

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ

І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему «Культивування in vitro Лілії азіатської (*Lilium Asiatic Forever Susan*)»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Виконала

_____ **Олександра ГЕРАСИМЕНКО**
(підпис)

КИЇВ – 2025

**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 студентці

Герасименко Олександрі Валентинівні

Спеціальність 162 “ Біотехнології та біоінженерія”

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи “Культивування *in vitro* Лілії азіатської (*Lilium Asiatic Forever Susan*)” затверджена наказом НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. №1880 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 20 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської роботи: літературні джерела, методики проведення досліджень, *A. rhizogenes*.

Перелік питань, які потрібно зробити:

1. Огляд та аналіз літературних даних за темою дипломної роботи.
2. Отримати асептичні рослини лілії методом культивування апікальних меристем
3. Застосувати метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин для отримання культури «бородатих» коренів лілії;
4. Визначити ростові характеристики отриманих «бородатих» коренів;
5. Провести молекулярно-біологічні дослідження присутності перенесеного гена *rolB* Т-ДНК *A. rhizogenes*.

Дата видачі завдання «1» вересня 2024 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи _____ **Олена КВАСКО**

(підпис)

Завдання прийняв до виконання _____ **Олександра ГЕРАСИМЕНКО**

(підпис)

РЕФЕРАТ

Бакалаврська робота на тему “Культивування *in vitro* Лілії азіатської (*Lilium Asiatic Forever Susan*)” виконана на 40 сторінках, містить 6 рисунків, 2 таблиці, 38 джерел використаної літератури. Робота складається з наступних розділів:

- Огляд Літератури
- Матеріали та методи
- Результати

Актуальність теми. Використання ізольованих мерисистем дуже поширене для розв’язання важливих завдань, наприклад, для розмноження рослин, отримання здорових, без вірусів зразків і збереження генетичного різноманіття.

Генетично модифіковані допомагають виводити нові сорти, які краще витримують несприятливі умови, стійкі до хімікатів та шкідників, краще ростуть, а також за допомогою даної технології рослина може почати виробляти речовини, які до цього їй були не притаманні, наприклад: вітаміни, амінокислоти і білки.

Мета. отримання шляхом мікроклонального розмноження генетично однорідної, очищеної від вірусів культури рослини *Lilium Asiatic Forever Susan*. Отримання культури трансгенних коренів рослини *Lilium Asiatic Forever Susan* за допомогою бактерій *Agrobacterium rhizogenes* для підвищення витривалості рослини та набуття рослиною нових властивостей.

Об'єкти дослідження: Agrobacterium rhizogenes- опосередкована трансформація, лілія азіатська (*Lilium Asiatic Forever Susan*).

Методи дослідження: введення рослин в культуру in vitro , мікроклональне розмноження та генетичної трансформації рослин за

допомогою A. rhizogenes. молекулярно-біологічні методи (ПЛР, екстракція ДНК, електрофорез на агарозному гелі)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1.1 <i>Lilium Asiatic</i> “Forever Susan” як об’єкт дослідження.....	
1.1.2 Мікроклональне розмноження.....	
1.1.3 Культура трансгенних коренів.....	
1.1.4 Використання культури трансгенних коренів у біотехнологіях.....	
1.1.4.1 Використання культури синтезі біологічно-активних речовин (фармацевтика).....	
1.1.4.2 Перенесення генів з використанням <i>A. rhizogenes</i> як вектора.....	
1.1.4.3 <i>Ri</i> -опосередкований метод: трансгенні та нетрансгенні рослини...	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	
2.1 Отримання вихідного матеріалу – рослин лілії.....	
2.2 Мікроклональне розмноження.....	
2.3 <i>A. rhizogenes</i> -опосередкована трансформація.....	
2.4 Молекулярний аналіз трансгенних коренів лілії.....	
2.4.1 Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з <i>Lilium Asiatic</i> “Forever Susan”.....	
2.4.2 Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот із <i>A. rhizogenes</i> .	
2.4.3 ПЛР.....	
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	
3.1 Отримання асептичних рослин.....	
3.2. Генетична трансформація.....	
3.3 Оцінка ростових характеристик.....	

3.4 Молекулярна ідентифікація трансформації

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ.....

ПЕРСПЕКТИВИ В ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ.....

ВИСНОВКИ.....

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....

ВСТУП

Одним з ключових досягнень сучасної біотехнології є мікроклональне розмноження, яке забезпечує швидке та ефективне вегетативне розмноження рослин в лабораторних умовах. Унікальна здатність рослинних клітин до тотипотентності лежить в основі цього методу, дозволяючи формувати цілісний організм з окремої клітини або тканини. Завдяки цьому стає можливим отримання посадкового матеріалу, що відзначається генетичною однорідністю, високою якістю та відсутністю вірусів. Що є незамінним для збереження рідкісних, цінних видів та під видів, складних для традиційного розмноження.

Широке застосування мікроклонального розмноження у селекційних програмах та розсадницькій справі зумовлене його високою ефективністю та відтворюваністю результатів, збереженні генофонду та промислового виробництві посадкового матеріалу. Воно дозволяє значно збільшити кількість рослин за короткий проміжок часу, заощаджуючи вихідний матеріал та мінімізуючи ризик поширення захворювань. Особливо цінною є ця технологія для культур традиційне розмноження яких є неефективним або економічно не вигідним.

Таким чином дослідження мікроклонального розмноження є не лише важливим, але й має значний практичний потенціал для розвитку аграрного сектору, збереження біологічного різноманіття та вдосконалення технологій культивування рослин.

Трансгенні «бородаті» корені є важливою біотехнологічною системою, яка широко застосовується для отримання цінних метаболітів, рекомбінатних білків та дослідження фізіолого-біохімічних процесів у рослинах. Утворення

таких коренів відбувається внаслідок генетичної трансформації рослинної тканини бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, яка передає Ri-плазмиду в геном рослини. Отримані корені характеризуються високою регенераційною здатністю, швидким ростом в умовх *in vitro*.

Висока продуктивність та генетична стабільність культур «бородатих» коренів має значний потенціал для масштабного виробництва цінних сполук у фармацевтиці, харчовій промисловості та аграрному секторі. Актуальність досліджень у цій галузі визначається потребою в ефективних та стабільних біологічних системах для відтвореного та контрольованого синтезу цілових продуктів із високою біологічною активністю.

Лілія азіатська сорту “*Forever Susan*” (*Lilium asiatic* “*Forever Susan*”) є цінним декоративним представником азіатських гібридів лілій, що характеризується високою декоративністю квіток з контрастним забарвленням, стійкістю до поширених захворювань та адаптивністю до кліматичних умов помірної зони. Зазначені характеристики зумовлюють її актуальність як об’єкта для застосування методів мікроклонального розмноження та генетичної трансформації.

Мікроклональне розмноження лілій є ефективним інструментом для отримання значної кількості генетично однорідних рослин, що зберігають сортові ознаки, протягом відносно короткого періоду часу. Застосування даної технології є особливо важливим для збереження рідкісних сортів таких як “*Forever Susan*”, а також для забезпечення комерційного виробництва високоякісного посадкового матеріалу. Впровадження культури *in vitro* дозволяє мінімізувати ризик вірусного інфікування, знизити залежність від сезонних факторів та суттєво підвищити коефіцієнт розмноження.

