

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

**ПОГОДЖЕНО**  
Декан факультету захисту рослин,  
біотехнологій та екології  
\_\_\_\_\_ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**  
“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри  
екобіотехнологій та біорізноманіття  
\_\_\_\_\_ **Олена КВАСКО**  
“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему “ Отримання перспективної сировини для синтезу біологічно активних речовин на основі культури рослинних тканин *in vitro*””

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма “Екологічна біотехнологія та біоенергетика”

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

**Гарант освітньої програми**

д.с.-г.н., професор \_\_\_\_\_

(підпис)

**Микола ЛІСОВИЙ**

**Керівник магістерської кваліфікаційної роботи**

к.б.н., доцент \_\_\_\_\_

(підпис)

**Олена КВАСКО**

**Виконав**

(підпис)

**Євген МОРГУН**

**КИЇВ – 2025**

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття  
к.б.н., доцент \_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

## ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ

Моргуну Євгену Євгеновичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма "Екологічна біотехнологія та біоенергетика"

Орієнтація освітньої програми Освітньо професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: «Отримання перспективної сировини для синтезу біологічно активних речовин на основі культури рослинних тканин *in vitro*»

затверджена наказом від «7» листопада 2024 р. № 2005 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2025 року.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: рослини *M. piperita*, *S. rabaudiana Bertoni* штам А4 *Agrobacterium rhizogenes*, протоколи введення в культуру *in vitro*, *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, полімеразно-ланцюгової реакції.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Отримати асептичні рослини *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* в культурі *in vitro*.
2. Ініціювати калюсну культуру *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* і дослідити вплив складу живильного середовища та первинного експланта на частоту калюсоутворення та морфологічні особливості тканин
3. Отримати суспензійну культуру *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* на основі калюсних тканин і оцінити показники росту у рідкому середовищі.
4. Провести агробактеріальну трансформацію експлантів *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* за участю *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4) для отримання «бородатих» коренів.
5. Провести молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній «бородатих» коренів за допомогою ПЛР для підтвердження їх трансгенної природи.
6. Провести комплексну оцінку калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів щодо їхнього біотехнологічного потенціалу, як джерел сировини для подальшого синтезу вторинних метаболітів.

Дата видачі завдання 8 листопада 2024 року

Керівник магістерської  
кваліфікаційної роботи

\_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
(підпис)

Завдання прийняв до виконання

\_\_\_\_\_ Євген МОРГУН  
(підпис)

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему «Отримання перспективної сировини для синтезу біологічно активних речовин на основі культури рослинних тканин *in vitro*» виконана на 92 сторінках друкованого тексту, містить 13 інформаційних таблиць та 21 рисуноків.

Складається із таких розділів: огляд наукової літератури, матеріали та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел.

Дослідження проводились у товаристві з обмеженою відповідальністю «Науково - виробниче об'єднання «БІОТЕХ ПЛАНТС», та у навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

*Метою роботи* було отримати та охарактеризувати калюсну, суспензійну і культуру «бородатих» коренів *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita*, в умовах *in vitro*, а також оцінити їхній біотехнологічний потенціал як джерел перспективної рослинної сировини для синтезу біологічно активних речовин.

*Об'єктом дослідження* є особливості індукції та росту калюсної тканини, суспензійної та культури бородатих коренів *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* в умовах *in vitro* з метою отримання рослинної сировини, яку в подальшому можна використовувати для синтезу біологічно активних речовин.

*Предметом дослідження* були рослини *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita*.

У результаті досліджень було отримано калюсну, суспензійну та культуру «бородатих» коренів *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita*, та проведено порівняльну оцінку біотехнологічного потенціалу калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів *S. rebaudiana* та *M. piperita*. Установлено, що всі три типи культур є перспективними джерелами біотехнологічної сировини з різними функціональними призначеннями.

Результати роботи було апробовано на наукових конференціях:

1. Моргун Є,Є, Кваско О.Ю, «Морфогенез та розмноження *Mentha piperita*», Міжнародна наукова конференція «Розвиток наукової думки постіндустріального суспільства: сучасний дискурс», Житомир – 24 жовтня 2025 року. – С. 218 – 220.

