л, що становило 25 % від стандартної концентрації) сприяло підвищенню росту клітин *Lavandula vera* та вмісту розмаринової кислоти. Двократне збільшення накопичення розмаринової кислоти також спостерігалось при підвищенні концентрації NO_3^- у середовищі в 1,2 рази, хоча більша ефективність була відзначена саме при застосуванні амонію [65].

Таким чином, дефіцит фосфору індукує активацію адаптаційних механізмів у рослин, що супроводжується перебудовою первинного та вторинного метаболізму, стимуляцією росту корневих волосків та накопиченням біологічно активних сполук, таких як сайкозапоніни,

гінзенозиди та фенольні кислоти. Зниження доступності фосфатів може сприяти підвищенню рівня вторинних метаболітів у волохатих коренях різних видів. Джерело азоту (нітрат чи амоній) впливає на інтенсивність росту кореневої біомаси та біосинтез вторинних метаболітів, зокрема сапонінів та розмаринової кислоти. Розуміння взаємодії між мінеральним живленням і метаболічними процесами у волохатих коренях відкриває нові можливості для біотехнологічної оптимізації виробництва цінних сполук.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин м'яти водяної *M. aquatica* L.

Вихідним матеріалом для роботи були пагони м'яти водяної, зібраної у прибережній зоні річки Дніпро в Обухівському районі Київської області. Рослини було видібрано в природних умовах, перенесено в умови теплиці та витримано карантинний період протягом 30 діб. Після того пагони було обстежено на предмет наявності симптомів бактеріальних, грибкових або вірусних інфекцій. Здорові пагони було використано для введення в культуру *in vitro*. Для цього пагони було нарізано на сегменти, промито у проточній воді з додаванням невеликої кількості мильного розчину протягом 10 хв та перенесено у стерильні ємності для стерилізації. Стерилізацію експлантів було проведено у такій послідовності: обробка 70% етанолом протягом 2 хв, промивання двічі стерильною дистильованою водою, витримування у 1% розчині гіпохлориту натрію з додаванням однієї краплі 20% розчину Tween20 протягом 3 хв, промивання 4 рази стерильною дистильованою водою. Після стерилізації експланти переносили на стерильний фільтрувальний папір для видалення надлишку води. Після того експланти переносили на поверхню стерильного живильного середовища Мурасиге та Скуга (МС) без додавання регуляторів росту (табл. 2.1.1.).

Експланти культивували на даному середовищі протягом 2 тижнів, фіксуючи кількість життєздатних та кількість стерильних експлантів по відношенню до загальної кількості експлантів, використаних для введення в культуру *in vitro*. В подальшому рослини культивували на безгормональному середовищі МС, проводячи пасажування кожні два тижні.

Таблиця 2.1.1.

Склад живильного середовища Мурасиге та Скуга [70].

Компоненти	Вміст компонента, г/л
Макроелементи	
NH_4NO_3	33
KNO_3	38
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8
KH_2PO_4	3.4
Мікроелементи	
KI	1.7
H_3BO_3	1.24
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.7
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{C}_4\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
Розчин хелатованого заліза	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	74.6
Вітаміни	
Тіамін В6	0,1
Піридин	0,1
Нікотинова кислота	0,1
Кальцій пантотенат	0,1
Біотин	0,001
Міоїнозит	10
Інші компоненти	
Сахароза	30 г/л
Агар-агар	10 г/л

2.2. Отримання культури “бородатих” коренів

Для отримання культури “бородатих” коренів використовували листки та сегменти стебла асептичних рослин м’яти водяної та нічну культуру *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4), культивовану на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані (LB): 10 г триптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl (на 1 л середовища) [71]. Для приготування суспензії бактеріальних клітин нічну культуру *A. rhizogenes* осаджували центрифугуванням при 6 об/хв протягом 15 хв., осад ресуспендували у 5 мл рідкого середовища МС.

Для проведення генетичної трансформації на експлантах було зроблено насічки з метою підвищення ефективності проникнення бактерії в тканини рослин. Підготовані експланти поміщали у суспензію бактеріальних клітин та кокультивували протягом 30 хв. Після кокультивування експланти переносили на поверхню стерильного живильного середовища МС зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів (1/2МС). Експланти культивували в темряві при температурі 28 °С. Через 2 доби культивування експланти поміщали на живильне середовища 1/2 МС з додаванням 600 мг/л антибіотика цефотаксиму для елімінації агробактерії. Після проведення трансформації за екплантами спостерігали, відмічаючи появу коренів характерного фенотипу: сильне галуження, від’ємний геотропізм. Частоту трансформації визначали як відношення кількості експлантів, на яких утворились коренів, до загальної кількості експлантів.