Окрім того, лілії представляють значний інтерес як об’єкти генетичної трансформації, спрямованої на поліпшення декоративних якостей, підвищення стійкості до абіотичних та біотичних стресорів. Застосування сучасних методів

генетичної інженерії, зокрема *A. rhizogenes* – опосередкованої трансформації, відкриває перспективи для створення трансгенних рослин, що зберігають основні характеристики “Forever Susan”, одночасно набуваючи нових агрономічних ознак.

Таким чином, *Lilium Asiatic* “Forever Susan” є перспективною модельною системою для застосування комплексу біотехнологічних підходів, спрямованих на розширення можливостей у селекції, розсадництві та декоративному садівництві, що підкреслює актуальність подальших досліджень у даному напрямі.

Метою даної роботи було одержання культури лілії сорту *Lilium* ‘Forever Susan’ методом мікроклонального розмноження та її генетична трансформація із застосуванням *Agrobacterium rhizogenes*.

Згідно поставленої мети було сформовано наступні завдання:

- отримати асептичні рослини лілії методом культивування апікальних меристем;
- застосувати метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин для отримання культури «бородатих» коренів лілії;
- визначити ростові характеристики отриманих «бородатих» коренів;
- провести молекулярно-біологічні дослідження присутності перенесеного гена *rolB* Т-ДНК *A. rhizogenes*.

В роботі застосовано такі методи дослідження як: введення рослин в культуру *in vitro* (зокрема метод поверхневої стерилізації цибулин), мікроклональне розмноження та генетичної трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes*. молекулярно-біологічні методи (ПЛР, екстракція ДНК, електрофорез на агарозному гелі)

Практична значущість проведеного дослідження полягає у розробці та оптимізації протоколу мікроклонального розмноження сорту *Lilium* 'Forever Susan', що дозволить забезпечити отримання генетично однорідного та високоякісного посадкового матеріалу у великих обсягах. Отримані результати можуть бути безпосередньо впроваджені у практику розсадництва декоративних культур, сприяючи збереженню цінних сортових характеристик та задоволенню потреб ринку у якісному посадковому матеріалі лілії 'Forever Susan'. Розроблена методологія також може слугувати основою для подальших досліджень з мікроклонального розмноження інших цінних сортів лілій та розширення асортименту декоративних рослин, доступних для комерційного використання.

Дипломна робота виконувалася на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 *Lilium Asiatic* “Forever Susan” як об’єкт дослідження

Лілія *Lilium Asiatic* ‘Forever Susan’ є представником азіатських гібридів, які завдяки своїм агрономічним перевагам широко використовуються у декоративному садівництві, розсадництві та флористичному бізнесі. Цей сорт вирізняється незвичним контрастним забарвленням квіток — глибокий бордово-чорний центр плавно переходить у яскраво-оранжеві краї, що створює ефект вогняного полум’я. Така кольорова гама робить ‘Forever Susan’ однією з найбільш виразних лілій для ландшафтного дизайну.

Рослини формують прямостоячі квітконоси заввишки 60–90 см, із чергово розташованими ланцетоподібними листками темно-зеленого кольору, довжиною 8–15 см. Квітки без аромату, діаметром близько 10–13 см, формуються по кілька штук на одному суцвітті, найчастіше орієнтовані вгору або в боки, що характерно для азіатських гібридів. Зацвітає сорт у червні–липні, проявляючи стабільне цвітіння навіть у помірно-континентальному кліматі.

Сорт ‘Forever Susan’ вирізняється хорошою регенераційною здатністю, збереженням сортових ознак у процесі вегетативного розмноження, а також високою адаптивністю до умов культивування *in vitro*. Завдяки цим особливостям рослина є перспективною моделлю для біотехнологічних досліджень. Зокрема, методи мікроклонального розмноження дозволяють отримувати генетично однорідні рослини, що забезпечує стандартизовану

якість посадкового матеріалу та сприяє збереженню декоративних властивостей сорту.

Крім того, *Lilium* 'Forever Susan' може виступати об'єктом для проведення генетичних трансформацій з використанням *Agrobacterium rhizogenes*. Такий підхід дозволяє ініціювати утворення трансформованих «бородатих» коренів, які можуть бути використані для подальших досліджень на рівні експресії генів, а також для накопичення біологічно активних сполук. Генетична модифікація з активацією гена *rolB*, інтегрованого в геном рослини, може впливати на гормональний баланс, морфогенез та біосинтез вторинних метаболітів.

Отже, *Lilium Asiatic* 'Forever Susan' є доцільним і науково обґрунтованим вибором як об'єкта дослідження в рамках розробки біотехнологічних підходів, спрямованих на покращення якості, стійкості та відтворення цінних декоративних сортів у культурі *in vitro*.

1.2 Мікроклональне розмноження

Мікроклональне розмноження, або мікропропагація, є однією з найбільш продуктивних стратегій вегетативного розмноження рослин в умовах *in vitro*. Цей метод ґрунтується на унікальній біологічній властивості рослинних клітин – тотипотентності, що полягає у здатності окремої клітини або невеликої групи клітин ініціювати розвиток цілісного організму. Застосування мікроклонального розмноження забезпечує можливість отримання значної кількості генетично ідентичних особин, які характеризуються цінними господарськими або декоративними ознаками, що визначає його високу актуальність у сучасному рослинництві та біотехнології.

Процес мікроклонального розмноження включає послідовні етапи: ініціацію культури, фазу проліферації, індукцію ризогенезу та адаптацію до *ex vitro* умов.

Етап ініціації передбачає відбір вихідного рослинного матеріалу (експлантів), його стерилізацію та введення в стерильну культуру на живильному середовищі. На фазі проліферації відбувається стимуляція утворення множинних пагонів, як правило, за допомогою цитокінінів. Для індукції формування кореневої системи застосовують ауксини. Завершальним етапом є акліматизація, спрямована на поступове пристосування регенерованих рослин до умов навколишнього середовища поза лабораторними умовами.

Одним із ключових факторів, що визначають ефективність мікропропагації, є склад культурального середовища. Найбільш поширеним є середовище Мурасіге та Скуга (MS), що містить оптимально збалансований набір макро- та мікроелементів, вітамінів, амінокислот та джерело карбону, найчастіше у формі сахарози. Для культивування деревних видів та культур, чутливих до високої концентрації мінеральних солей, застосовують модифіковані середовища, такі як WPM (Woody Plant Medium) або B5 (Gamborg B5).

Фітогормони відіграють ключову роль у регуляції процесів морфогенезу *in vitro*. Для стимуляції пагоноутворення найчастіше використовують 6-бензиламінопурин (BAP) та кінетин, а для індукції ризогенезу – індол-3-оцтову кислоту (IAA), індол-3-масляну кислоту (IBA) та α -нафтилоцтову кислоту (NAA). Співвідношення цитокінінів та ауксинів у культуральному середовищі є визначальним фактором спрямованості розвитку культури – органогенезу або калусогенезу.

Вибір експлантів є важливим аспектом оптимізації процесу мікроклонального розмноження. В якості вихідного матеріалу можуть використовуватись апікальні та пазушні меристеми, фрагменти листків, гіпокотилі, стеблові сегменти та інші частини рослин. У багатьох видів рослин апікальні меристеми є найбільш прийнятним джерелом експлантів, оскільки містять популяцію молодих, активно ділячихся клітин з мінімальним ризиком виникнення соматклональної мінливості.

