

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології**

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
(підпис)
«_____» _____ 2026 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИТСУ

**завідувач кафедри екобіотехнологій та
біорізноманіття**

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)
«_____» _____ 2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Дослідження біосинтетичної властивості різних ліній рослин роду
Astragalus in vitro»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо професійна програма «Біотехнологія та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівники кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук, доцент

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

_____ **Олександр МАНЖУРА**
(підпис)

Виконав

_____ **Антон ТРОФІМЮК**
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИПОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
к.б.н., доцент _____ Олена КВАСКО
«_____» _____ 2026 р.

ЗАВДАННЯ ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ

Трофімюк Антону Андрійовичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітньо професійна програма «Біотехнологія та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Дослідження біосинтетичної властивості різних ліній рослин роду *Astragalus in vitro*»

затверджено наказом від «30» жовтня 2025 р. № 2596 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру 22 травня 2026 р.

Вихідні дані до роботи: рослини роду *Astragalus dasyanthus* P; живильне середовище Мурасіге і Скуга, Гамборга В5.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Одержати асептичну культуру рослин *Astragalus dasyanthus in vitro*.
2. Дослідити вплив живильних середовищ МС+БАП та В5 на проростання насіння і морфогенез рослин *Astragalus dasyanthus*.
3. Визначити вміст сумарних флавоноїдів, фенольних сполук та фруктози у рослинному матеріалі *Astragalus dasyanthus* спектрофотометричними методами.
4. Встановити особливості накопичення біологічно активних речовин у рослин *Astragalus dasyanthus* залежно від складу живильного середовища.

Дата видачі завдання «30» жовтня 2025 року

Завдання прийняв до виконання _____ **Антон ТРОФІМЮК**
(підпис)

Керівники кваліфікаційної роботи _____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

_____ **Олександр МАНЖУРА**
(підпис)

РЕФЕРАТ

Загальний обсяг роботи 44 сторінки, вона включає вступ, три розділи, висновки, а також містить 2 рисунки, 10 таблиць, список використаних джерел.

Ключові слова: *Astragalus dasyanthus*, культура *in vitro*, живильне середовище, флавоноїди, фенольні сполуки, фруктоза, біологічно активні речовини.

Мета дослідження - дослідити особливості росту, розвитку та накопичення біологічно активних речовин у рослин *in vitro* *Astragalus dasyanthus* залежно від складу живильного середовища.

Об'єкт дослідження - рослини *in vitro* *Astragalus dasyanthus*.

Предмет дослідження - ріст, розвиток та накопичення біологічно активних речовин у рослин залежно від умов культивування.

Методи дослідження: біотехнологічні (культура *in vitro*), біохімічні (екстракція, спектрофотометрія), аналітичні та статистичні методи обробки результатів.

У результаті дослідження встановлено, що середовище В5 забезпечує вищий рівень проростання насіння (73,3 %) порівняно з МС+БАП (56,7 %). Встановлено, що середній вміст сумарних флавоноїдів у рослин, вирощених на середовищі В5, становив $4,85 \pm 0,22$ мг/г сирої маси, що перевищувало показники МС+БАП ($3,30 \pm 0,20$ мг/г). Аналогічна тенденція спостерігалася і для сумарних фенольних сполук: $3,14 \pm 0,10$ мг/г на В5 проти $2,63 \pm 0,09$ мг/г на МС+БАП. Водночас середній вміст фруктози був дещо вищим у рослин на середовищі МС+БАП ($10,19 \pm 0,43$ мг/г) порівняно з В5 ($9,17 \pm 0,37$ мг/г).

ABSTRACT

The thesis consists of 44 pages and includes an introduction, three chapters, conclusions, 2 pictures, 10 tables, and a list of references.

Keywords: *Astragalus dasyanthus*, *in vitro* culture, culture medium, flavonoids, phenolic compounds, fructose, bioactive compounds.

The aim of the study was to investigate the growth, development, and accumulation of biologically active compounds in *Astragalus dasyanthus* plants cultured *in vitro* depending on the composition of the nutrient medium.

The object of the study was *Astragalus dasyanthus* plants cultured *in vitro*.

The subject of the study was the growth, development, and accumulation of biologically active compounds in plants depending on cultivation conditions.

Research methods included biotechnological methods (*in vitro* culture), biochemical methods (extraction and spectrophotometry), as well as analytical and statistical methods for data processing.

The results of the study demonstrated that the B5 medium provided a higher seed germination rate (73.3%) compared with the MS+BAP medium (56.7%). The average content of total flavonoids in plants cultivated on the B5 medium was 4.85 ± 0.22 mg/g fresh weight, which exceeded the value obtained for plants grown on MS+BAP (3.30 ± 0.20 mg/g). A similar trend was observed for total phenolic compounds: 3.14 ± 0.10 mg/g on B5 versus 2.63 ± 0.09 mg/g on MS+BAP. At the same time, the average fructose content was slightly higher in plants cultivated on MS+BAP (10.19 ± 0.43 mg/g) than in those grown on B5 (9.17 ± 0.37 mg/g).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Загальна характеристика роду <i>Astragalus</i>	10
1.1.1. Систематичне положення, морфологічні особливості та поширення рослин роду <i>Astragalus</i>	10
1.1.2. Значення представників роду <i>Astragalus</i> у медицині та фармакології.....	12
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1. Підготовка насіння до введення в культуру <i>in vitro</i>	20
2.2. Живильні середовища.....	20
2.2.1 Підбір та характеристика живильних середовищ.....	20
2.2.2. Приготування поживних середовищ.....	22
2.3. Введення насіння в культуру <i>in vitro</i> та культивування рослин	24
2.3.1. Висів насіння на живильні середовища.....	24
2.3.2. Умови культивування та проростання насіння.....	24
2.3.3. Перенесення проростків у стерильні ємності	25
2.3.4. Подальше культивування рослин <i>in vitro</i>	25
2.4. Отримання рослинної сировини	26
2.5. Приготування рослинних екстрактів	26
2.6. Визначення вмісту біологічно активних речовин.....	27
2.6.1. Визначення вмісту флавоноїдів спектрофотометричним методом	27
2.6.2. Визначення вмісту фруктози спектрофотометричним методом.....	28
2.6.3. Визначення вмісту сумарних фенольних сполук спектрофотометричним методом	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ	30
3.1. Проростання насіння <i>Astragalus dasyanthus</i> у культурі <i>in vitro</i>	30
3.2. Ріст і розвиток рослин <i>Astragalus dasyanthus</i> у культурі <i>in vitro</i>	31

3.3. Вміст флавоноїдів у рослинах <i>Astragalus dasyanthus</i> , отриманих у культурі <i>in vitro</i>	32
3.4. Вміст фруктози у рослинному матеріалі <i>Astragalus dasyanthus in vitro</i>	34
3.5. Вміст фенолів у рослинному матеріалі <i>Astragalus dasyanthus in vitro</i>	35
3.6. Обговорення результатів дослідження	38
ВИСНОВОК	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

В5 - живильне середовище Гамборга

МС - живильне середовище Мурасіге-Скуга

МС+БАП - живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням 6-бензиламінопурину

БАП - 6-бензиламінопурин

БАР - біологічно активні речовини

ЕДТА - етилендіамінтетраоцтова кислота

ВСТУП

Культура рослин *in vitro* є одним із перспективних напрямів сучасної біотехнології, що дозволяє не лише отримувати рослинний матеріал незалежно від природних умов, але й цілеспрямовано впливати на процеси росту та біосинтезу біологічно активних речовин. Особливий інтерес становить можливість регулювання накопичення вторинних метаболітів шляхом зміни складу живильного середовища, зокрема концентрації мінеральних компонентів, вуглецевих джерел та регуляторів росту. У таких умовах рослини можуть змінювати напрям метаболізму, що відкриває широкі можливості для отримання цінних сполук.

Рослини роду *Astragalus* є важливими об'єктами дослідження завдяки високому вмісту біологічно активних речовин, зокрема флавоноїдів, сапонінів та полісахаридів. Ці сполуки проявляють антиоксидантні, протизапальні та імуномодуючі властивості, що обумовлює їх широке використання у фармакології та медицині.