2.3. Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз “бородатих” коренів

Для підтвердження трансгенної природи отриманих коренів рослин м’яти водяної було виділено геномну ДНК та проведено полімеразно-ланцюгову

реакцію зі специфічними праймерами до гена *rolB*. Геномну ДНК з трансгенних коренів виділяли ЦТАБ-методом. Для цього відбирали по 100 мг трансгенних коренів з кожної лінії, а також 100 мг коренів вихідної рослини в якості контролю. Рослинний матеріал гомогенізували з 1,5 мл буферу для екстракції ДНК (табл. 2.3.1). Отриманий гомогенат інкубували при температурі 56 °С протягом 20 хв, потім депротейнізували розчином суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Після того суміш розділяли центрифугуванням при 14 тис об/хв та отримували 2 фази, з них верхню фазу з ДНК відбирали та очищували додатково сумішшю хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Далі отриману водну фазу переносили у нові пробірки для осадження ДНК відповідним буфером для осадження (табл. 2.3.2). Після додавання буферу суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 20-60 хв (залежно від швидкості осадження ДНК у кожному конкретному варіанті). Осадження ДНК проводили центрифугуванням при 14 тис об/хв протягом 5 хв. Осад розчиняли у 200 мкл стерильного буферу, що містив 1,2М NaCl, та переосаджували двома об'ємами 96% етанолу протягом 12-16 годин. Після того ДНК осаджували центрифугуванням (14 тис об/хв протягом 5 хв), отриманий осад двічі промивали 70% етанолом, підсушували та розчиняли у 50 мкл деіонізованої стерильної води.

Таблиця 2.3.1

Склад ЦТАБ-буферу (x2) для екстракції рослинної ДНК (V=100 мл)

1М Тріс-HCl pH 8.0	10 мл
5M NaCl	28 мл (29,16]
0,5M Na-ЕДТА	4 мл
ЦТАБ	29 г
2-меркаптоетанол	280 мл

Таблиця 2.3. 2

Склад ЦТАБ-буферу (1%) для осадження (V=100 мл)

1М Tris-HCl pH 8.0	5 мл
0,5М Na-ЕДТА	2 мл
ЦТАБ	4 г

Для підтвердження трансгенної природи отриманих “бородатих” коренів було використано виділену геномну ДНК для полімеразно-ланцюгової реакції зі специфічними до гена *rolB* праймерами (табл.2.3.3.). В якості позитивного контролю була використана тотальна ДНК *A. rhizogenes*. Для підтвердження достовірності отриманих результатів ПЛР було також проведено ампліфікацію зразків ДНК з використанням праймерів, специфічних до гена *virG*, щоб уникнути хибнопозитивного результату через бактеріальне забруднення культури коренів.

Таблиця 2.3. 3

Послідовність специфічних праймерів для проведення ПЛР-аналізу

Ген	Послідовність праймерів
<i>rolB</i>	5' – atggatcccaattgctattccttccacga – 3', 5' – ttaggcttcttcttcaggttactgcagc – 3'
<i>virG</i>	5'-ggtcgctatgcggcatc-3' 5'cctgagattaagtgtccagtcag-3'

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл:

- 2 мкл (приблизно 100 нг) сумарної рослинної ДНК,
- 2 мкл сольового буфера (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01% Тритон X-100),

- 2 мкл суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів із розрахунку 200 мкМ кожного в реакційній суміші,
- 0,5 мкл кожного з праймерів (0,2 мкМ),
- 0,5 мкл Таq-полімерази
- 13 мкл стерильної деіонізованої води.

Реакція проводилася за таких умов: первинна денатурація – 94°C, 3хв, 30 циклів ампліфікації (94°C, 30 сек – 55°C, 30 сек – 72°C, 30 сек), остаточна полімеризація – 72°C, 5 хв .

Продукти ПЛР аналізувалися за допомогою електрофорезу в 1%-агарозному гелі в Трис-ацетатній буферній системі. Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих коренів рослин м'яти водяної, позитивним контролем — тотальна ДНК агробактерії.

2.4. Визначення впливу вмісту фосфору та азоту на ріст культури “бородатих” коренів м'яти водяної.

Для визначення впливу кислотності та мінерального складу (вміст фосфатів та нітратів) живильного середовища було відібрано 5 ліній “бородатих” коренів, які культивували на живильному середовищі МС, що містило 15мМ азоту, NH_4NO_3 , (+N), 2,5 (+P) та 0,6мМ (-P) фосфору K_2HPO_4 та рН 5,7. В якості контрольного живильного середовища було використано стандартне середовище МС, яке містить 10мМ азоту, 1,25 мМ фосфату та рН 5,7). Приріст біомаси коренів визначали після 30 діб культивування на середовищах зазначеного складу.

Приріст біомаси (К) визначали за формулою:

$$K = (w1 - w0) / 30,$$

де $w1$ та $w0$ — кінцева та початкова маса (г) відповідно за період культивування (30 діб).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Ефективність введення в культуру та отримання “бородатих” коренів рослин м’яти водяної

Рослини м’яти водяної було введено в культуру *in vitro* шляхом стерилізації пагоїв. Загалом було використано 15 пагоїв м’яти водяної для введення в культуру *in vitro*. Після стерилізації 9 рослин залишалися життєздатними та асептичними, що відповідало загальній ефективності 60 %. При цьому загибель рослин внаслідок фітотоксичності стерилізаційних агентів склала 25 %, а контамінація залишалася на рівні 15 %. Це свідчить про добрий баланс між антимікробною активністю та мінімальним стресом для рослинного матеріалу. Отже, ефективність стерилізації складала 60 %, що включало в себе усереднений відсоток отриманих стерильних рослин з урахуванням як життєздатності рослин, так і відсутність бактеріальної та грибною контамінації. Отриманий відсоток асептичних рослин м’яти водяної є достатньо високим для такого методу введення в культуру *in vitro*, що дозволяє припустити, що застосований протокол стерилізації є ефективним та може використовуватись для отримання таких рослин.