2. Моргун Є.Є, Кваско О.Ю, «Калюсогенез *Stevia rebaudiana bertonii* в культурі *in vitro*», X Міжнародна студентська наукова конференція «СУЧАСНІ АСПЕКТИ ТА ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ РОЗВИТКУ НАУКИ», Луцьк – 24 жовтня 2025 року. – С. 209 – 210.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ .....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	10
1.1 Ботанічна характеристика <i>Stevia rebaudiana bertonii</i> .....	10
1.2 Ботанічна характеристика <i>Mentha piperita</i> .....	11
1.3 Біологічно активні речовини рослинної сировини .....	14
1.3.1 Основні біологічно активні речовини стевії .....	14
1.3.2 Основні біологічно активні речовини м'яти перцевої.....	16
1.3.3 Фармакологічна та біотехнологічна цінність БАР.....	18
1.4 Теоретичні основи отримання біологічно активних речовин за допомогою культури рослинних тканин <i>in vitro</i> .....	19
1.4.1 Калюсна культура, як основа для отримання біологічно активних речовин .....	19
1.4.2 Суспензійна культура: особливості росту та метаболізму .....	22
1.4.3 Культура «бородатих» коренів як перспективний біотехнологічний інструмент .....	26
1.5 Перспективи використання стевії та м'яти у різних сферах та галузях промисловості .....	30
1.5.1 Застосування стевії у харчовій промисловості .....	30
1.5.2 Застосування стевії у медицині та фармацевтичній промисловості ...	31
1.5.3 Застосування м'яти у харчовій промисловості .....	33
1.5.4 Застосування м'яти у медицині та фармацевтичній промисловості ...	34
1.6 Методи аналізу біологічно активних речовин та підтвердження трансгенності культур <i>in vitro</i> .....	35
1.7 Порівняльна характеристика типів рослинних культур, як сировини для синтезу вторинних метаболітів <i>in vitro</i> .....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	44
2.1 Місце проведення досліджень.....	44
2.2 Матеріали дослідження .....	47
2.2.1 Вихідний матеріал.....	47
2.3 Методи дослідження.....	48

2.3.1 Підготовка рослинного матеріалу <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> до введення в культуру <i>in vitro</i> .....	48
2.3.2 Підбір живильного середовища для культивування <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> .....	49
2.3.3 Підбір живильних середовищ для отримання калюсної культури стевії та м'яти .....	50
2.3.4 Отримання суспензійної культури <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> .....	51
2.3.5 Індукція культури «бородатих» коренів за допомогою <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	52
2.3.6 Виділення ДНК та молекулярно – генетичне підтвердження трансгенної природи «бородатих» коренів .....	53
2.4 Статистична обробка результатів .....	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	57
3.1 Отримання асептичного матеріалу <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> .....	57
3.2 Індукція та морфологічна характеристика калюсних тканин <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> .....	59
3.3 Одержання та оцінка росту суспензійної культури <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> та <i>Mentha piperita L</i> .....	64
3.4 Отримання та характеристика культури «бородатих» коренів <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> , індукованих <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	66
3.5 Молекулярно-генетичне підтвердження трансформації культури «бородатих» коренів <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> та <i>Menta piperita L</i> .....	70
3.6 Оцінка потенціалу різних типів культур рослинних тканин <i>in vitro</i> як біотехнологічної сировини .....	72
ВИСНОВКИ .....	83
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	85
ДОДАТОК 1 .....	93
ДОДАТОК 2 .....	96

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

2,4-Д – 2,4 дихлорфеноксоцетова кислота

БАР – біологічно активна речовина

БАП – 6-бензиламінопурин

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІОК – індолілоцтова кислота

Кінетин – 6-фурфуриламінопурин

НОК – нафтилоцтова кислота

ПЛР – полімеразно ланцюгова реакція

## ВСТУП

**Актуальність.** Використання культур ізольованих клітин, тканин і органів *in vitro* відкриває широкі можливості для одержання високоякісної рослинної сировини незалежно від сезонності, кліматичних умов чи екологічних факторів, що особливо актуально в умовах зростаючого попиту на природні біологічно активні сполуки. Однією з ключових тенденцій сучасної фармацевтичної біотехнології є пошук та відновлення природних джерел цінних метаболітів, серед яких провідне місце посідають лікарські рослини. Попри значний прогрес у галузі біотехнології лікарських рослин, досі недостатньо досліджено процеси індукції, росту та морфологічного розвитку різних типів культур рослинних тканин – калюсної, суспензійної, та «бородатих» коренів у контексті їхньої потенційної придатності як джерел біотехнологічної сировини. Відсутність системного порівняння цих культур у межах одного експериментального підходу ускладнює вибір найбільш ефективної системи для подальшого використання у біосинтезі вторинних метаболітів. Тому проведення комплексного дослідження процесів одержання і характеристики таких культур *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* є актуальним завданням, що сприяє вдосконаленню підходів до створення стабільних і високопродуктивних біотехнологічних систем *in vitro*.