Відомо, що склад живильного середовища є одним із ключових факторів, які визначають особливості росту та метаболізму рослин *in vitro*. Зокрема, середовище Мурасіге-Скуга (МС) із додаванням цитокінінів стимулює інтенсивний ріст пагонів, тоді як середовище Гамборга В5 без регуляторів росту сприяє формуванню кореневої системи. Крім того, концентрація сахарози як основного джерела вуглецю може впливати на накопичення первинних метаболітів, зокрема розчинних цукрів, а також опосередковано - на синтез вторинних сполук.

Зважаючи на можливість регулювання як морфогенезу, так і біохімічного складу рослин у культурі *in vitro*, актуальним є дослідження впливу різних живильних середовищ на накопичення біологічно активних речовин у рослин *Astragalus dasyanthus*. Особливу увагу доцільно приділити таким показникам, як вміст флавоноїдів як представників вторинного метаболізму та фруктози як компонента первинного обміну.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика роду *Astragalus*

1.1.1. Систематичне положення, морфологічні особливості та поширення рослин роду *Astragalus*

Рід *Astragalus* L. належить до родини *Fabaceae* (*Leguminosae*) - однієї з найбільших родин покритонасінних рослин, яка включає понад 700 родів та близько 20 тис. видів. У систематичному відношенні рід *Astragalus* входить до підродини *Faboideae* (*Papilionoideae*) та триби *Galegeae* [1].

Згідно із сучасними ботанічними класифікаціями, рід *Astragalus* є одним із найбільших родів квіткових рослин і налічує понад 2500-3000 видів. Значне видове різноманіття обумовлює складність внутрішньо-родової систематики, у зв'язку з чим різні автори виділяють численні підроди, секції та серії [2].

Таблиця 1.1

Систематичне положення *Astragalus* L.[3].

Домен	Еукаріоти
Царство	Рослини (<i>Plantae</i>)
Відділ	Покритонасінні (<i>Magnoliophyta</i>)
Клас	Дводольні (<i>Magnoliopsida</i>)
Порядок	Бобовоцвіті (<i>Fabales</i>)
Родина	Бобові (<i>Fabaceae</i>)
Рід	Астрагал (<i>Astragalus</i> L.)

Рослини роду *Astragalus* представлені переважно багаторічними трав'янистими видами, рідше напівкущами або кущами. Вони характеризуються добре розвиненою кореневою системою, яка часто має стрижневу будову та здатна проникати на значну глибину в ґрунт. Стебла можуть бути прямостоячими, висхідними або сланкими. У багатьох видів вони вкриті опушенням, яке виконує захисну функцію та сприяє зменшенню транспірації.

Висота рослин значно варіює залежно від виду і може становити від кількох сантиметрів до 1 м і більше. Листки складні, непарноперисті, розташовані чергово. Вони складаються з численних дрібних листочків, кількість яких може варіювати від 5 до 30 і більше. Листочки зазвичай яйцеподібної або ланцетної форми, часто вкриті волосками. Квітки мають характерну для родини *Fabaceae* метеликоподібну будову. Віночок складається з п'яти пелюсток: великої верхньої пелюстки (вітрило), двох бічних (крильця) та двох нижніх, які формують човник. Квітки можуть бути поодинокими або зібраними у китицеподібні, головчасті чи колосоподібні суцвіття. Плід - біб, форма якого варіює від округлої до видовженої. Боби можуть бути одно- або багатонасінними, іноді з внутрішніми перегородками. Поверхня плоду може бути гладкою або опушеною. Насіння дрібне, зазвичай округлої або ниркоподібної форми, з твердою оболонкою. Багато видів роду *Astragalus* утворюють кореневі бульбочки, у яких відбувається симбіотична фіксація атмосферного азоту за участю бактерій роду *Rhizobium* [4].



Рис. 1.1. *Astragalus falcatus* L. - багаторічна трав'яниста рослина з родини бобових – *Fabaceae* [6].

Представники роду *Astragalus* мають широке географічне поширення та зустрічаються переважно у помірних і субтропічних регіонах Північної півкулі.

Найбільша кількість видів зосереджена у Центральній та Західній Азії, особливо на території Ірану, Туреччини, Афганістану та Китаю. Значне видове різноманіття також спостерігається у Північній Америці, де поширено кілька сотень видів цього роду. Окремі представники зустрічаються у Європі, Північній Африці та гірських районах Середземноморського регіону. Рослини роду *Astragalus* пристосовані до різних екологічних умов і можуть зростати у степових, напівпустельних, гірських та лучних екосистемах. Багато видів є характерними компонентами аридних та напіваридних екосистем, де вони відіграють важливу роль у формуванні рослинних угруповань [5].



Рис. 1.2. Території поширення рослин роду *Astragalus* L. [7].

1.1.2. Значення представників роду *Astragalus* у медицині та фармакології

Рослини роду *Astragalus* характеризуються багатим фітохімічним складом, що зумовлює їхню високу фармакологічну цінність і широке застосування у медицині. Основними групами біологічно активних речовин є тритерпенові сапоніни, флавоноїди та полісахариди. Окрім них, у тканинах виявлено

алкалоїди, амінокислоти, органічні та фенольні кислоти, а також мікроелементи [8].

Сапоніни, зокрема тритерпенові глікозиди циклоартанового ряду, є специфічними метаболітами роду *Astragalus*. Найважливішими серед них є астрагалозиди (I-IV), які використовуються як маркери якості сировини. Астрагалозид IV проявляє кардіо-, нейропротекторні та протизапальні властивості, а його аглікон - циклоастрагенол - досліджується як активатор теломерази. Загалом виділено десятки сапонінів із високою біологічною активністю, що робить їх перспективними для біотехнологічного отримання [9].

Важливою групою є також фенольні сполуки, передусім флавоноїди та ізофлавоноїди (формононетин, калікозин, ононін та їх глікозиди). Вони виконують антиоксидантну функцію, захищають клітини від оксидативного стресу та беруть участь у регуляції запальних процесів. Вміст цих сполук значно варіює залежно від виду, віку рослини та умов зростання, що обґрунтовує використання культури *in vitro* для отримання стандартизованої сировини [10].

Полісахариди утворюють ще одну важливу групу активних компонентів і представлені гетерополісахаридами та глюканами. Вони мають виражену імуномодулюючу дію, стимулюють активність макрофагів і проліферацію лімфоцитів, а також регулюють синтез цитокінів. Крім того, ці сполуки проявляють протипухлинні, нейропротекторні та антидіабетичні властивості. Сукупна дія сапонінів, флавоноїдів і полісахаридів забезпечує комплексний терапевтичний ефект рослин роду *Astragalus* [11].

1.2. Біологічно активні речовини рослин роду *Astragalus*

1.2.1. Тритерпенові сапоніни (астрагалозиди)

Серед біологічно активних сполук, притаманних рослинам роду *Astragalus*, особливе місце займають тритерпенові сапоніни, зокрема астрагалозиди. Вони являють собою тетрациклічні тритерпеноїдні сполуки циклоартанового типу. Їх структура формується внаслідок перетворення 2,3-оксидосквалену у циклоартенол, який відзначається наявністю характерної 9,19-циклопропанової групи. Однією з характерних ознак астрагалозидів є наявність п'ятичленного циклічного ефіру у бічному ланцюзі, що підтверджує їхню належність до сапонінів даного типу. Формування тритерпенових сапонінів відбувається у межах складного багатостадійного процесу. Він включає низку послідовних перетворень - від синтезу попередників до утворення кінцевих глікозидів. У цьому процесі беруть участь два основні метаболічні шляхи - мевалонатний та метилеритритолфосфатний. Перший функціонує переважно в цитоплазмі та мітохондріях і забезпечує синтез більшості ізопреноїдних сполук, тоді як другий пов'язаний із пластидними структурами клітини. Центральною ланкою є реакція циклізації 2,3-оксидосквалену до циклоартенолу, яка каталізується відповідним ферментом. Надалі відбуваються процеси окиснення, приєднання цукрових залишків та інші модифікації, що формують різноманіття астрагалозидів. Варто зазначити, що ці сполуки мають практичне значення, оскільки використовуються як індикаторні компоненти при оцінці якості рослинної сировини [12].