Мікроклональне розмноження знайшло широке застосування у різних галузях, включаючи садівництво, декоративне рослинництво, лісове

господарство, фармацевтичну промисловість та збереження біорізноманіття. Зокрема, технологія *in vitro* активно використовується для швидкого розмноження комерційно цінних сортів хризантем, фіалок, троянд, гладіолусів та орхідей. У фармакології метод застосовується для культивування лікарських рослин, таких як женьшень, ехінацея та арніка, що продукують цінні вторинні метаболіти.

Незважаючи на численні переваги, мікроклональне розмноження пов'язане з певними проблемами, серед яких соматклональна мінливість (виникнення генетично детермінованих змін у процесі культивування), гіпергідричність (фізіологічна аномалія, що проявляється у скловидності тканин), контамінація культуральних середовищ мікроорганізмами та складнощі адаптації деяких видів до *ex vitro* умов. Проте, сучасні підходи, спрямовані на оптимізацію складу культуральних середовищ, використання біореакторних систем, застосування осмотично активних речовин та природних антиоксидантів, дозволяють мінімізувати ці ризики.

Активні наукові дослідження спрямовані на подальше підвищення ефективності технології мікроклонального розмноження. Зокрема, вивчається застосування рідких культуральних середовищ у тимчасово занурюваних біореакторах (TIS), що забезпечує значне збільшення біомаси та зниження собівартості виробництва. Також активно впроваджуються автоматизовані системи контролю параметрів культурального середовища, фотоперіоду та інтенсивності освітлення, що сприяє підвищенню відтворюваності результатів та масштабованості процесів.

У контексті декоративного рослинництва мікроклональне розмноження є ефективним інструментом для збереження та швидкого розмноження цінних сортів, зокрема *Lilium Asiatic* 'Forever Susan'. Застосування *in vitro* культивування для даної культури дозволяє отримувати високоякісний, вільний від вірусів та генетично стабільний посадковий матеріал, що зберігає типові сортові ознаки. Розробка ефективного протоколу мікропропагації для цього

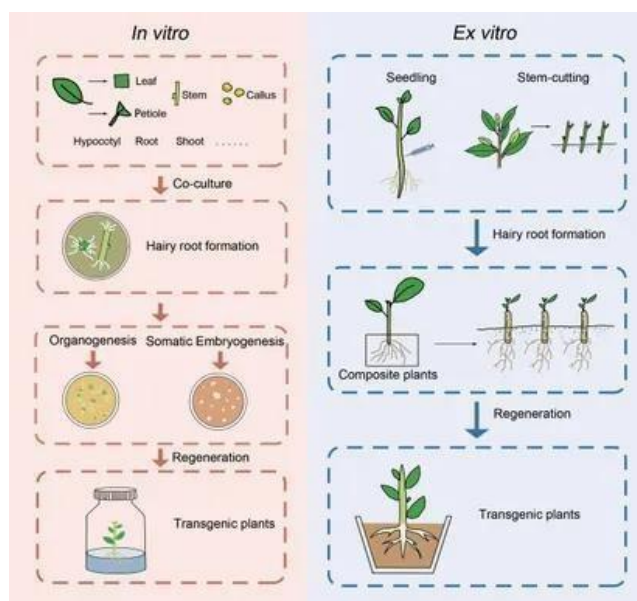
сорту має значну наукову та практичну цінність для розсадництва, біотехнології та селекційної роботи.

Також активно впроваджуються автоматизовані системи контролю параметрів культурального середовища, фотоперіоду та інтенсивності освітлення, що сприяє підвищенню відтворюваності результатів та масштабованості процесів.

У контексті декоративного рослинництва мікроклональне розмноження є ефективним інструментом для збереження та швидкого розмноження цінних сортів, зокрема *Lilium Asiatic 'Forever Susan'*. Застосування *in vitro*-культивування для даної культури дозволяє отримувати високоякісний, вільний від вірусів та генетично стабільний посадковий матеріал, що зберігає типові сортові ознаки. Розробка ефективного протоколу мікропропагації для цього сорту має значну наукову та практичну цінність для розсадництва, біотехнології та селекційної роботи.

1.3 Культура трансгенних коренів

Окремим, перспективним напрямом сучасної біотехнології рослин є розробка та застосування культури «бородатих» коренів, що ґрунтується на використанні ґрунтової бактерії *Agrobacterium rhizogenes* (наразі класифікованої як *Rhizobium rhizogenes*). Цей фітопатоген володіє унікальною здатністю ініціювати генетичну трансформацію рослинних клітин шляхом інтеграції фрагменту Т-ДНК зі своєї Рі-плазміди до геному рослини-господаря. Внаслідок цього процесу інфіковані клітини ініціюють формування численних тонких коренів, що характеризуються значно підвищеною проліферативною активністю та отримали назву



«бородатих» через їхню характерну морфологію.

Трансформовані кореневі культури відрізняються високою швидкістю росту, стабільністю геному та здатністю до автономного культивування *in vitro* без потреби у екзогенному введенні фітогормонів, що є значною перевагою порівняно з іншими типами органних культур. Однією з ключових цінностей культури «бородатих» коренів є їхня здатність до біосинтезу широкого спектра біологічно активних сполук, включаючи алкалоїди, фенольні сполуки, терпеноїди та інші вторинні метаболіти, що проявляють високу фармакологічну активність.

Протокол створення культури «бородатих» коренів включає підготовку стерильних рослинних експлантів, їхню ко-культивуацію з бактеріальною суспензією *A. rhizogenes*, індукцію формування коренів на безгормональному живильному середовищі та подальшу ідентифікацію трансформованих корневих клонів за допомогою методів молекулярної біології, зокрема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для детекції гена *rolB*. Отримані трансгенні лінії характеризуються високою генетичною стабільністю, що робить їх цінною модельною системою для дослідження механізмів регуляції метаболічних шляхів, особливостей експресії генів, а також як альтернативне джерело для сталого виробництва метаболітів, що мають терапевтичну цінність.

Окрім того, культура «бородатих» коренів демонструє значний потенціал для застосування у технологіях фіторемедіації, геномній інженерії та для отримання трансгенних рослин з покращеними адаптивними властивостями. Серед обмежень даної технології слід відзначити складність масштабування процесів культивування в умовах біореакторного виробництва, видову специфічність реакції рослин на трансформацію, а також необхідність суворого дотримання регуляторних вимог при роботі з генетично модифікованими організмами.

T-ДНК Ri-плазмід (плазмід, що індукують утворення коренів) містить ряд генетичних елементів, інтеграція яких у геном рослини-господаря є причиною появи характерних морфо-фізіологічних ознак трансформованих коренів. Серед

цих генів особливу увагу привертає родина *rol* (*root loci*), до якої належать *rolA*, *rolB*, *rolC* та, рідше згадуваний, *rolD*.

Ген *rolA* (*root locus A*):

Цей ген відповідає за модифікацію процесів морфогенезу як коренів, так і пагонів. Його експресія призводить до зниження активності цитокінінів у рослинних тканинах, що візуально проявляється у вкороченні міжвузлів та формуванні більш компактного габітусу трансгенних рослин. Важливо зазначити, що функціональна активність *rolA* проявляється лише за наявності інших генів родини *rol*.