Рис. 3.1.1. Рослини м'яти водяної в культурі *in vitro*.

Отримані асептичні рослини було використано для *A. rhizogenes* - опосередкованої генетичної трансформації з метою отримання культури “бородатих” коренів. В якості експлантів для цього було використано як листові, так і стеблові сегменти. Перші ознаки утворення трансформованих коренів спостерігалися на 10–14 день після кокультивації з *A. rhizogenes*. При використанні стеблових експлантів перші корені з'являлися в середньому на 11-й день, тоді як при використанні листових сегментів — лише на 15-й день. Це свідчить про швидшу реакцію стеблової тканини на трансформацію.

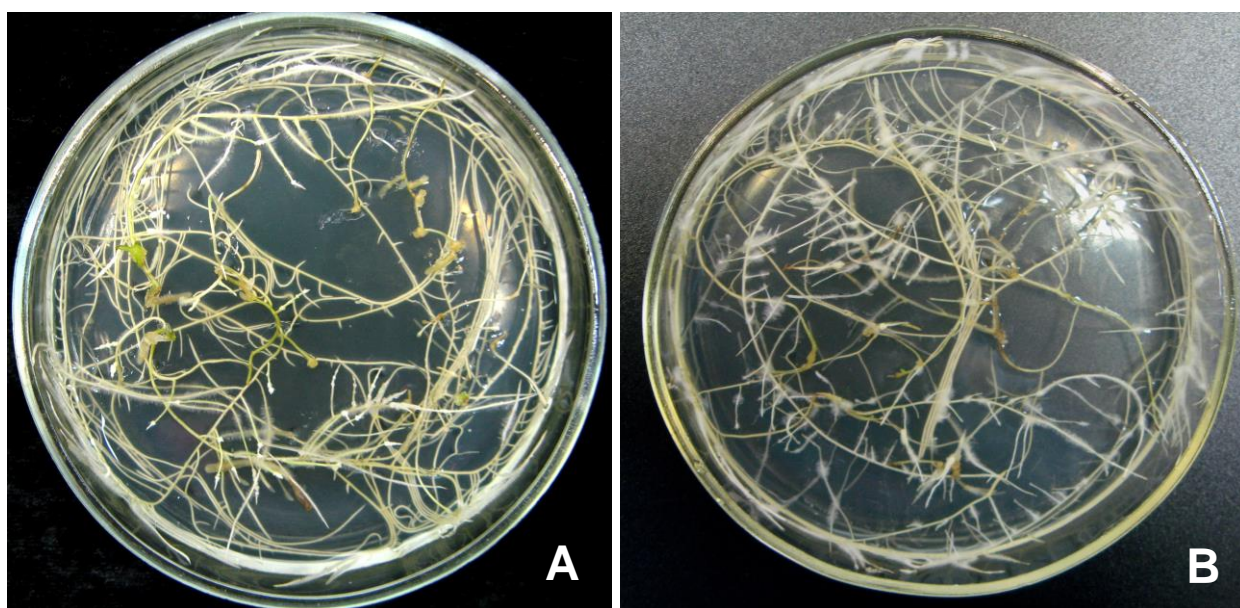


Рис. 3.1.2. Культура “бородатих” коренів рослин м’яти водяної: А-лишкові експланти; В — стеблові експланти.

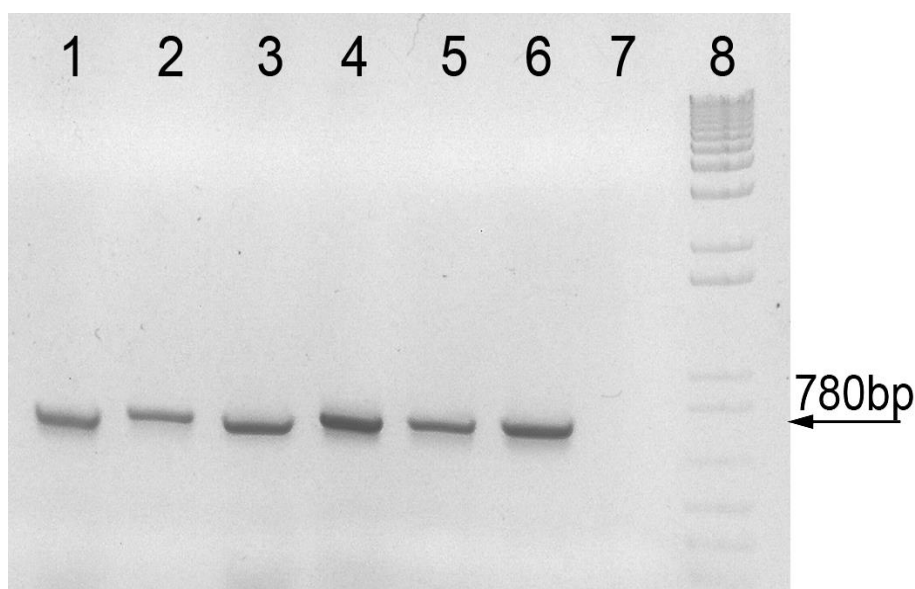
Отже, проведення генетичної трансформації показало, що тип експланту впливає на частоту отримання “бородатих” коренів рослин м’яти водяної. Так, використання стеблових сегментів призвело до зростання частоти трансформації до 28%, тоді як частота трансформації листових сегментів складала 12%. Варто також зазначити, що за зовнішніми ознаками лінії “бородатих” коренів, отриманих зі стеблових експлантів, мали вищу якість у порівнянні з лініями коренів, отриманих з листових експлантів. Вищі показники стеблових експлантів можуть бути зумовлені кращою сприйнятливістю клітин до трансформації або активнішою проліферацією. Тому для подальших досліджень було відібрано 5 найбільш швидко ростучих ліній “бородатих” коренів, отриманих зі стеблових експлантів.