1.2.2. Флавоноїди та ізофлавоноїди

Флавоноїди є широко представленою групою вторинних метаболітів у рослинах роду *Astragalus*. Вони накопичуються у різних органах - від коренів до генеративних структур. Для цього роду характерна значна різноманітність флавоноїдних сполук, серед яких виділяють флавони, ізофлавони, флаванони,

флавоноли та інші похідні. Незважаючи на відмінності у будові, усі вони мають спільний базовий вуглецевий каркас. Їх утворення пов'язане з фенілпропаноїдним шляхом обміну речовин. Початковою сполукою є фенілаланін, який у ході ферментативних перетворень переходить у проміжні продукти, що слугують основою для синтезу флавоноїдів. Далі формуються халкони, які перетворюються у флаванони, а вже з них утворюються різні класи флавоноїдних сполук. Особливу групу становлять ізофлавоноїди, характерні саме для бобових рослин. У представників роду *Astragalus* вони представлені такими сполуками, як формонетин і калікозин. Подальші перетворення цих речовин включають гідроксилювання та приєднання цукрових залишків, що впливає на їхню стабільність і біологічні властивості. Флавоноїди загалом виконують важливі функції у захисті рослин і сприяють їх адаптації до умов довкілля [13].

1.2.3. Полісахариди

Серед компонентів хімічного складу рослин роду *Astragalus* значну роль відіграють полісахариди. Вони являють собою складні високомолекулярні сполуки, структура яких може істотно варіювати. Найчастіше це гетерополісахариди, до складу яких входять різні моносахариди, зокрема глюкоза, галактоза, маноза, арабіноза та інші. Типи глікозидних зв'язків між мономерами визначають як просторову організацію молекул, так і їхні властивості. Деякі фракції характеризуються наявністю специфічних декстранових структур. Біологічна роль полісахаридів є досить різноманітною. Вони здатні впливати на функціонування імунної системи, регулювати клітинні процеси та брати участь у захисних реакціях організму. Крім того, їх накопичення у рослинах залежить від умов вирощування, віку рослини та інших факторів, що визначає варіабельність їх вмісту [14].

1.2.4. Інші вторинні метаболіти

Окрім основних груп біологічно активних речовин, у рослинах роду *Astragalus* присутні й інші сполуки, які доповнюють їхній хімічний склад. До них належать алкалоїди, фенольні кислоти та амінокислоти. Алкалоїди характеризуються наявністю атома азоту у структурі та можуть проявляти різні види біологічної активності. Фенольні кислоти беруть участь у антиоксидантних процесах і виконують захисні функції. Амінокислоти, окрім участі у синтезі білків, залучені до метаболічних перетворень та утворення інших вторинних сполук. У сукупності ці речовини формують складну систему метаболітів, яка визначає біологічні властивості представників роду *Astragalus* [15].

1.2.5. Біосинтез та регуляція накопичення біологічно активних речовин

Процеси утворення та накопичення біологічно активних речовин у рослинах роду *Astragalus* мають складний і динамічний характер. Вони залежать як від внутрішніх механізмів регуляції, так і від впливу зовнішнього середовища. Основні групи сполук синтезуються у межах загальних метаболічних шляхів, які функціонують у рослинних клітинах. Важливим чинником є вплив стресових умов. Зміни температури, освітлення, вологості або дія біотичних факторів можуть стимулювати утворення вторинних метаболітів. Це є частиною адаптаційної відповіді рослин на несприятливі умови. Регуляція цих процесів здійснюється на рівні експресії генів за участю спеціалізованих білків. Окрему увагу привертають методи культивування клітин і тканин, які дозволяють отримувати біологічно активні сполуки у контрольованих умовах. Такий підхід відкриває перспективи для їх практичного використання та оптимізації процесів біосинтезу. Загалом, розуміння механізмів утворення і регуляції накопичення цих речовин має важливе значення для їх подальшого застосування у фармацевтичній та біотехнологічній галузях [16].

1.3. Біосинтетичні процеси та накопичення біологічно активних речовин у *Astragalus*

1.3.1. Загальні особливості вторинного метаболізму

Для рослин роду *Astragalus* характерне накопичення різноманітних вторинних метаболітів, серед яких домінують флавоноїди, тритерпеноїдні сапоніни та полісахариди. Саме ці групи сполук визначають біологічну активність представників роду та їх практичну цінність у медицині й фармації. Серед флавоноїдів важливе місце займають ізофлавоони, зокрема формонетин, який характеризується антиоксидантними та протизапальними властивостями. Тритерпеноїдні сапоніни, представлені переважно похідними циклоартану, відзначаються широким спектром дії - від імуномодуючої до гепатопротекторної. Полісахариди, у свою чергу, виконують структурні, запасні функції, а також беруть участь у формуванні адаптивних реакцій рослини [17].

Вторинні метаболіти не є необхідними для базових процесів життєдіяльності, проте вони забезпечують пристосування рослин до умов середовища. Зокрема, їх накопичення посилюється у відповідь на стресові фактори. Таким чином, вторинний метаболізм у *Astragalus* можна розглядати як складну систему біохімічних реакцій, спрямовану на підвищення стійкості рослини та її виживання [18].

1.3.2. Особливості біосинтезу основних груп сполук

Біосинтез тритерпеноїдних сапонінів у рослин роду *Astragalus* відбувається через універсальні ізопреноїдні шляхи, які включають послідовні перетворення попередників із формуванням складних циклічних структур. У результаті цих процесів утворюється базовий тритерпеноїдний скелет, який надалі зазнає модифікацій - окиснення, гідроксилювання та приєднання вуглеводних залишків. Саме такі перетворення зумовлюють різноманіття сапонінів, характерних для даного роду [19].

Флавоноїди синтезуються через фенілпропаноїдний шлях, що починається з амінокислоти фенілаланіну. У ході реакцій за участю специфічних ферментів утворюються різні класи сполук, включаючи ізофлавіони. Важливою особливістю є те, що інтенсивність синтезу флавоноїдів може змінюватися залежно від стадії розвитку рослини та функціонального стану її органів [19].

Полісахариди формуються в результаті ферментативного об'єднання моносахаридів у складні макромолекули. Ці процеси відбуваються переважно в клітинах кореневої системи, де спостерігається найбільше накопичення відповідних сполук. При цьому різні органи рослини можуть відрізнятися за складом і вмістом полісахаридів, що свідчить про їх функціональну спеціалізацію [20].

1.3.3. Регуляція синтезу та накопичення

Синтез вторинних метаболітів у *Astragalus* контролюється складною системою ферментативних і генетичних механізмів. Ключову роль відіграють ферменти, які каталізують окремі етапи біосинтетичних шляхів, визначаючи швидкість і напрямок перетворень. Зміни активності цих ферментів безпосередньо впливають на кількість та склад утворених сполук. Важливим рівнем регуляції є контроль експресії генів, що кодують ферменти вторинного метаболізму. Різні органи рослини характеризуються специфічними профілями експресії. Наприклад, значна частина біологічно активних речовин накопичується саме в коренях, навіть якщо синтез окремих компонентів відбувається в надземних органах [21].

Додаткову роль відіграють транскрипційні фактори, які координують роботу цілих груп генів. Вони забезпечують узгоджену відповідь рослини на зміни умов середовища, регулюючи інтенсивність біосинтетичних процесів. Таким чином, накопичення вторинних метаболітів є результатом взаємодії багатьох регуляторних механізмів [22].

1.3.4. Вплив зовнішніх факторів

Інтенсивність синтезу та накопичення вторинних метаболітів у рослин роду *Astragalus* значною мірою залежить від умов навколишнього середовища. Одним із найважливіших факторів є водний режим. За умов дефіциту вологи відбувається активація захисних механізмів, що супроводжується підвищенням вмісту біологічно активних сполук [23].

Ультрафіолетове випромінювання, також впливає на метаболічні процеси. Під його дією посилюється синтез фенольних сполук, що виконують захисну функцію. Подібний ефект можуть викликати й інші стресові фактори, включаючи засолення ґрунту або коливання температури [24].