Ген *rolB* (*root locus B*):

Цей ген вважається ключовим у процесі формування «бородатих» коренів та відіграє центральну роль у трансформації фенотипу кореневої системи. Його основні функції включають:

Стимуляцію індукції коренеутворення навіть за відсутності екзогенного внесення фітогормонів у культуральне середовище.

Активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що підвищують чутливість рослинних тканин до ауксинів.

Вплив на експресію значної кількості ендогенних генів рослини, які відповідають за підтримання гормонального балансу та біосинтез вторинних метаболітів.

Виявлення присутності гена *rolB* у геномі рослини є стандартним методом молекулярно-генетичної діагностики для підтвердження успішної трансформації, що зазвичай здійснюється за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ген *rolC* (*root locus C*):

Функції гена *rolC* пов'язані з метаболізмом ендогенних цитокінінів та фенольних сполук у рослині. Експресія цього гена може призводити до формування аномальних пагонів. Часто наявність *rolC* асоціюється зі змінами у фітохімічному профілі трансгенних рослин, зокрема зі збільшенням вмісту певних вторинних метаболітів. Крім того, *rolC* може підсилювати антистресові

механізми рослини, підвищуючи її здатність адаптуватися до несприятливих умов навколишнього середовища.

1.4 Використання культури трансгенних коренів у біотехнологіях

1.4.1 Використання культури синтезі біологічно-активних речовин (фармацевтика)

Культура «бородатих» коренів, яка формується внаслідок трансформації рослинних тканин бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, є однією з найперспективніших біотехнологічних систем для отримання біологічно активних речовин. Завдяки своїй здатності до швидкого росту, генетичної стабільності, автономного розвитку *in vitro* та високої метаболічної активності, ці корені розглядаються як унікальна платформа для біосинтезу сполук з фармакологічною цінністю.

Однією з ключових переваг культури «бородатих» коренів є висока здатність до продукції вторинних метаболітів — алкалоїдів, фенольних сполук, флавоноїдів, терпеноїдів, сапонінів, стероїдів тощо. Багато з цих сполук мають антибактеріальні, протизапальні, антиоксидантні, протиракові та нейропротекторні властивості, що зумовлює високий інтерес до їх використання у фармацевтичному секторі.

Значна кількість досліджень підтверджує ефективність використання трансгенних кореневих культур для стабільного виробництва біоактивних речовин. Наприклад, у трансформованих коренях *Hyoscyamus niger*, *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* та інших представників родини Solanaceae досягається інтенсивне накопичення тропанових алкалоїдів — скополаміну, гіосціаміну, атропіну — що мають сильну фармакологічну дію як антихолінергічні препарати.

Для підвищення виходу цільових метаболітів у культурі «бородатих» коренів застосовуються такі біотехнологічні стратегії:

- Еліцитація — внесення індукторів біосинтезу (метилжасмонат, саліцилова кислота, хітозан, срібло, дріжджові екстракти), що стимулюють експресію генів, пов'язаних з вторинним метаболізмом;
- Генетична модифікація — інтеграція конструкцій із посиленими промоторами або надекспресією ключових генів метаболічних шляхів;
- Оптимізація умов культивування — налаштування температури, рН, складу середовища, освітлення та вентиляції з метою збільшення продуктивності;
- Використання біореакторів — масштабування процесу в іммерсійних або гібридних системах без втрати ефективності.

Порівняно з традиційним вирощуванням лікарських рослин, культура «бородатих» коренів забезпечує виробництво активних сполук у контрольованих лабораторних умовах. Це дозволяє підтримувати стабільну якість, уникати залежності від кліматичних чинників, зменшити тиск на природні популяції та гнучко керувати складом кінцевого продукту відповідно до технологічних потреб.

Технологія культивування трансформованих коренів демонструє високу ефективність у виробництві лікарських засобів, фітоекстрактів, біоактивних добавок, а також у вивченні регуляції біосинтезу метаболітів з лікувальними властивостями.

1.4.2 Перенесення генів з використанням *A. rhizogenes* як вектора

Agrobacterium rhizogenes є ґрунтовою бактерією, яка здатна природним шляхом трансформувати рослинні клітини, інтегруючи фрагменти своєї Ri-плазмиди (root-inducing plasmid) у геном рослини-господаря. Завдяки цій здатності, *A. rhizogenes* широко використовується як ефективний вектор у біотехнології рослин, зокрема для створення трансгенних кореневих культур, відомих як «бородаті» корені.

Механізм перенесення генетичного матеріалу базується на перенесенні так званої Т-ДНК (transfer-DNA) з Ri-плазмиди бактерії до ядра клітини рослини. Цей процес активується у відповідь на поранення рослинної тканини і вимагає наявності вектора, який несе необхідні гени для успішної інтеграції та експресії в геномі рослини. Найбільш важливими з них є гени родини *rol* (*root loci*), зокрема *rolA*, *rolB*, *rolC*, які відповідають за морфогенетичні зміни у трансформованих клітинах. Саме ці гени спричиняють формування характерних тонких і розгалужених коренів із підвищеною метаболічною активністю.

На відміну від *Agrobacterium tumefaciens*, який переважно використовується для переносу генів у надземні частини рослин, *A. rhizogenes* має специфічну здатність трансформувати кореневі тканини. Це дає змогу отримувати трансгенні лінії рослин із модифікованою кореневою системою та значно розширює можливості у вивченні функціональної геноміки, дослідженні біосинтезу вторинних метаболітів та у фармацевтичних застосуваннях.

Однією з важливих переваг використання *A. rhizogenes* як вектора є висока стабільність експресії перенесених генів, а також можливість тривалого культивування трансформованих ліній *in vitro* без втрати бажаних властивостей. Крім того, система Ri-плазмиди може бути адаптована для використання в бінарних векторах, що дозволяє вводити в Т-ДНК додаткові гени, зокрема маркери або конструкції для редагування геному.

Окрім фундаментальних досліджень, генетична трансформація рослин з використанням *A. rhizogenes* знаходить практичне застосування у фармакології, сільському господарстві та фіторемерації. Завдяки здатності трансформованих коренів до активного синтезу вторинних метаболітів, ця система є ефективною платформою для біотехнологічного виробництва алкалоїдів, флавоноїдів та інших біологічно активних речовин у контрольованих умовах.

1.4.3 Ri-опосередкований метод: трансгенні та нетрансгенні рослини

Ri-опосередкований метод трансформації рослин, реалізований за допомогою ґрунтової бактерії *Agrobacterium rhizogenes* (нині – *Rhizobium rhizogenes*), є ефективним біотехнологічним інструментом для створення як трансгенних, так і умовно нетрансгенних рослин. На відміну від класичної трансформації *Agrobacterium tumefaciens*, яка переважно використовується для створення повноцінних трансгенних форм із модифікованими вегетативними та генеративними органами, *A. rhizogenes* має унікальну здатність індукувати утворення трансформованих коренів, що зберігають високу проліферативну активність і генетичну стабільність.

Механізм дії базується на перенесенні T-ДНК із Ri-плазмиди до геному клітин рослини-господаря. Ця T-ДНК містить гени родини *rol* (*root loci*), зокрема *rolA*, *rolB*, *rolC*, які відповідають за морфогенетичні зміни тканин. Їхня експресія викликає формування характерної кореневої системи, збільшення метаболічної активності та іноді зміни у гормональному фоні рослини.