Таким чином, для отримання культури “бородатих” коренів м’яти водяної доцільно використовувати стеблові експланти для досягнення показника частоти трансформації 28%.

Отримані “бородаті” корені мали фенотип, характерний для такої культури: значне галуження, від’ємний геотропізм, здатність рости на

безгормональному середовищі. Проте для підтвердження трансгенної природи таких коренів необхідно провести молекулярно-генетичний аналіз, зокрема, полімераза-ланцюгову реакції зі специфічними до гена *rolB* праймерами. Для підтвердження відсутності контамінації *A. rhizogenes*, доцільним є проведення ПЛР-аналізу із використанням праймерів до бактеріального *virG* гена. Так, нами було виділено геномну ДНК із 5ти ліній “бородатих” коренів, а також з коренів вихідної нетрансформованої рослини. Для виділеної ДНК було проведено ампліфікацію, де в якості позитивного контролю використовували тотальну ДНК *A. rhizogenes*.

Аналіз електрофореграми продуктів ПЛР-аналізу показав наявність шуканого фрагмента ДНК довжиною 780 п.н. у геномній ДНК досліджуваних ліній “бородатих” коренів та у позитивному контролі. При тому у геномній ДНК коренів вихідної рослини зазначений фрагмент не було виявлено. Крім того, відсутність фрагменту, що відповідає гену *virG*,



свідчить про відсутність контамінації “бородатих” коренів бактерією.

Рис. 3.1.3. Результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації геномної ДНК “бородатих” коренів рослин м’яти водяної з використанням праймерів до *rolB* гена: 1- позитивний контроль, сумарна

ДНК *A. rhizogenes*; 2-6 - сумарна ДНК «бородатих коренів»; 7 – ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 8 –маркер O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Таким чином, результати молекулярно-генетичного аналізу підтвердили інтеграцію гена *rolB* у геном трансформованих ліній м'яти водяної та відсутність контамінації *Agrobacterium rhizogenes*. Отримані дані свідчать про успішну реалізацію *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації та формування стабільних культур "бородатих" коренів. Отже, отримані лінії "бородатих" коренів рослин м'яти водяної мають трансгенну природу, про що свідчить наявність фрагмента 780 п.н., що відповідає розміру гена *rolB*.

3.2. Вплив мінерального живлення (фосфору та азоту) на ріст культури "бородатих" коренів м'яти водяної.

Для визначення впливу концентрації фосфору та азоту в живильному середовищі було відібрано 5 ліній "бородатих" коренів м'яти водяної та культивованої на рідких живильних середовищах МС з 15мМ азоту (надлишок), 2,5мМ та 0,6 мМ фосфору (надлишок та дефіцит відповідно). В якості контрольного середовища використовували стандартне середовище МС.

Результати досліджень показали, що збільшення концентрації азоту в середовищі МС не призводить до достовірного зростання приросту біомаси коренів. Так, приріст біомаси в контролі складав $1,50 \pm 0,18$ - $2,9 \pm 0,98$ мг/добу, тоді як при культивування на середовищі МС, що містило 15мМ азоту, даний показник становив $2,30 \pm 0,10$ — $3,5 \pm 0,12$ мг/добу залежно від лінії "бородатих" коренів.

Дослідження впливу концентрації фосфору в живильному середовищі МС показало, що даний компонент суттєво впливає на приріст біомаси “бородатих” коренів м’яти водяної. Зокрема, додавання в живильне середовища 0,6 мМ фосфору (що є меншим у порівнянні із стандартним середовищем МС) призвело до зниження приросту біомаси усіх досліджуваних ліній “бородатих” коренів м’яти водяної. Так, приріст біомаси у контролі становив $1,50 \pm 0,18$ — $2,9 \pm 0,98$ мг/добу, тоді як при культивуванні на середовищі, що містило 0,6 мМ фосфору приріст біомаси виявився $0,18 \pm 0,01$ - $0,56 \pm 0,04$ мг/добу залежно від лінії.