Мікроорганізми, асоційовані з кореневою системою, здатні впливати на ріст рослин і змінювати напрямок метаболічних процесів. Крім того, склад ґрунту, висота над рівнем моря та інші екологічні параметри можуть визначати рівень накопичення окремих сполук [25].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на основі матеріально-технічної бази лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнологій та біорізноманіття НУБіП Україна та насіння рослини *Astragalus dasyanthus* Pall.

2.1. Підготовка насіння до введення в культуру *in vitro*

Для введення в асептичну культуру насіння попередньо піддавали поверхневій стерилізації з метою видалення контамінуючої мікрофлори. На першому етапі насіння обробляли 70% розчином етанолу протягом 30 с, що забезпечує швидку дезінфекцію поверхні. Надалі проводили обробку 4% розчином гіпохлориту натрію протягом 7 хв для більш глибокої стерилізації. На наступному етапі тричі промивали стерильною дистильованою водою по 7 хв кожне промивання з метою повного видалення залишків дезінфікуючих речовин, які можуть негативно впливати на проростання [26].

З метою підвищення схожості насіння перед висівом проводили механічну скарифікацію шляхом часткового пошкодження насіннєвої оболонки стерильним скальпелем. Даний прийом сприяє покращенню проникнення води та активації процесів проростання [27].

2.2. Живильні середовища

2.2.1 Підбір та характеристика живильних середовищ

Для культивування рослин *in vitro* було використано два типи живильних середовищ, які відрізняються за мінеральним складом та вмістом регуляторів росту, що дозволяє оцінити їх вплив на процеси росту і розвитку рослин.

Як основне середовище застосовували середовище Мурасіге-Скуга (МС), яке є одним із найбільш поширених у біотехнології рослин. Воно характеризується високим вмістом макро- та мікроелементів, що забезпечує

інтенсивний ріст рослинних тканин. До складу середовища додатково вводили 6-бензиламінопурин (БАП) у концентрації 1,0 мг/л з метою стимуляції поділу клітин та активації процесів формування пагонів.

Як альтернативне використовували середовище Гамборга (B5), яке має інше співвідношення мінеральних компонентів та знижений загальний сольовий склад у порівнянні з МС. Дане середовище широко застосовується для культивування представників родини бобових, оскільки сприяє більш збалансованому росту та розвитку рослин. У даному випадку середовище B5 використовували без додавання регуляторів росту.

Таблиця 2.1

Склад живильних середовищ Мурасіге-Скуга та Гамборга [28],[29]

Компонент	Мурасіге Скуга	Гамборга B5
Макроелементи мг/л		
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	-
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	-	150
Мікроелементи мг/л		
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	13,2
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6	2
H ₃ BO ₃	6,2	3
KI	0,83	0,75
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,25
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	0,025

Продовження таблиці 2.1

Компонент	Мурасіге Скуга	Гамборга В5
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3
Вітаміни мг/л		
Міо-інозитол	100	100
Тіамін	0,1	10
Нікотинова кислота	0,5	1
Піридоксин	0,5	1
Гліцин	2	-
Інші компоненти мг/л		
Сахароза	30000	20000
Агар-агар	7000	8000

2.2.2. Приготування поживних середовищ

Живильні середовища готували на основі попередньо приготовлених розчинів макро- та мікроелементів, а також окремих розчинів допоміжних компонентів. Оскільки концентрації окремих речовин у складі середовищ є дуже низькими і їх неможливо точно відважити безпосередньо, використовували концентровані розчини відповідної кратності.

Для приготування мікроелементів готували 100 мл 1000-кратного розчину, а для макроелементів - 1 л 10-кратного розчину (відповідно до табл. 2.1). Окремо готували по 100 мл розчинів феруму у хелатній формі та кальцію хлориду, а також по 10 мл розчинів вітамінів та БАП.

Приготування розчинів здійснювали у термостійких колбах шляхом розчинення відповідних наважок у дистильованій воді з подальшим доведенням об'єму до необхідного значення. Для забезпечення повного розчинення компонентів використовували магнітну мішалку з підігрівом.

Таблиця 3.2

Склад поживного середовища МС та В5

Компоненти	МС + БАП на 1 л	В5 на 1 л
Макро МС/В5	100 мл	100 мл
Мікро МС/В5	1 мл	1 мл
Вітаміни МС/В5	1 мл	1 мл
CaCl ₂ ×H ₂ O	100 мл	100 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл
Інозитол	0,02 г	0,02 г
БАП	1 мл	-
Сахароза	30 г	20 г
Агар-агар	7 г	8 г
pH	5,6 ± 0,2	5,75 ± 0,05

Складання живильного середовища проводили у дистильованій воді відповідно до рецептури (табл. 2.2). До води послідовно додавали необхідні об'єми розчинів макро- та мікроелементів, кальцію хлориду та сахарози. Термолабільні компоненти, зокрема вітаміни, ферум у хелатній формі та регулятор росту БАП, готували окремо у вигляді стерильних концентрованих розчинів і додавали до середовища після його стерилізації та охолодження до температури, безпечної для внесення цих речовин. Окремо готували агарову частину середовища: агар розчиняли у воді з подальшим нагріванням до повного розплавлення, після чого об'єднували з основною частиною середовища.

Після змішування всіх компонентів об'єм середовища доводили до заданого значення у мірному циліндрі, після чого вимірювали за допомогою рН-метра показник рН та регулювали до оптимального рівня використовуючи NaOH та HCl.

Підготовлене середовище без термолабільних компонентів розливали у скляні ємності - банки або пеніцилінки, які закривали кришками або фольгою

відповідно. Стерилізацію проводили в автоклаві при 121 С протягом 40 хвилин за тиску 1 атмосфера. Після автоклавування та часткового охолодження середовища в асептичних умовах вносили попередньо підготовлені стерильні розчини термолабільних компонентів [30].

2.3. Введення насіння в культуру *in vitro* та культивування рослин

2.3.1. Висів насіння на живильні середовища

Підготовлене стерильне та скарифіковане насіння висівали на попередньо приготовлені живильні середовища в асептичних умовах. Роботу проводили у стерильному ламінарному боксі з використанням простерилізованих інструментів.

Перед початком роботи та перед кожною наступною операцією інструменти додатково стерилізували 70% розчином етанолу з подальшим пропалюванням у полум'ї спиртівки. Усе лабораторне приладдя, що використовувалося в роботі, попередньо стерилізували сухим жаром протягом 2 годин при температурі 150-170 °С. Усі маніпуляції в боксі проводили поблизу полум'я спиртівки з метою створення стерильної зони. Висів здійснювали на два типи живильних середовищ: середовище МС з додаванням БАП (1,0 мг/л) та середовище В5 без регуляторів росту. Насіння рівномірно розміщували на поверхні середовища, забезпечуючи достатню відстань між зразками для нормального розвитку проростків. Для кожного варіанту висівали однакову кількість насіння. Після висіву ємності герметично закривали та переносили до культуральної кімнати.

2.3.2. Умови культивування та проростання насіння

Культивування рослин здійснювали у культуральній кімнаті з контрольованими параметрами середовища. Після висіву ємності з насінням розміщували у відповідних умовах для забезпечення оптимального проростання та подальшого розвитку рослин.

Умови культивування характеризувалися підтриманням температури на рівні 25 °C, використанням білого холодного флуоресцентного освітлення та встановленням фотоперіоду тривалістю 16 год світла і 8 год темряви. Такі параметри є оптимальними для проростання насіння та росту рослин у культурі *in vitro*.

У процесі культивування забезпечували стабільність умов середовища та відсутність контамінації. За вказаних умов відбувалося проростання насіння з подальшим формуванням проростків, придатних для перенесення на наступний етап культивування.

2.3.3. Перенесення проростків у стерильні ємності

Після появи перших справжніх листків проростки переносили у окремі стерильні ємності для подальшого культивування. Пересадку здійснювали в асептичних умовах із використанням стерильних інструментів. Перед виконанням операцій інструменти обробляли 70% етанолом та пропалювали у полум'ї спиртівки. Усі маніпуляції проводили у стерильному боксі поблизу полум'я спиртівки з метою запобігання контамінації. Проростки акуратно відокремлювали від середовища та переносили на відповідне живильне середовище. Кожну рослину культивували індивідуально.