Трансгенні рослини

У випадку стабільної інтеграції T-ДНК Ri-плазмиди до ядерного геному, утворюються трансгенні рослини або окремі трансформовані органи (зокрема «бородаті» корені). Такі рослини мають довготривалу експресію генів Ri-плазмиди та можуть бути використані як моделі для вивчення метаболічних шляхів, а також для промислового синтезу вторинних метаболітів, зокрема тропанових алкалоїдів, ізофлавоноїдів та флавоноїдів.

Ці системи є потужним біотехнологічним інструментом для:

- отримання трансгенних ліній рослин із новими агрономічними або фармакологічними властивостями;
- вивчення функцій специфічних генів у регуляції росту, розвитку та метаболізму;
- створення експресійних платформ для синтезу рекомбінантних білків.

Нетрансгенні рослини

Попри те, що більшість досліджень зосереджені на стабільній трансформації, у деяких випадках можлива тимчасова або неповна інтеграція T-ДНК, або ж її епігенетичне «замовчування» в подальших генераціях. Це

означає, що окремі рослини або лінії можуть не містити повноцінної трансгеномної модифікації, але все одно демонструвати морфологічні ефекти, викликані короткотривалою експресією генів *rol*. Такі рослини можуть розглядатися як умовно нетрансгенні або «мінімально модифіковані», що важливо в контексті сучасних біоетичних вимог і регулювання ГМО-продукції.

Застосування у біотехнології та селекції

Ri-опосередкований метод трансформації має широкий спектр застосувань:

- у селекційній справі: для створення компактних форм, ранньоцвітущих сортів, рослин з підвищеним вмістом біологічно активних речовин;
- у фармацевтичній біотехнології: як ефективна система синтезу вторинних метаболітів;
- у наукових дослідженнях: як зручна модель для вивчення функціональної активності генів, біосинтезу фітогормонів та інших молекулярних процесів;
- у фіторемерації: створення трансформованих рослин із підвищеною здатністю до поглинання токсичних речовин з ґрунту.



РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Отримання вихідного матеріалу – рослин лілії

У дослідженнях були використані рослини *Lilium Asiatic* “Forever Susan”. Асептичні рослини отримували методом апікальних меристем. Для цього цибулини занурювали у 70% етанол на 1 хвилину, потім обробляли у розчині $HgCl_2$ 0,1%. протягом 5 хвилин. Та промивали тричі після кожної обробки

дистильованою водою. Простерилізовані цибулини розміщували для культивування на живильне середовище Мурасіге та Скуга на світлі при температурі 25°C.

Склад поживного середовища

Макроелементи (mg/L):

- Нітрат амонію (NH_4NO_3): 1650
- Нітрат калію (KNO_3): 1900
- Хлорид кальцію ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 440
- Сульфат магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 370
- Фосфат калію однозаміщений (KH_2PO_4): 170

Мікроелементи (mg/L):

- Борна кислота (H_3BO_3): 6.2
- Хлорид кобальту ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 0.025
- Сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 0.025
- Сульфат марганцю ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 22.3
- Йодид калію (KI): 0.83
- Молібдат натрію ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 0.25
- Сульфат цинку ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 8.6
- Сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 27.8
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 37.2

Вітаміни та органічні сполуки (mg/L):

- Міо-інозитол: 100
- Нікотинова кислота: 0.5
- Піридоксин HCl: 0.5
- Тіамін HCl (: 0.1
- Гліцин: 2.0

Інші компоненти:

- Сахароза: 30,000 mg/L (30 g/L)
- Агар : 6–9 g/L
- Кінетин 0,25 g/L
- рН середовища: 5.6–5.8

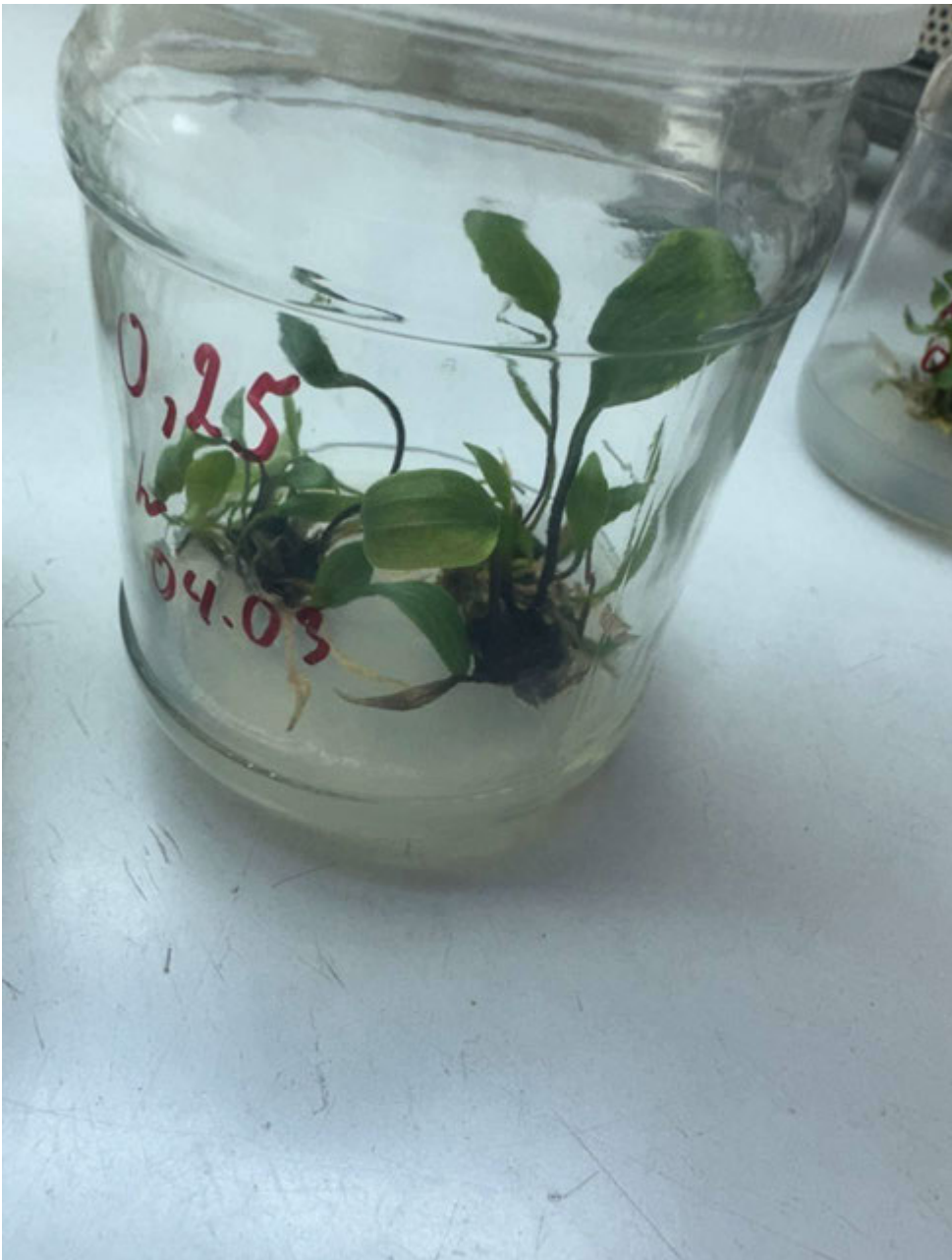


Рис 2.1 Лілія на живильному середовищі

Рис. 2.2 Лілія на живильному середовищі





Рисунок 2.3

Рисунок 2.4



2.2 Мікроклональне розмноження

Для мікроклонального розмноження планувалося використання верхівкових пагонів та апікальних меристем асептичних рослин лілії (*Lilium Asiatic* “Forever Susan”). Як живильне середовище застосовували модифіковане середовище Мурасіге і Скуга (MS), з додаванням 0,25 мг/л кінетину, 30 г/л сахарози та 7 г/л агару. рН середовища коригували до 5,7–5,8 перед автоклавуванням.