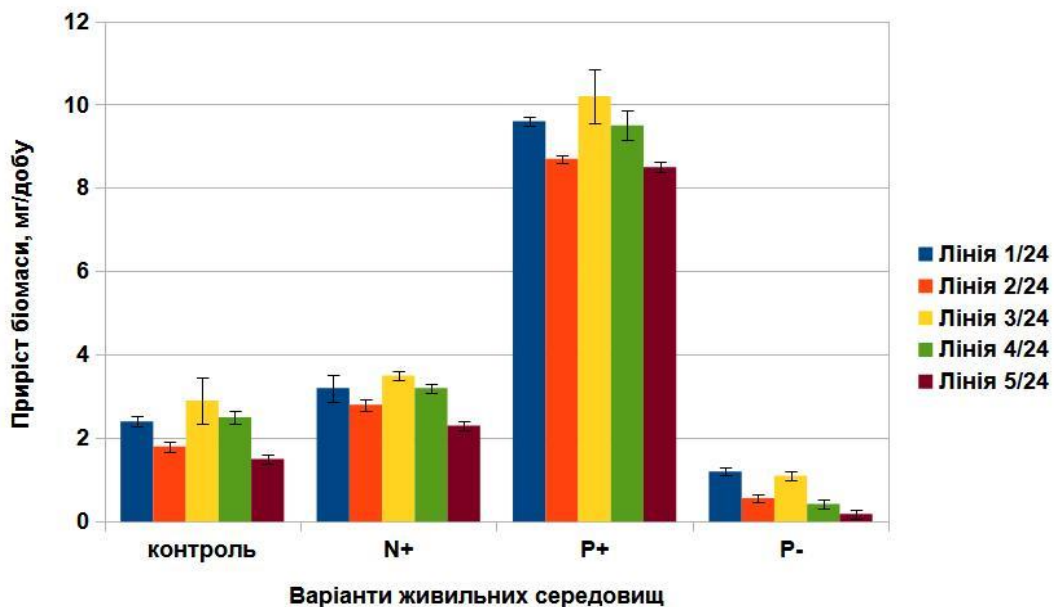


Рис. 3.2.1. Приріст біомаси “бородатих” коренів м’яти водяної в залежності від складу живильного середовища.

Збільшення концентрації фосфору в живильному середовищі призводило до зростання приросту біомаси усіх досліджуваних ліній “бородатих” коренів. Так, при культивуванні на живильному середовищі МС із додаванням 2,5 мМ фосфору приріст біомаси для всіх досліджуваних ліній “бородатих” коренів становив $8,5 \pm 0,12$ — $10,20 \pm 0,14$ мг/добу

(залежно від лінії), тоді як при культивуванні на стандартному середовищі МС даних показник був у 3,51-5,67 разів нижчим та становив $1,50 \pm 0,18$ мг/добу.

Отже, на приріст біомаси досліджуваних 5ти ліній “бородатих” коренів м’яти водяної суттєво впливає концентрація фосфору в живильному середовищі. Так, збільшення вмісту фосфору до 2,5 мМ призводить до зростання приросту біомаси в 3,51-5,67 рази, тоді як зменшення фосфору до 0,6 мМ — до зниження в 5,17-8,33 рази у порівнянні з контролем. Разом з тим, збільшення концентрації азоту в живильному середовищі не призводить до значних змін приросту біомаси, що свідчить про недоцільність збільшення концентрації азоту в живильному середовищі МС для культивування “бородатих” коренів м’яти водяної.

Окрім кількісних змін приросту біомаси, були відзначені також морфологічні особливості розвитку “бородатих” коренів за різних концентрацій поживних елементів. При дефіциті фосфору (0,6 мМ) спостерігалось зменшення товщини коренів, зниження щільності вторинних розгалужень, а також часткова депігментація кореневої тканини. При підвищенні концентрації фосфору до 2,5 мМ морфологія кореневої системи покращувалася: корені ставали товстішими, щільніше розгалужувалися, мали здоровий білий або світло-жовтий колір.

Механізм позитивного впливу фосфору на приріст біомаси можна пояснити його ключовою роллю у метаболічних процесах клітини. Фосфор є складовою частиною АТФ, що забезпечує енергетичні потреби для біосинтетичних реакцій, а також бере участь у формуванні нуклеїнових кислот, структурних елементів мембран (фосфоліпідів) і вторинних сигнальних молекул. Зниження доступності фосфору, як правило, обмежує клітинний поділ, синтез макромолекул та енергетичний обмін, що й призводить до зниження темпів росту рослинних тканин.

Отримані дані узгоджуються з результатами інших досліджень. Зокрема, за даними Wang et al. (2018) [72], дефіцит фосфору призводить до гальмування росту кореневої системи у ряду рослинних видів, а підвищення його концентрації у середовищі сприяє активізації мітотичної активності клітин. Аналогічні результати наведено у роботах Zhang et al. (2021) [73], де було встановлено, що оптимізація фосфорного живлення дозволяє значно підвищити приріст біомаси *in vitro* у культурі "бородатих" коренів інших рослин.