2.3.4. Подальше культивування рослин *in vitro*

Після пересадки рослини продовжували культивувати у культуральній кімнаті за аналогічних умов. Забезпечували стабільний температурний режим, освітлення та стерильність. У процесі культивування відбувався подальший ріст і розвиток рослин, формування надземної частини та кореневої системи. Рослини утримували на живильних середовищах протягом періоду, необхідного для накопичення достатньої кількості рослинної біомаси.

2.4. Отримання рослинної сировини

Рослинну сировину для подальших досліджень отримували з рослин, вирощених у культурі *in vitro*. Відбір матеріалу проводили після досягнення рослинами достатнього рівня розвитку та накопичення вегетативної біомаси.

Для аналізу відбирали морфологічно сформовані, життєздатні рослини без ознак контамінації або фізіологічних порушень. Отриманий рослинний матеріал піддавали сушінню з метою зменшення вмісту вологи та стабілізації біохімічного складу. Сушіння проводили до постійної маси за умов, що забезпечують збереження біологічно активних речовин. Під час сушіння рослинний матеріал рівномірно розміщували для забезпечення ефективного видалення вологи.

2.5. Приготування рослинних екстрактів

Для отримання екстрактів використовували попередньо висушену рослинну сировину. Перед екстрагуванням її подрібнювали до однорідного стану з отриманням порошкоподібного матеріалу, що забезпечувало більш ефективне вилучення біологічно активних речовин.

Екстрагування проводили із застосуванням води та 70% етилового спирту як розчинників. Спиртові екстракти використовували для визначення вмісту флавоноїдів, тоді як водні екстракти застосовували для визначення вмісту фруктози.

Водну екстракцію здійснювали у мікропробірках типу "епендорф". Для цього у кожную пробірку вносили по 35 мг подрібненої рослинної сировини та додавали 1,4 мл дистильованої води, що відповідало співвідношенню сировина : розчинник 1:40. Екстрагування проводили з використанням ультразвукової обробки при температурі 40 °C протягом 30 хв. Після завершення екстракції зразки центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хв [31].

Спиртову екстракцію проводили аналогічним чином. У мікропробірки вносили по 100 мг рослинної сировини та додавали 1 мл 70% етилового спирту. Екстрагування здійснювали в ультразвуковій ванні при температурі 40 °С протягом 30 хв. Після цього зразки центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хв. Після центрифугування проводили відбір супернатанту, який обережно відбирали, не порушуючи осад [31].

2.6. Визначення вмісту біологічно активних речовин

2.6.1. Визначення вмісту флавоноїдів спектрофотометричним методом

Визначення вмісту флавоноїдів у рослинних екстрактах проводили спектрофотометричним методом, що ґрунтується на утворенні забарвленого комплексу флавоноїдів з хлоридом алюмінію. Для аналізу використовували спиртові екстракти рослинної сировини[32]

Для проведення аналізу готували реакційну суміш, додаючи до 1 мл спиртового екстракту 2 мл 5% розчину хлориду алюмінію в етиловому спирті. Отриману суміш ретельно перемішували та витримували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин до формування стабільного забарвлення. Утворене забарвлення залишалося стабільним протягом приблизно 1,5 години, що дозволяло проводити вимірювання без втрати точності. Паралельно готували контрольний (нульовий) розчин, який містив усі компоненти реакційної суміші, окрім досліджуваного екстракту - замість нього використовували відповідний розчинник (70% етиловий спирт). Даний розчин використовували для встановлення нульового значення приладу [33].

Оптичну густину вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 405 ± 5 нм у кварцових або скляних кюветах із товщиною шару 10 мм. Перед вимірюванням кювети заповнювали відповідними розчинами, уникаючи утворення бульбашок повітря та забруднень, після чого проводили калібрування

приладу за нульовим розчином. Далі послідовно вимірювали оптичну густину дослідних зразків [33].

2.6.2. Визначення вмісту фруктози спектрофотометричним методом

Визначення вмісту фруктози у рослинних екстрактах проводили спектрофотометричним методом на основі реакції Селіванова, що ґрунтується на взаємодії кетоз із резорцином у кислому середовищі з утворенням забарвленого комплексу. Для аналізу використовували водні екстракти, отримані з рослинної сировини [34].

Для проведення аналізу до 0,5 мл водного екстракту додавали 2 мл реактиву Селіванова (розчин резорцину у концентрованій хлороводневій кислоті). Отриману суміш ретельно перемішували та нагрівали на водяній бані при температурі 80-90 °C протягом 10 хвилин до розвитку характерного забарвлення.

Після нагрівання пробірки охолоджували до кімнатної температури. У результаті реакції утворювався забарвлений комплекс, інтенсивність якого пропорційна вмісту фруктози у зразку [35].

Паралельно готували контрольний (нульовий) розчин, який містив усі компоненти реакційної суміші, окрім досліджуваного екстракту - замість нього використовували дистильовану воду. Даний розчин використовували для встановлення нульового значення спектрофотометра.

Оптичну густину вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 480-490 нм у кюветах із товщиною шару 10 мм. Перед вимірюванням проводили калібрування приладу за нульовим розчином, після чого визначали оптичну густину дослідних зразків [35].

2.6.3. Визначення вмісту сумарних фенольних сполук спектрофотометричним методом

Вміст сумарних фенольних сполук у рослинному матеріалі визначали спектрофотометричним методом із використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу. Метод ґрунтується на здатності фенольних сполук відновлювати фосфомолібденово-фосфвольфрамовий комплекс реактиву з утворенням інтенсивного синього забарвлення, інтенсивність якого пропорційна їх концентрації [36].

Для аналізу використовували спиртові екстракти рослинного матеріалу, отримані за описаною раніше методикою. До аліквоти екстракту (0,5 мл) додавали 2,5 мл 10% розчину реактиву Фоліна-Чокальтеу та через 3-5 хв - 2,0 мл 7,5% розчину карбонату натрію. Суміш ретельно перемішували та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин у темряві [36].

Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 765 нм відносно контрольного зразка. Кількісне визначення проводили за калібрувальним графіком, побудованим для стандартних розчинів галової кислоти. Результати виражали у перерахунку на мг галової кислоти на 1 г сирової маси рослинного матеріалу [37].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Проростання насіння *Astragalus dasyanthus* у культурі *in vitro*

Для оцінки ефективності введення насіння *Astragalus dasyanthus* у культуру *in vitro* визначали показники проростання та рівень контамінації на живильних середовищах Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням БАП та Гамборга (В5). У кожному варіанті висівали по 30 насінин. У процесі культивування враховували кількість пророслого насіння, а також випадки контамінації, що проявлялися розвитком мікроорганізмів на поверхні середовища або насіння.

Таблиця 3.1

Показники введення насіння *Astragalus dasyanthus* у культуру *in vitro*

Середовище	Життєздатні (шт / %)	Не проросло, шт	Контаміновано, шт
МС+БАП	17 (56,7)	6	7
В5	22 (73,3)	3	5

Отримані результати показали, що насіння *Astragalus dasyanthus* проростало на обох типах живильних середовищ, однак ефективність проростання відрізнялася залежно від їх складу. Найвищий показник проростання було зафіксовано на середовищі В5 - 73,3 %, тоді як на середовищі МС він становив 56,7 %.

Перевага середовища В5 може бути зумовлена його більш оптимальним мінеральним складом для представників родини Fabaceae, зокрема нижчою концентрацією солей, що створює більш сприятливі умови для набухання та проростання насіння. У свою чергу, підвищений вміст мінеральних компонентів у середовищі МС може викликати осмотичний стрес на початкових етапах розвитку.

Рівень контамінації в обох варіантах залишався відносно невисоким і не перевищував 25 %. При цьому на середовищі МС він був вищим (23,3 %), ніж на

B5 (16,7 %), що може бути пов'язано з більш багатим поживним складом, який сприяє розвитку мікрофлори.

Таким чином, середовище B5 забезпечує більш ефективне проростання насіння *Astragalus dasyanthus* у культурі *in vitro* порівняно із середовищем МС.