Стерильні експланти розміщували у пробірки або чашки Петрі зі свіжоприготовленим середовищем. Культивуацію проводили в умовах контрольованого фотоперіоду (16 годин світла) при температурі 24–26 °С та інтенсивності освітлення 100 мкмоль/(м²·с). Очікуваний розвиток — поява регенерантів через 3–4 тижні.

2.3 *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація

Генетичну трансформацію лілії проводили з використанням нічної культури *Agrobacterium rhizogenes* штаму А4. Перед проведенням кокультивації бактеріальну суспензію розводили у 3–4 рази. Сегменти листків асептичних рослин спільно культивували з розведеною суспензією *A. rhizogenes* протягом 24 годин.

Нічну культуру бактерій осаджували шляхом центрифугування при температурі +4 °С і швидкості 6000 об/хв протягом 10 хвилин. Отриманий осад ресуспендували у відповідному об’ємі рідкого середовища MS.

Як експланти використовували добре сформовані листки віком 1–1,5 місяці. Перед зануренням у бактеріальну суспензію на поверхні листків наносили насічки, що сприяло ефективному проникненню бактерій. Після занурення в суспензію експланти витримували 30 хвилин при кімнатній температурі.

Далі листки переносили в чашки Петрі з рідким середовищем MS, попередньо видаливши надлишки бактеріальної суспензії. Кокультивація тривала 24 години.

Після завершення кокультивації експланти переміщували на агаризоване середовище MS, з додаванням цефотаксиму в концентрації 600 мг/л для елімінації залишкової агробактерії.

Протягом 2–3 тижнів відстежували розвиток потенційно трансгенних пагонів. Проростки вирощували в умовах *in vitro* при температурі 25 ± 1 °C, 16-годинному фотоперіоді та освітленості 100 мкмоль/(м²·с).

Приблизно через 4 тижні в зонах надрізів з'являлися характерні корені — рясно розгалужені, з негативним геотропізмом. Їх переносили на безгормональне агаризоване середовище MS та утримували в темряві при температурі 25 °C.

2.4 Молекулярний аналіз трансгенних коренів лілії

2.4.1 Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот з *Lilium Asiatic* “Forever Susan”

Для підтвердження трансгенної природи коренів лілії, отриманих у результаті трансформації та відібраних на селективному поживному середовищі, проводили ПЛР-аналіз загальної рослинної ДНК. Її виділення здійснювали за допомогою методу з використанням ЦТАБ. Аналізували як контрольні корені рослин *Lilium Asiatic* “Forever Susan”, так і три трансформовані лінії “бородатих” коренів.

Використано наступні навішування зразків:

- Контрольний зразок: 56 мг
- Лінія №2: 117 мг
- Лінія №3: 140 мг
- Лінія №4: 133 мг

Рослинну масу гомогенізували у фарфорових ступках, після чого перенесли до мікропробірок об'ємом 1,5 мл. До зразків додавали буфер для екстракції ДНК (відповідно до табл. 2.2), після чого суспензії інкубували при температурі 56 °С протягом 20 хвилин. Далі здійснювали депротейнізацію додаванням рівного об'єму хлороформно-ізоамілового розчину (24:1).

Після центрифугування (5 хв при 14 000 об/хв) проводили розділення фаз, верхню водну фазу обережно переносили до нових пробірок та піддавали повторному очищенню тією ж сумішшю (хлороформ/ізоаміловий спирт). Потім до водної фази додавали осаджуючий буфер (табл. 2.3) та інкубували при кімнатній температурі протягом 20–60 хвилин. ДНК осаджували центрифугуванням (5 хв при 14 000 об/хв).

Отриманий осад розчиняли у 400 мкл 1,2 М NaCl. Додаткове осадження ДНК проводили шляхом додавання дворазового об'єму 96% етанолу з подальшою витримкою протягом ночі. Після цього осад центрифугували (14 000 об/хв, 5 хв), двічі промивали 70% етанолом, підсушували та остаточно розчиняли у 40 мкл стерильної деіонізованої води.

2×ЦТАБ буфер для екстракції рослинної ДНК (V=100 мл]

1М Тріс-НСl рН 8.0	10мл
5М NaCl	28мл (29,16)
0,5М Na-ЕДТА	4мл
ЦТАБ	29г
2-меркаптоетанол	280мл

1% ЦТАБ буфер для осадження (V=100 мл]

1М Тріс-НСl рН 8.0	5мл
0,5М Na-ЕДТА	2мл
ЦТАБ	1г

2.4.2 Виділення тотальних препаратів нуклеїнових кислот із

A. rhizogenes.

Для постановки ПЛР-реакції в якості позитивного контролю використовували тотальну ДНК бактерії *Agrobacterium rhizogenes*.

З цією метою 1,5 мл нічної бактеріальної культури переносили до мікроцентрифужної пробірки та осаджували клітини шляхом центрифугування протягом 5 хвилин при 12 000 об/хв. Після видалення супернатанту клітини ресуспендували у 300 мкл TE-буфера, після чого додавали 150 мкл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1) для депротеїнізації.

Поділ водної та органічної фаз здійснювали шляхом центрифугування при 12 000 об/хв протягом 5 хвилин. Водну фазу обережно відбирали, визначали її об'єм, після чого додавали 0,05 об'єму 5 М NaCl для досягнення кінцевої концентрації 0,25 М, а також три об'єми охолодженого (-20 °C) 96% етанолу. Суміш залишали на ніч при температурі -20 °C для осадження нуклеїнових кислот.

Наступного дня ДНК осаджували центрифугуванням при 12 000 об/хв протягом 10 хвилин. Отриманий осад промивали 1 мл 70% етанолу, після чого обережно видаляли залишки рідини, підсушували осад і розчиняли його у 50 мкл стерильної дистильованої води.

2.4.3 ПЛР

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали з використанням термоциклера *Mastercycler personal*. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл і включав:

- 1 мкл тотальної рослинної ДНК (приблизно 100 нг);
- 1 мкл буфера (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0,01% Тритон X-100);

- мкл суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (по 200 мкМ кожного);
- 0,5 мкл кожного з праймерів (концентрація — 0,2 мкМ);
- 0,1 мкл Taq-полімерази;
- 15 мкл стерильної деіонізованої води.

У дослідженні використовували праймери, специфічні до гена *rolB*:

- прямий: 5'–ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCTCCACGA–3',
- зворотний: 5'–TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC–3'.

Ампліфікацію проводили за наступним температурним режимом:

- первинна денатурація — 94 °С, 3 хв;
- 30 циклів ампліфікації:
- денатурація — 94 °С, 30 сек;
- відпал праймерів — 55 °С, 30 сек;
- елонгація — 72 °С, 30 сек;
- фінальна полімеризація — 72 °С, 5 хв.