З практичної точки зору, результати даного дослідження свідчать про доцільність використання модифікованого середовища Мурасиге і Скуга зі стандартною концентрацією азоту (10 мМ) та підвищеною концентрацією фосфору до 2,5 мМ для культивування "бородатих" коренів м'яти водяної. Такий підхід дозволяє забезпечити оптимальні умови для зростання біомаси, що є особливо важливим при створенні високопродуктивних систем для біотехнологічного виробництва вторинних метаболітів, лікарських препаратів та інших цінних сполук.

Таким чином, для культивування "бородатих" коренів м'яти водяної доцільним є використання живильного середовища Мурасиге та Скуга зі збільшеним вмістом фосфору (2,5 мМ) та вмістом азоту згідно стандартного протоколу (10мМ).

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Визначено, що асептичні рослини м'яти водяної можна отримати шляхом поверхневої стерилізації пагонів 1% розчином гіпохлориту натрію протягом 3 хв з ефективністю 60%.

2. Показано, що *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована трансформація рослин м'яти водяної приводить до утворення “бородатих” коренів з частотою 28 %. Трансгенна природа таких коренів підтверджена полімеразно-ланцюговою реакцією за специфічними до гена *rolB* праймерами.

3. Виявлено, що для культивування “бородатих” коренів м'яти водяної оптимальним живильним середовищем є середовище Мурасиге та Скуга зі збільшеним вмістом фосфору (2,5 мМ) та вмістом азоту згідно стандартного протоколу (10мМ).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jäger A. K., Almqvist J. P., Vangsøe S. A. K., Stafford G. I., Adsersen A., Van Staden J. Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor // *South African Journal of Botany*. – 2007. – Vol. 73. – P. 518–521.
2. Raja R. R. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: An overview // *Research Journal of Medicinal Plant*. – 2012. – Vol. 6. – P. 203–213.
3. Jafari A., Kahrizi D., Mansouri M. Effects of plant growth regulators and explant on callus induction in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) // *Biharean Biologist*. – 2016. – Vol. 10. – P. 134–136.
4. Darvishi E., Kahrizi D., Bahraminejad S., Mansouri, M. In vitro induction of α -pinene, pulegone, menthol, menthone and limonene in cell suspension culture of pennyroyal (*Mentha pulegium*) // *Cellular and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 62. – P. 7–9.
5. Darvishi E., Kazemi E., Kahrizi D., Bahraminejad, S., Mansouri, M., Chaghakaboudi, S. R., Khani, Y. Optimization of callus induction in pennyroyal (*Mentha pulegium*) // *Applied Biotechnology Reports*. – 2014. – Vol. 1. – P. 97–100.
6. Hossain M. A., Mizanur Rahman S. M. Biological and pharmacological activities of *Mentha aquatica* L.: A comprehensive review // *Phytotherapy Research*. – 2023. – Vol.37. - 326-341.
7. Dorman H.J.D., Koşar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – P. 4563–4569.

8. Kanatt S. R., Chander R., Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 100. – P. 451–458.
9. Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L. Hairy root cultures for secondary metabolites production // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2010. – Vol. 698. – P. 167–184.
10. Zarei B., Kahrizi D., Mousavi S. A., Nasrollahnezhad Ghomi A. A. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Atropa belladonna* // *Journal of Agricultural Biotechnology*. – 2013. – Vol. 5. – P. 59–67.
11. Motamedi J., Zebarjadi A., Kahrizi D., Salmanian A.H. Transformation of bacterial mutated *aroA* gene to safflower (*Carthamus tinctorius* L.) via *Agrobacterium*-mediated method // *Modern Genetics Journal (MGJ)*. – 2012. – Vol. 7. – P. 57–63.
12. Zárate R., Cequier-Sánchez E., Rodríguez C., Dorta-Guerra R., El Jaber-Vazdekis N., Ravelo Á.G. Improvement of polyunsaturated fatty acid production in *Echium acanthocarpum* transformed hairy root cultures by application of different abiotic stress conditions // *ISRN Biotechnology*. – 2013. – Article ID 169510.
13. Pires P.C et al. *Mentha aquatica* (Water Mint) as a source of active pharmaceutical and cosmetic ingredients: a critical review // *Phytotherapy Research*. – 2024. – Vol. 38, No. 12. – P. 5806–5839.
14. Gantait S., Mukherjee E. Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 105. – P. 35–53.
15. Yadav A., Singh A., Verma R. Hairy root culture: a potent method for improved secondary metabolite production // *Frontiers in Plant Science*. – 2023. – Vol. 14. – Article 1197555.
16. Kumar V., Singh D. Hairy-root technology: a metabolic engineering tool and specialized bioreactor system for secondary metabolite

production // *Biotechnology Advances*. – 2024. – Vol. 62. – Article 108052. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108052.

17. Sharma P., Gupta R. The untapped potential of hairy root cultures and their multiple applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, No. 23. – Article 12682.

18. Doran P.M. Biotechnology of hairy root systems // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2013. – Vol. 134. – P. 91–114.

19. Gelvin S.B. *Agrobacterium* in the genomics age // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 150. – P. 1665–1676.