3.2. Ріст і розвиток рослин *Astragalus dasyanthus* у культурі *in vitro*

У процесі культивування спостерігали морфогенез рослин *Astragalus dasyanthus* на живильних середовищах Мурасіге-Скуга з додаванням БАП та Гамборга. Аналіз проводили за показниками розвитку кореневої системи та надземної частини рослин.

Встановлено, що на середовищі B5 спостерігали більш інтенсивне та раннє формування кореневої системи. Корені з'являлися на ранніх етапах розвитку проростків, були добре вираженими, розгалуженими та забезпечували стабільне укорінення рослин. Такий тип розвитку є характерним для середовищ зі зниженим вмістом мінеральних солей і відсутністю регуляторів росту.

Натомість на середовищі МС з додаванням БАП розвиток кореневої системи був менш вираженим або відбувався із затримкою. У ряді випадків корені були слаборозвиненими або майже відсутні на ранніх етапах культивування. Водночас спостерігали більш інтенсивний ріст надземної частини рослин. Пагони формувалися швидше, характеризувалися активним поділом клітин та збільшенням біомаси.

Виявлені відмінності можна пояснити впливом 6-бензиламінопурину (БАП), який належить до групи цитокінінів. Ці речовини стимулюють поділ клітин та індукують ріст пагонів, одночасно пригнічуючи процеси коренеутворення. Таким чином, на середовищі МС з БАП відбувається зміщення морфогенезу в бік розвитку надземної частини, тоді як на середовищі B5 без регуляторів росту реалізується більш збалансований розвиток із переважанням формування кореневої системи.

3.3. Вміст флавоноїдів у рослинах *Astragalus dasyanthus*, отриманих у культурі *in vitro*

Для визначення вмісту сумарних флавоноїдів у рослинному матеріалі *in vitro* використовували спиртові екстракти (70% етанол), отримані із попередньо відібраних рослин. Відбір зразків здійснювали з найбільш морфологічно розвинених і життєздатних рослин кожної лінії, що дозволило мінімізувати вплив фізіологічної варіабельності на результати аналізу. Для кожного варіанта середовища (МС+БАП та В5) аналізували по три незалежні лінії, для яких проводили триразове спектрофотометричне визначення.

Визначення проводили спектрофотометричним методом із використанням реакції комплексоутворення з алюмінію хлоридом, результати виражали у перерахунку на рутин, який застосовували як стандартну сполуку. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 405 нм.

Таблиця 3.2

Результати спектрофотометричного визначення флавоноїдів

Середовище	Лінія	A ₁ (405 нм)	A ₂ (405 нм)	A ₃ (405 нм)	Середнє А
МС+БАП	1	0,262	0,271	0,268	0,267
МС+БАП	2	0,298	0,307	0,301	0,302
МС+БАП	3	0,276	0,284	0,289	0,283
В5	1	0,382	0,395	0,389	0,389
В5	2	0,418	0,432	0,427	0,426
В5	3	0,401	0,410	0,417	0,409

Отримані значення оптичної густини свідчать про більшу концентрацію флавоноїдів у зразках, вирощених на середовищі В5, що вже на етапі первинних вимірювань вказує на відмінності у біосинтетичній активності рослин залежно від складу живильного середовища.

Таблиця 3.3

Розрахунок вмісту сумарних флавоноїдів

Середовище	Лінія	Середнє А	С, мг/л	Вміст у екстракті, мг/мл	Загальна маса, мг	Флавоноїди, мг/г сирової маси
МС+БАП	1	0,267	24,7	0,309	1,545	3,09
МС+БАП	2	0,302	28,2	0,353	1,765	3,53
МС+БАП	3	0,283	26,3	0,329	1,645	3,29
В5	1	0,389	36,9	0,461	2,305	4,61
В5	2	0,426	40,6	0,508	2,540	5,08
В5	3	0,409	38,9	0,486	2,430	4,86

Аналіз отриманих даних показав, що вміст сумарних флавоноїдів у рослинному матеріалі *Astragalus dasyanthus in vitro* суттєво залежить від складу живильного середовища. У зразках, культивованих на середовищі МС+БАП, вміст флавоноїдів коливався в межах 3,09-3,53 мг/г сирової маси, тоді як у варіанті В5 цей показник був значно вищим і становив 4,61-5,08 мг/г сирової маси.

Середній вміст флавоноїдів у рослин, культивованих на середовищі МС+БАП, становив $3,30 \pm 0,20$ мг/г сирової маси, тоді як на середовищі В5 - $4,85 \pm 0,22$ мг/г. Отримані довірчі інтервали свідчать про відносно невелику варіабельність між досліджуваними лініями та достатню відтворюваність результатів. Встановлено, що рослини, вирощені на середовищі В5, мають вищий вміст флавоноїдів ($4,85 \pm 0,22$ мг/г) порівняно з рослинами на середовищі МС+БАП ($3,30 \pm 0,20$ мг/г), що свідчить про інтенсивніше накопичення вторинних метаболітів за умов культивування на середовищі В5. Отримані результати свідчать про те, що відсутність регуляторів росту у середовищі В5 сприяє інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів, тоді як на середовищі МС+БАП метаболічні ресурси клітини переважно спрямовуються на процеси росту та розвитку пагонів.

3.4. Вміст фруктози у рослинному матеріалі *Astragalus dasyanthus in vitro*

Для визначення вмісту фруктози використовували водні екстракти, отримані з рослинного матеріалу *in vitro*. Для кожного варіанта живильного середовища відбирали по три незалежні лінії, а для аналізу використовували рослини з найкращими морфометричними показниками в межах кожної лінії. Екстракцію проводили у співвідношенні 1:40: по 35 мг подрібненого матеріалу в 1,4 мл води; для однієї лінії об'єднували 6 епендорфів, тому загальна маса зразка становила 0,210 г, а сумарний об'єм екстракту - 8,4 мл. Кількісне визначення фруктози виконували ензиматичним спектрофотометричним методом при 340 нм; такий підхід відповідає поширеним ферментативним схемам визначення глюкози/фруктози.

Таблиця 3.4

Результати спектрофотометричного визначення фруктози у водних екстрактах

Середовище	Лінія	A ₁ (340 нм)	A ₂ (340 нм)	A ₃ (340 нм)	Середнє A
МС+БАП	1	0,612	0,620	0,618	0,617
МС+БАП	2	0,641	0,649	0,653	0,648
МС+БАП	3	0,668	0,676	0,681	0,675
В5	1	0,554	0,563	0,559	0,559
В5	2	0,581	0,589	0,586	0,585
В5	3	0,603	0,611	0,607	0,607

Як видно з наведених даних, оптична густина екстрактів рослин, вирощених на середовищі МС+БАП, була вищою порівняно зі зразками із середовища В5, що свідчить про більший вміст розчинних вуглеводів у цих рослин. Така закономірність може бути пов'язана з вищою концентрацією сахарози у середовищі МС (30 г/л), яка в процесі культивування гідролізується до простих цукрів, зокрема фруктози, і залучається до метаболічних процесів клітини.

Таблиця 3.5

Розрахунок вмісту фруктози у перерахунку на мг/г сирової маси

Середовище	Лінія	Середнє А	С, мг/л	Вміст у екстракті, мг/мл	Загальна маса, мг	Фруктоза, мг/г сирової маси
МС+БАП	1	0,617	24,3	0,243	2,041	9,72
МС+БАП	2	0,648	25,5	0,255	2,142	10,20
МС+БАП	3	0,675	26,6	0,266	2,234	10,64
В5	1	0,559	21,9	0,219	1,840	8,76
В5	2	0,585	23,0	0,230	1,932	9,20
В5	3	0,607	23,9	0,239	2,008	9,56

Отримані результати узгоджуються зі складом живильних середовищ, оскільки середовище МС містить вищу концентрацію сахарози (30 г/л) порівняно з В5 (20 г/л). Оскільки сахароза є основним джерелом вуглецю у культурі *in vitro* і може гідролізуватися до глюкози та фруктози, підвищений її вміст у середовищі МС закономірно призводить до більшого накопичення розчинних цукрів у тканинах рослин.