Аналіз ампліфікованих продуктів ПЛР здійснювали методом електрофорезу в 1% агарозному гелі з використанням трис-ацетатного буфера.

Як негативний контроль використовували ДНК з нетрансформованих коренів жимолості, позитивним контролем слугувала ДНК *Agrobacterium rhizogenes*.

2.5 Визначення приросту біомаси трансгенних коренів

Для оцінки приросту біомаси відбирали корені однакової довжини (приблизно 1 см), які стерильно зважували, після чого переносили на поживне середовище ½ MS та культивували в умовах *in vitro* протягом 14 діб. Після завершення періоду культивування корені повторно зважували.

Розрахунок приросту біомаси (К) здійснювали за формулою:

$$K = (w_1 - w_0) / (t_1 - t_0),$$

де w_1 — маса біомаси після культивування (г),

w_0 — початкова маса (г),

$t_1 - t_0$ — тривалість культивування (доба).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

У ході виконання роботи було проведено комплекс досліджень, спрямованих на генетичну трансформацію лілії сорту *Lilium Asiatic* 'Forever Susan' з використанням штаму *Agrobacterium rhizogenes* A4 та оцінку ростових характеристик отриманих «бородатих» коренів. Також описано метод мікроклонального розмноження як підґрунтя для ефективного отримання асептичного матеріалу.

3.1 Отримання асептичних рослин

Асептичні рослини було отримано шляхом культивування апікальних меристем лілії на середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням кінетину у концентрації 0,25 мг/л. Стерилізація цибулин проводилася шляхом поетапного оброблення 70% етанолом, розчином гіпохлориту натрію та стерильною водою. Асептичність матеріалу підтверджена за відсутності контамінації після 10 днів культивування.

3.2. Генетична трансформація

Листкові експланти асептичних рослин було інфіковано бактеріальною суспензією *A. rhizogenes* (нічна культура, розведена 3-4 рази), з подальшою ко-культивацією протягом 24 годин на середовищі МС. Після елімінації бактерії за допомогою цефотаксиму (600 мг/л), спостерігалось утворення коренів зі специфічним фенотипом (висока розгалуженість, від'ємний геотропізм).

3.3 Оцінка ростових характеристик

Для оцінки приросту біомаси трансформованих коренів було проведено зважування на 1-й та 14-й день культивування. Приріст біомаси у трьох трансгенних лініях коливався в межах 195–225 мг за 14 днів, тоді як у контрольної лінії приріст був відсутній.

3.4. Молекулярна ідентифікація трансформації

Наявність гена *rolB* у трансформованих лініях підтверджено методом ПЛР. ДНК було виділено з використанням ЦТАБ-методу. Позитивний результат ампліфікації отримано для трьох дослідних ліній, контрольна рослина – негативна за наявністю гена *rolB*.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Проведене дослідження має суттєве практичне значення для галузі декоративного рослинництва, біотехнології та розсадництва. Вперше розроблений підхід до мікроклонального розмноження сорту *Lilium* 'Forever Susan' дозволяє забезпечити масове отримання високоякісного, генетично однорідного та вірусвільного посадкового матеріалу з гарантованим збереженням сортових ознак. Така технологія є особливо важливою для комерційного вирощування лілій, оскільки дозволяє знизити залежність від традиційних методів розмноження, які є трудомісткими та сезонно обмеженими.

Отримані культури *in vitro* можуть бути використані не лише для розмноження, але й як вихідний матеріал для подальших генетичних або фітохімічних досліджень. Завдяки високому ступеню стерильності, швидкому росту та стабільності *in vitro*-ліній, такі культури можуть бути ефективно використані в експериментальній біології, фармацевтичній розробці та генетичній інженерії.

Застосування трансформації за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* відкрило додаткову можливість створення «бородатих» коренів, які є універсальними біореакторами для синтезу вторинних метаболітів, включаючи алкалоїди, фенольні сполуки, глікозиди та інші цінні речовини. Це дає підстави використовувати отримані трансгенні лінії не лише для декоративного призначення, а й у фармакології та харчовій промисловості.

Результати також можуть бути інтегровані у навчальні програми з біотехнології як модельний приклад успішного застосування клітинних технологій у рослинництві. Така практика сприятиме підвищенню рівня підготовки майбутніх спеціалістів.

ПЕРСПЕКТИВИ В ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на вдосконалення протоколу мікропропагації, зокрема оптимізацію складу живильного середовища, концентрацій регуляторів росту, тривалості культивування та умов акліматизації. Це дозволить підвищити коефіцієнт розмноження та якість отриманих рослин.

Окремий напрям становить масштабування процесів у біореакторах (зокрема тимчасово-занурюваних), що дозволить автоматизувати виробництво і знизити витрати. Створення умов для культивування *Lilium* 'Forever Susan' у рідких культурах стане основою для промислової реалізації біотехнології *in vitro*.

Також перспективним є використання технології геномного редагування (наприклад, CRISPR/Cas9) для введення додаткових цільових генів, які можуть відповідати за аромат, колір, тривалість цвітіння або стійкість до стресових факторів. На цьому тлі отримані трансгенні рослини можуть стати основою для формування нових селекційних ліній.

Ще одним важливим напрямом є біохімічна оцінка продукції вторинних метаболітів у трансгенних «бородатих» коренях. Це дозволить визначити можливості використання таких культур як джерела біологічно активних речовин з фармакологічним або харчовим потенціалом.

Крім того, перспективним є застосування отриманих результатів для збереження рідкісних і цінних сортів декоративних культур, що зникають у природному середовищі, та для створення колекцій у ботанічних садах і наукових установах.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження були досягнуті всі поставлені цілі, а саме: розроблено й оптимізовано метод отримання асептичних рослин *Lilium Asiatic 'Forever Susan'*, успішно здійснено генетичну трансформацію з використанням штаму *Agrobacterium rhizogenes* A4, отримано культуру «бородатих» коренів, а також підтверджено трансгенну природу нових ліній методом ПЛР.

- 1) стерилізації та вирощування асептичних рослин виявилася ефективною: використання комбінованого методу знезараження та культури апікальних меристем забезпечило високий відсоток життєздатності та відсутність контамінації у вихідного матеріалу.
- 2) Процедура *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дозволила отримати характерні «бородаті» корені, що відзначалися високою регенераційною здатністю, розгалуженістю та специфічною морфологією. Це підтверджує здатність сорту 'Forever Susan' до успішної трансформації та подальшого культивування *in vitro*.
- 3) Приріст біомаси трансгенних ліній свідчить про активний метаболізм та стабільність росту в стерильних умовах. За 14 діб культивування на безгормональному середовищі МС трансформовані лінії мали приріст від 195 до 225 мг, тоді як контрольна не виявила приросту.
- 4) ПЛР-аналіз показав наявність гена *rolB* у всіх трьох трансгенних лініях, що є прямим доказом успішної інтеграції T-ДНК Ri-плазмід до геному рослин. Це також демонструє перспективність використання молекулярно-генетичних методів для підтвердження трансформації.
- 5) Практична значущість дослідження полягає у можливості впровадження розробленого протоколу трансформації в біотехнологічну практику для створення високопродуктивних трансгенних ліній, збагачених вторинними