20. Mauro M.L, Costantino P., Bettini P.P. The never ending story of *rol* genes: a century after // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2017. – Vol. 131. – P. 201–212.

21. Wang J.W., Wu J.Y. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2013. – Vol. 134. – P. 55–89.

22. Häkkinen S.T., Ritala A. Medicinal compounds produced in plant cell factories // In: Arora R (Ed.) *Medicinal Plant Biotechnology*. – Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2010. – P. 13–35.

23. Stoger E., Fischer R., Moloney M., Ma J.K.-C. Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases // *Annual Review of Plant Biology*. – 2014. – Vol. 65. – P. 743–768.

24. Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource // *Trends in Biotechnology*. – 2012. – Vol. 30. – P. 528–537.

25. Häkkinen S.T., Oksman-Caldentey K.M. Progress and prospects of hairy root research // In: Srivastava V., Mehrotra S., Mishra S. (Eds.) *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*. – Singapore: Springer, 2018. – P. 3–19.

26. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1997. – Vol. 54. – P. 401–415.

27. Medina-Bolivar L.F., Yang T. Method to increase the yield of products in plant material: patents EP2735609; US9598707; ES2644113; CA2834646; DK2735609. – 2017. – Arkansas State University Jonesboro, inventors and assignee.

28. Woods R.R., Geyer B.C., Mor T.S. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase // *BMC Biotechnology*. – 2008. – Vol. 8. – Article 95.

29. Liu C., Towler M.J., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – Vol. 102. – P. 1074–1086.

30. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // *Biotechnology Journal*. – 2012. – Vol. 7. – P. 537–545.

31. Luchakivskaia I.S., Olevinskaia Z.M., Kishchenko E.M., Spivak N.I., Kuchuk N.V. Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b // *Tsitologiya i Genetika*. – 2012. – Vol. 46. – P. 18–26.

32. Gurusamy P.D., Schäfer H., Ramamoorthy S., Wink M. Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12, No. 8. – Article e0182367.

33. Cardon F., Pallisse R., Bardor M., Caron A., Vanier J., Ele Ekouna J.P. *Brassica rapa* hairy root based expression system leads to the production of highly homogenous and reproducible profiles of recombinant human alpha-L-iduronidase // *Plant Biotechnology Journal*. – 2019. – Vol. 17. – P. 505–516.

34. Sun J., Peebles C.A.M. Engineering overexpression of ORCA3 and strictosidine glucosidase in *Catharanthus roseus* hairy roots increases alkaloid production // *Protoplasma*. – 2016. – Vol. 253. – P. 1255–1264.
35. Chahardoli M., Fazeli A., Ghabooli M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 123. – P. 414–421. –
36. Huet Y., Ele J.P., Aurore E., Katiba C., Boitel-Conti M., Guerineau F. Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots // *Biotechnology Letters*. – 2014. – Vol. 36. – P. 181–190.
37. Donini M., Marusic C. Hairy roots as bioreactors for the production of biopharmaceuticals // In: Srivastava V, Mehrotra S, Mishra S (Eds.) *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*. – Singapore: Springer, 2018. – P. 213–225.
38. Talano M.A., Wevar Oller A.L., González P.S., Agostini E. Hairy roots, their multiple applications and recent patents // *Recent Patents on Biotechnology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 115–133.
39. Alvarez M.A., Alvarez M.A. The Antibody 14D9 as an experimental model for molecular farming // In: *Plant Biotechnology for Health*. – Cham: Springer International Publishing, 2014. – P. 111–131.
40. Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM, Oksman-Caldentey KM. Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – Article 1486. – DOI: 10.3389/fpls.2016.01486.
41. Thakore D., Srivastava A.K. Production of biopesticide azadirachtin using plant cell and hairy root cultures // *Engineering in Life Sciences*. – 2017. – Vol. 17. – P. 997–1005.

42. Pavlov A., Georgiev V., Ilieva M. Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture // *Process Biochemistry*. – 2005. – Vol. 40. – P. 1531–1533.
43. Wetterauer B., Wildi E., Wink M. Production of the anticancer compound camptothecin in root and hairy root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. // In: *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. – Singapore: Springer, 2018. – P. 303–341.
44. Shajahan A., Thilip C., Faizal K., Mehaboob V.M., Raja P., Aslam A. An efficient hairy root system for withanolide production in *Withania somnifera* (L.) Dunal // In: *Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture*. – Cham: Springer, 2017. – P. 133–143.
45. Ritala A., Dong L., Imseng N., Seppänen-Laakso T., Vasilev N., Van der Krol S. Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 176. – P. 20–28.
46. Mehrotra S., Srivastava V., Rahman L.U., Kukreja A.K. Hairy root biotechnology—indicative timeline to understand missing links and future outlook // *Protoplasma*. – 2015. – Vol. 252. – P. 1189–1201.
47. Guo Z, Tan H, Lv Z, Ji Q, Huang Y, Liu J, et al. Targeted expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* hairy roots // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 1–12.
48. Khezerluo M, Hosseini B, Amiri J. Sodium nitroprusside stimulated production of tropane alkaloids and antioxidant enzymes activity in hairy root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. // *Acta Biologica Hungarica*. – 2018. – Vol. 69. – P. 437–448.
49. Hu H. A northern sky survey for both TeV cosmic-ray anisotropy and TeV γ -ray sources using the Tibet air shower array // *Nuclear Physics B Proceedings Supplements*. – 2006. – Vol. 151. – P. 121–124.