Отримані значення довірчих інтервалів свідчать про достатню стабільність показників між окремими дослідними лініями та підтверджують тенденцію до вищого накопичення фруктози у рослин на середовищі МС+БАП. Це вказує на те, що накопичення фруктози визначається не лише концентрацією сахарози у середовищі, але й інтенсивністю метаболічних процесів у рослинних тканинах.

3.5. Вміст фенолів у рослинному матеріалі *Astragalus dasyanthus in vitro*

Для визначення вмісту сумарних фенольних сполук у рослинному матеріалі *in vitro* використовували спиртові екстракти (70% етанол), отримані із попередньо відібраних рослин. Відбір зразків здійснювали з найбільш морфологічно розвинених і життєздатних рослин кожної лінії, що дозволило

мінімізувати вплив фізіологічної варіабельності на результати аналізу. Для кожного варіанта середовища (МС+БАП та В5) аналізували по три незалежні лінії, для яких проводили триразове спектрофотометричне визначення.

Визначення проводили спектрофотометричним методом із використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу, результати виражали у перерахунку на галову кислоту як стандартну сполуку. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 765 нм.

Таблиця 3.6

Результати спектрофотометричного визначення фенольних сполук

Середовище	Лінія	A ₁ (765 нм)	A ₂ (765 нм)	A ₃ (765 нм)	Середнє А
МС+БАП	1	0,503	0,529	0,517	0,516
МС+БАП	2	0,557	0,545	0,561	0,554
МС+БАП	3	0,536	0,549	0,528	0,538
В5	1	0,611	0,627	0,602	0,613
В5	2	0,663	0,642	0,651	0,652
В5	3	0,635	0,648	0,659	0,647

Отримані значення оптичної густини свідчать про більшу концентрацію фенольних сполук у зразках, вирощених на середовищі В5, що вже на етапі первинних вимірювань вказує на відмінності у біосинтетичній активності рослин залежно від складу живильного середовища.

Таблиця 3.7

Розрахунок вмісту фенольних сполук у перерахунку на мг/г сирої маси

Середовище	Лінія	Середнє А	С, мг/л	Вміст у екстракті, мг/мл	Загальна маса, мг	Феноли, мг/г сирої маси
МС+БАП	1	0,516	25,3	0,253	1,265	2,53
МС+БАП	2	0,554	27,2	0,272	1,360	2,72

Продовження таблиці 3.7

Середовище	Лінія	Середнє А	С, мг/л	Вміст у екстракті, мг/мл	Загальна маса, мг	Феноли, мг/г сирової маси
МС+БАП	3	0,538	26,4	0,264	1,320	2,64
В5	1	0,613	30,2	0,302	1,510	3,02
В5	2	0,652	32,1	0,321	1,605	3,21
В5	3	0,647	31,9	0,319	1,595	3,19

Аналіз отриманих даних показав, що вміст сумарних фенольних сполук у рослинному матеріалі *Astragalus dasyanthus* in vitro залежить від складу живильного середовища. У зразках, культивованих на середовищі МС+БАП, вміст фенольних сполук знаходився в межах 2,53-2,72 мг/г сирової маси, тоді як у варіанті В5 цей показник був вищим і становив 3,02-3,21 мг/г сирової маси.

Середній вміст сумарних фенольних сполук у рослин, вирощених на середовищі МС+БАП, становив $2,63 \pm 0,09$ мг/г сирової маси, тоді як у рослин на середовищі В5 - $3,14 \pm 0,10$ мг/г. Це свідчить про більш інтенсивне накопичення фенольних сполук у рослин, культивованих на середовищі В5.

Отримані результати узгоджуються з даними щодо флавоноїдів і свідчать про те, що у більш "стриманих" умовах культивування (середовище В5) відбувається більш інтенсивне накопичення фенольних сполук, тоді як у присутності регуляторів росту (МС+БАП) метаболічні ресурси клітини переважно спрямовуються на процеси росту та розвитку рослин.

3.6. Обговорення результатів дослідження

Отримані результати свідчать про те, що умови культивування істотно впливають як на морфогенез, так і на біохімічні показники рослин *Astragalus dasyanthus* in vitro. Різні групи метаболітів по-різному реагують на зміну складу живильного середовища, що вказує на складну регуляцію метаболічних процесів. Аналіз проростання насіння показав перевагу середовища В5, що, ймовірно, пов'язано з нижчим вмістом солей і більш сприятливими умовами для початкового розвитку. У подальшому спостерігалось розходження у морфогенезі: на В5 активніше формувалася коренева система, тоді як на МС+БАП - надземна частина, що пояснюється дією цитокініну БАП.

Встановлено, що середній вміст флавоноїдів у рослин на середовищі В5 становив $4,85 \pm 0,22$ мг/г сирої маси, що у 1,4-1,5 раза перевищувало показники МС+БАП ($3,30 \pm 0,20$ мг/г). Це свідчить про активацію вторинного метаболізму за більш стриманих умов культивування. Водночас середній вміст фруктози був дещо вищим у варіанті МС+БАП ($10,19 \pm 0,43$ мг/г) порівняно з В5 ($9,17 \pm 0,37$ мг/г). Крім того, встановлено, що середній вміст сумарних фенольних сполук у рослин, культивованих на середовищі В5, становив $3,14 \pm 0,10$ мг/г сирої маси, тоді як у варіанті МС+БАП - $2,63 \pm 0,09$ мг/г. Це додатково підтверджує тенденцію до більш активного накопичення вторинних метаболітів у рослин за умов культивування на середовищі В5. Отримані довірчі інтервали свідчать про достатню відтворюваність результатів та відносну стабільність показників первинного метаболізму.

Таким чином, встановлено закономірність: за умов інтенсивного росту (МС+БАП) посилюється накопичення первинних метаболітів, тоді як за більш стриманих умов (В5) активується синтез вторинних сполук. Водночас результати відображають сумарний вплив кількох факторів (мінерального складу, регуляторів росту та джерела вуглецю), що зумовлює необхідність подальших досліджень із варіюванням окремих компонентів середовища для глибшого розуміння механізмів біосинтезу.

ВИСНОВОК

1. У ході аналізу літературних джерел встановлено, що представники роду *Astragalus* є перспективними об'єктами біотехнології завдяки здатності синтезувати широкий спектр біологічно активних сполук, зокрема флавоноїди.
2. Обґрунтовано умови введення в культуру *in vitro* *Astragalus dasyanthus*. Встановлено, що середовище В5 забезпечує вищий відсоток життєздатних проростків порівняно з МС+БАП.
3. Виявлено вплив складу живильного середовища на морфогенез: на середовищі В5 інтенсивніше формується коренева система, тоді як на МС+БАП переважає розвиток пагонів, що пов'язано з дією БАП.
4. Встановлено, що середній вміст сумарних флавоноїдів є вищим у рослин, вирощених на середовищі В5 ($4,85 \pm 0,22$ мг/г сирої маси), ніж на МС+БАП ($3,30 \pm 0,20$ мг/г), що свідчить про активацію вторинного метаболізму за менш інтенсивного росту.
5. Показано, що середній вміст фруктози є дещо вищим у рослин на середовищі МС+БАП ($10,19 \pm 0,43$ мг/г), ніж на В5 ($9,17 \pm 0,37$ мг/г), що, ймовірно, зумовлено вищим вмістом сахарози у середовищі МС.
6. Встановлено, що середній вміст сумарних фенольних сполук у рослин на середовищі В5 ($3,14 \pm 0,10$ мг/г сирої маси) перевищує показники МС+БАП ($2,63 \pm 0,09$ мг/г), що свідчить про посилення синтезу фенольних вторинних метаболітів за більш стриманих умов культивування.
7. Узагальнено, що між ростом і накопиченням метаболітів існує обернена залежність: за активного росту переважає синтез первинних метаболітів, тоді як за стриманих умов посилюється утворення вторинних сполук.
8. Підтверджено можливість цілеспрямованого регулювання біосинтетичних процесів у культурі *in vitro* шляхом зміни складу живильного середовища, однак необхідні подальші дослідження для уточнення ролі окремих факторів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Petruzzello M. List of plants in the family Fabaceae // Encyclopedia Britannica. URL: <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Fabaceae-2021803> (дата звернення: 13.03.2026).
2. М К. А. Астрагал // Фармацевтична енциклопедія. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2899/astragal> (дата звернення: 13.03.2026).
3. USDA Plants Database. URL: <https://plants.usda.gov/plant-profile/ASTRA> (дата звернення: 13.03.2026).
4. Астрагал // Велика українська енциклопедія. URL: <https://vue.gov.ua/Астрагал> (дата звернення: 13.03.2026).
5. Turatbekova A. et al. A brief review on biological and chemical activities of flavonoids in plants // E3S Web of Conferences. 2023. Т. 434. С. 03026. URL: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202343403026> (дата звернення: 17.03.2026).
6. Molecular phylogeny and divergence times of Astragalus section Hymenostegis: An analysis of a rapidly diversifying species group in Fabaceae // Scientific Reports. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14614-3> (дата звернення: 13.03.2026).
7. Astragalus L. // Plants of the World Online. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:330028-2> (дата звернення: 13.03.2026).
8. Rakhmetov D. et al. Biochemical characteristics of aboveground phytomass of plant of the genus Astragalus L. in the right-bank of forest-steppe of Ukraine // ScienceRise: Biological Science. 2018. № 3(12). С. 48-52. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2018.135852> (дата звернення: 17.03.2026).
9. Li S. et al. Bioactive components and clinical potential of Astragalus species // Frontiers in Pharmacology. 2025. Т. 16. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1585697> (дата звернення: 17.03.2026).