метаболітами або іншими цінними ознаками, зокрема для декоративного рослинництва та фармацевтичної галузі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ковальчук С. мікроклональне Колесник. Ужгор. нац. ун-т, 2023. URL: https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/bitstream/lib/57294/1/мікроклональне_Колесник.pdf.
2. Agrobacterium rhizogenes. Agricultural and Biological Sciences. URL: https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/agrobacterium-rhizogenes?utm_source.
3. A novel approach for enhancing plant growth under stress conditions / W. Zhang et al. Plant Methods. 2024. Vol. 20, no. 1. P. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01246-8>.
4. A Review of Influencing Factors of DL- α -Lipoic Acid Synthesis: Advances and Future Perspectives / Y. Huang та ін. Frontiers in Nutrition. 2022. Т. 9. С. 30. URL: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.848308>.
5. Asiatic Lily 'Forever Susan'. URL: https://www.highcountrygardens.com/product/flower-bulbs/asiatic-lily-forever-susan?srsId=AfmBOooTnDCOFYHMMLVIBBMkZ1YTIZotO18AshYENOFVaMLXkTBvdc01&utm_source (date of access: 01.10.2023).
6. Author A., Author B. Title of the Article. Journal Name. 2023. Volume Number, Issue Number. P. Page Range. URL: <https://doi.org/10.1016/j.joie.2023.01.002>.
7. Author A. Title of the article. Journal Name. 2005. Volume, number. P. pages. URL: <https://doi.org/10.1080/07388550601173918>.
8. Author A. Title of the Article. Journal Name. 2019. Volume Number, Issue Number. P. Page Range. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2019.09.0953>.
9. Author F., Author F., Author F. Title of the Article. Journal Name. 2021. Volume Number, Issue Number. P. Page Range. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jlis.2021.01.001>.
10. Author Last Name A. F. N. Title of the Article. Journal Name. 1999. Volume Number, Issue Number. P. Page Range. URL: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00016-6).

11. Author. *Lilium* species and varieties production technology. URL: https://www.slideshare.net/slideshow/lilium-species-and-varieties-production-technology/239173768?utm_source.
12. Bhandari N. S., Aswath C. Title of the article. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018. Vol. 7, no. 4. P. XX–YY. URL: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.XXX>.
13. contributors W. Ri plasmid. URL: https://en.m.wikipedia.org/wiki/Ri_plasmid?utm_source (date of access: 02.10.2023).
14. Copper-Mediated Cross-Coupling of Aryl Halides and Alkenylboron Compounds: A Strategy for the Synthesis of Functionalized Alkenes / Z. Li et al. *ACS Catalysis*. 2023. Vol. 13, no. 4. P. 2233–2241. URL: <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c06182>.
15. Different drought resistance strategies in two species of pine: *Pinus sylvestris* var. *mongolica* and *Pinus tabuliformis* / J. Feng et al. *Plant Biol*. 2014. Vol. 16, no. 4. P. 886–895. URL: <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1421-x>.
16. Dzhumagulov N. D., Khamidova G. A. On the Interaction of the Superconducting and Magnetic States in RFeAsO Compounds. *Physics of the Solid State*. 2014. Vol. 56, no. 2. P. 236–241. URL: <https://doi.org/10.1134/S2079059714020063>.
17. Effects of ibuprofen on COVID-19: A systematic review and meta-analysis / Y. Chen et al. *Clinical Microbiology and Infection*. 2023. Vol. 29, no. 3. P. 355–366. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.01.001>.
18. Ghosh M., Roy S. Plant tissue culture: A biotechnological tool for the development of regenerative plants. *Plant Biotechnology Reports*. 2010. Vol. 4, no. 2. P. 75–90. URL: <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0151-2>.
19. Hahn D., Müller R., Hohmann S. Novel strategies for the improvement of enzyme properties. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. Vol. 97, no. 5. P. 1135–1145. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>.
20. Korf R. Search-Based Algorithms for Artificial Intelligence. *Encyclopedia of Artificial Intelligence* / ed. by G. J. Klir. 2020. P. 1–7. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5_18-1.

21. Kumar S., Sharma G., Ghosh P. The role of community participation in disaster risk reduction: A case study of Uttarakhand, India. *Bulletin of Earthquake Engineering*. 2019. Vol. 17, no. 10. P. 5487–5510. URL: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0246-z>.
22. Li W., Huang F., Wang J. Assessment of Corn Growth and Yield in Response to Climate Change in Northeast China. *Agronomy*. 2023. Vol. 8, no. 8. P. 677. URL: <https://doi.org/10.3390/agronomy8080677>.
23. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
24. Name A. Мікроклональне розмноження в культурі in vitro: можливості та переваги використання. *Journal Name*. Volume, Number. C. Pages. URL: https://www.academia.edu/128476034/Мікроклональне_розмноження_в_культурі_in_vitro_можливості_та_переваги_використання.
25. Name A. Article Title. *Trends in Biotechnology*. 2006. Vol. 24, no. 8. P. 411–419. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.07.002>.
26. Neff D. W., Meyer R. A. An Improved Method for the Quantification of Bioactive Compounds. *Electrochemistry Science*. 2019. Vol. 1, no. 1. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>.
27. Plant Cell Technology. Hairy Root Culture: Definition, Process, and Applications. 2023. URL: https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/bloghairy-root-culture-definition-process-and-applications?srsId=AfmBOoqmckiw8Bvo_PT82OrwIKIBj0hku219QbHwBnVkFG44g-Gh1w_w&utm_source (date of access: 15.10.2023).
28. Plant Finder: Plant Details. URL: https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=298953&utm_source (date of access: 01.10.2023).
29. Potential role of the protease inhibitor on the effect of a Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) infection on antiviral immunity / J. L. De Velasco et

- al. *Frontiers in Immunology*. 2021. Vol. 12. P. 699849. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699849>.
30. Regulation of Ethylene Signaling in Plants under Various Stress Conditions / H. Zhang et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. P. 1197555. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1197555>.
31. Rheingold H. *Smart Mobs: The Next Social Revolution*. The Royal Society. 2003. Vol. 361. P. 1–61. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC150518/>.
32. Rosa G. M. M., Teixeira R. P. M. L. d. C. *Advances in enzyme technology and its applications*. *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 26, no. 5. P. 556–569. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.002>.
33. Structural and functional characterization of the putative galactin gene family in eggplant (*Solanum melongena* L.) / A. Kumar et al. *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>.
34. Targeted activation of GABAergic neurons in the immature nervous system alters the patterning of neural activity and behavioral expression of anxiety-like behaviors / T. Krakauer et al. *Nature Communications*. 2023. Vol. 14, no. 1. P. 1–15. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39340-9>.
35. Technology P. C. *How to Tissue Culture Lily: Part 1*. URL: https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blog-how-to-tissue-culture-lily-part1?srsId=AfmBOopUaayPxz9QWm8-4qeVwVy-X7Ghy3NBbmVTquD-2Xo3pjW92SkV&utm_source (date of access: 01.10.2023).
36. The role of osmotic stress in plant responses to salinity and drought / T. Fujita et al. *Plant and Cell Physiology*. 2019. Vol. 40, no. 2. P. 252–265. URL: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz057>. van Vliet M. *Handbook of Plant Cell Culture*. John Wiley & Sons, 2007.
37. Vohra S. Title of the Article. *Journal Name*. 2017. Volume Number, Issue Number. P. Page Range. URL: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1291-9>.
38. Wikipedia contributors. *Micropropagation*. URL: <https://en.m.wikipedia.org/wiki/Micropropagation> (date of access: 24.10.2023).