50. Woo SS, Song JS, Lee JY, In DS, Chung HJ, Liu JR, et al. Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. – P. 2751–2761.

51. Putalun W., Prasarnsiwamai P., Tanaka H., Shoyama Y. Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. // *Biotechnology Letters*. – 2004. – Vol. 26. – P. 545–548.

52. Wevar Oller A.L., Agostini E., Milrad S.R., Medina M.I. In situ and de novo biosynthesis of vitamin C in wild type and transgenic tomato hairy roots: a precursor feeding study // *Plant Science*. – 2009. – Vol. 177. – P. 28–34.

53. Sirikantaramas S., Taura F. Cannabinoids: biosynthesis and biotechnological applications // In: *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. – Cham: Springer, 2017. – P. 183–206.

54. Vaghari H., Jafarizadeh-Malmiri H., Anarjan N., Berenjian A. Hairy root culture: a biotechnological approach to produce valuable metabolites // In: *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. – Singapore: Springer, 2017. – P. 131–160.

55. Perassolo M., Cardillo A.B., Mugas M.L., Núñez Montoya S.C., Giulietti A.M., Rodríguez Talou J. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum* // *Industrial Crops and Products*. – 2017. – Vol. 105. – P. 124–132.

56. Halder M., Roychowdhury D., Jha S. A critical review on biotechnological interventions for production and yield enhancement of secondary metabolites in hairy root cultures // In: *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*. – Eds. Srivastava V, Mehrotra S, Mishra S. – Singapore: Springer, 2018. – P. 21–44.

57. O'Kennedy R., Murphy C., Devine T. Technology advancements in antibody purification // *Antibody Technology Journal*. – 2016. – Vol. 6. – P. 17–32.

58. Murthy H.N., Lee E.J., Paek K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2014. – Vol. 118. – P. 1–16.

59. Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Narayan M.S., Ravishankar G.A. Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress // *Process Biochemistry*. – 2003. – Vol. 38. – P. 1069–1076.

60. Yan Q, Hu ZD, Wu JY. Synergistic effects of biotic and abiotic elicitors on the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. – 2006. – Vol. 31. – P. 188–191.

61. Udomsuk L., Jarukamjorn K., Tanaka H., Putalun W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation // *Biotechnology Letters*. – 2011. – Vol. 33. – P. 369–374.

62. Tisserant L.P., Aziz A., Jullian N., Jeandet P., Clément C., Courot E. Enhanced stilbene production and excretion in *Vitis vinifera* cv. *Pinot Noir* hairy root cultures // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21, №12. – Article 1703.

63. Lenk F., Sürmann A., Oberthür P., Schneider M., Steingroewer J., Bley T. Modeling hairy root tissue growth in in vitro environments using an agent-based, structured growth model // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2014. – Vol. 37. – P. 1173–1184.

64. Gutierrez-Valdes N., Häkkinen S.T., Lemasson C., Guillet M., Oksman-Caldentey K.M., Ritala A., Cardon F. Hairy root cultures – a versatile tool with multiple applications // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – Article 33.

65. Liu L., Yang D., Xing B., Zhang H., Liang Z. *Salvia castanea* hairy roots are more tolerant to phosphate deficiency than *Salvia miltiorrhiza* hairy roots based on the secondary metabolism and antioxidant defenses // *Molecules*:

A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry. – 2018. – Vol. 23. - Article 1132.

66. Ahn J.C., Chong W.S., Kim Y.S., Hwang B. Optimization of the sucrose and ion concentrations for saikosaponin production in hairy root culture of *Bupleurum falcatum* // *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* – 2006. – Vol. 11. - P. 121-126.

67. Liu S., Zhong J.J. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by- cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* // *Process Biochemistry.* – 1998. – Vol. 33. – P. 69–74.

68. Uozumi N., Makino S., Kobayashi T. 20-Hydroxyecdysone production in *Ajuga* hairy root controlling intracellular phosphate content based on kinetic model // *Journal of Fermentation and Bioengineering.* – 1995. – Vol. 80. – P. 362–368.

69. Długosz M., Markowski M., Pączkowski C. Source of nitrogen as a factor limiting saponin production by hairy root and suspension cultures of *Calendula officinalis* L. // *Acta Physiologiae Plantarum.* – 2018. – Vol. 40. – Article 35.

70. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473–497.

71. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

72. Wang X., Shen J., Liao H. Acquisition or utilization, which is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops? // *Plant Science.* – 2018. – Vol. 275. – P. 319–329.

73. Zhang Y., Zhang X., Zhang L., Li Y. Phosphorus supply enhances biomass accumulation and metabolic activity in hairy roots of medicinal plants // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2021. – Vol. 147. – P. 345–356.

ДОДАТОК А
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