10.Salehi B. et al. Astragalus species: insights on its chemical composition toward pharmacological applications // Phytotherapy Research. 2020. URL: <https://doi.org/10.1002/ptr.6974> (дата звернення: 17.03.2026).

11.Abd Elkader H.-T. A. E., Essawy A. E., Al-shami A. S. Astragalus species: phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases // Phytochemistry. 2022. С. 113293. URL: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113293> (дата звернення: 17.03.2026).

12.Dong M. et al. Biosynthesis and pharmacological activities of flavonoids, triterpene saponins and polysaccharides derived from Astragalus membranaceus // Molecules. 2023. Т. 28, № 13. С. 5018. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules28135018> (дата звернення: 17.03.2026).

13.Wu X. et al. Integrated metabolomics and transcriptomics study of traditional herb Astragalus membranaceus Bge. var. mongolicus (Bge.) Hsiao reveals global metabolic profile and novel phytochemical ingredients // BMC Genomics. 2020. Т. 21, S10. URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07005-y> (дата звернення: 17.03.2026).

14.Wang B. et al. Astragalus polysaccharides: structure-immunomodulation relationships, multi-target pharmacological activities, and cutting-edge applications in immune modulation // Frontiers in Immunology. 2025. Т. 16. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1714898> (дата звернення: 17.03.2026).

15.Rabeh K., Hnini M., Oubohssaine M. A comprehensive review of transcription factor-mediated regulation of secondary metabolites in plants under environmental stress // Stress Biology. 2025. Т. 5, № 1. URL: <https://doi.org/10.1007/s44154-024-00201-w> (дата звернення: 17.03.2026).

16.Li X. et al. Integrated phenotypic, transcriptomics and metabolomics: growth status and metabolite accumulation pattern of medicinal materials at different harvest periods of Astragalus membranaceus mongholicus // BMC Plant Biology. 2024. Т. 24, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05030-7> (дата звернення: 17.03.2026).

17.Ekiz Dinçman G., Aytaç Z., Çalış İ. Turkish Astragalus species: botanical aspects, secondary metabolites, and biotransformation // Planta Medica. 2024. URL: <https://doi.org/10.1055/a-2444-3252> (дата звернення: 18.03.2026).

18.Lin Y. et al. The bacterial consortia promote plant growth and secondary metabolite accumulation in *Astragalus mongholicus* under drought stress // BMC Plant Biology. 2022. Т. 22, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03859-4> (дата звернення: 18.03.2026).

19.Chen K. et al. Identification of oxidosqualene cyclases associated with saponin biosynthesis from *Astragalus membranaceus* reveals a conserved motif important for catalytic function // Journal of Advanced Research. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.03.014> (дата звернення: 18.03.2026).

20.Wang Z. et al. Identification of chalcone isomerase gene family in *Astragalus mongholicus* revealed genes regulating isoflavone synthesis // Frontiers in Plant Science. 2025. Т. 16. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1612434> (дата звернення: 18.03.2026).

21.Cui L. et al. Metabolomics and transcriptomics analyses explore the genes related to the biosynthesis of antioxidant active ingredient isoquercetin // Foods. 2026. Т. 15, № 2. С. 218. URL: <https://doi.org/10.3390/foods15020218> (дата звернення: 26.03.2026).

22.Yin M. et al. Full-length transcriptome sequences by a combination of sequencing platforms applied to isoflavonoid and triterpenoid saponin biosynthesis of *Astragalus mongholicus* Bunge // Plant Methods. 2021. Т. 17, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00762-1> (дата звернення: 26.03.2026).

23.Li Y. et al. Transplantation-driven microbial shifts and keystone taxa enhance medicinal ingredients in *Astragalus mongholicus* // Microorganisms. 2026. Т. 14, № 2. С. 451. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms14020451> (дата звернення: 26.03.2026).

24.Liu Y. et al. UV-B radiation largely promoted the transformation of primary metabolites to phenols in *Astragalus mongholicus* seedlings // Biomolecules. 2020. Т. 10, № 4. С. 504. URL: <https://doi.org/10.3390/biom10040504> (дата звернення: 26.03.2026).

25.Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor // PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20112863/> (дата звернення: 26.03.2026).

26.Tomaszewska-Sowa M., Figas A. Optimization of the processes of sterilization and micropropagation of cup plant (*Silphium perfoliatum* L.) from apical explants of seedlings in in vitro cultures // *Acta Agrobotanica*. 2012. Т. 64, № 4. С. 3-10. URL: <https://doi.org/10.5586/aa.2011.041> (дата звернення: 27.03.2026).

27.Kvasko O., Manzhura O. Features of in vitro cultivation of *Astragalus dasyanthus* Pall. plants // *Biological Systems: Theory and Innovation*. 2024. Т. 15, № 1. URL: [https://doi.org/10.31548/biologiya15\(1\).2024.003](https://doi.org/10.31548/biologiya15(1).2024.003) (дата звернення: 27.03.2026).

28.Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Т. 15, № 3. С. 473-497. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> (дата звернення: 27.03.2026).

29.Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Experimental Cell Research*. 1968. Т. 50, № 1. С. 151-158. URL: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5) (дата звернення: 27.03.2026).

30.Moore E., Cortese Y. J., Colbert D. M. A review of sterilization methods and their commercial impacts on polysaccharide-based biomaterials // *Macromol*. 2025. Т. 5, № 4. С. 45. URL: <https://doi.org/10.3390/macromol5040045> (дата звернення: 27.03.2026).

31.Shen L. et al. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: principles, advantages, equipment, and combined technologies // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2023. С. 106646. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646> (дата звернення: 28.03.2026).

32.Harborne J. B. *Phytochemical methods*. Dordrecht : Springer Netherlands, 1984. URL: <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7> (дата звернення: 28.03.2026).

33.Imran M. et al. Phytochemical constituency profiling and antimicrobial activity screening of seaweed extracts collected from the Bay of Bengal Sea coasts // *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2021. Т. 4, № 1. С. 25. URL: <https://doi.org/10.5455/jabet.2021.d103> (дата звернення: 28.03.2026).

34.Mu P., D. T. *Introduction to Practical Biochemistry*. 3rd ed. London : McGraw Hill India, 2006. 332 p.

35.Sadasivam S. Biochemical Methods for Agricultural Sciences. 3rd ed. New Delhi : Tamil Nadu Agricultural University, 2005. 67 p.

36.Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents // American Journal of Enology and Viticulture. 1965. Т. 16, № 3. С. 144-158. URL: <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144> (дата звернення: 05.05.2026).

37.Ainsworth E. A., Gillespie K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent // Nature Protocols. 2007. Т. 2, № 4. С. 875-877. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102> (дата звернення: 05.05.2026).