**Мета.** Отримати та охарактеризувати калюсну, суспензійну і культуру «бородатих» коренів *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita*, в умовах *in vitro*, а також оцінити їхній біотехнологічний потенціал як джерел перспективної рослинної сировини для синтезу біологічно активних речовин.

Відповідно, було поставлені такі **завдання**:

1. Проаналізувати літературні джерела, які описують умови отримання калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita*. Отримати асептичні рослини *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* в культурі *in vitro*.
2. Ініціювати калюсну культуру *Stevia rabaudiana Bertoni* та *Mentha × piperita* і дослідити вплив складу живильного середовища та первинного експланта на частоту калюсоутворення та морфологічні особливості тканин

3. Отримати суспензійну культуру *Stevia rabaudiana* Bertoni та *Mentha × piperita* на основі калюсних тканин і оцінити показники росту у рідкому середовищі.
4. Провести агробактеріальну трансформацію експлантів *Stevia rabaudiana* Bertoni та *Mentha × piperita* за участю *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4) для отримання «бородатих» коренів.
5. Провести молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній «бородатих» коренів за допомогою ПЛР для підтвердження їх трансгенної природи.
6. Провести комплексну оцінку калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів щодо їхнього біотехнологічного потенціалу, як джерел сировини для подальшого синтезу вторинних метаболітів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Ботанічна характеристика *Stevia rebaudiana bertonii*

Стевія (*Stevia rebaudiana Bertoni*) – належить до порівняно нових сільськогосподарських культур, які набули значного поширення у сучасному рослинництві. Її інтенсивне культивування розпочалося наприкінці 1950-х років у країнах Південно-Східної Азії та Латинської Америки, після чого культура була інтродукована на території США та держав Південної Європи. У природних умовах *S. rebaudiana* зростає на напівпосушливих землях, охоплюючи як рівнинні території, так і гірські райони Центральної та Південної Америки, поширюючись на північ аж до Мексики. На сучасному етапі розвитку аграрного виробництва стевія активно вирощується як промислова культура у Китаї, Японії, Республіці Корея (з 1984 р.), країнах Південно-Східної Азії та Південної Америки, де створені сприятливі умови для масштабного виробництва рослинної сировини з високим вмістом біологічно активних речовин [1].

Клас Дводольні – *Magnolisida*

Родина – Айстрових (*Asteraceae*)

Рід – Стевія (*Stevia*)

Вид – Стевія медоносна (*Stevia rebaudiana bertonii*)

Стевія - належить до родини айстрові, представлений у флорі травами та чагарниками. На сьогодні відомо приблизно 240 видів стевії.

Стевія медоносна - багаторічна трав'яниста рослина, що має вигляд куща з високими опушеними стеблами розмірами від 60 до 120 см. Форма куща може варіюватись за формою: циліндрична, конусоподібна, овальна, куляста. Стебло та листки мають зелене забарвлення.

Листки супротивні, з коротким черешком, без прилистків, ланцетоподібні або яйцеподібні дещо загорнуті донизу з зубчастим краєм. Жилкування перистосітчасте, наявне опушення на листках, не густе. Більше опушенні листки при апексі рослини. Колір листової пластини зверху – зелений, знизу - більш світліший [2].

Має білі дрібні двостатеві квітки, що зібрані в кошик, який складається з 3 - 5 квіток, які формують складне суцвіття – щиток. Суцвіття також має свої параметри в залежності від довжини – коротке (до 2 см), середнє (2 - 8 см), довге (понад 8 см), за формою – головчасте, циліндричне, видовжено-циліндричне, та за кількістю квіток – малоквіткове (до 6 шт), середньоквіткове (6 - 12 шт), багатоквіткове (13 та більше). Квітки також характеризуються в залежності від розміру на малі (до 2 мм), середньою (3 - 4 мм), великою (понад 5 мм).

Насіння дуже дрібне, також характеризується за розміром на: мале, середнє, велике, та мають дуже малу масу. Рослинам стевії притаманне дрібне насіння, це створює проблеми у сівбі безпосередньо в ґрунт, через його малий відсоток сходження. Тому зазвичай висаджують розсаду у відкритий ґрунт. Вони проходять такі фази розвитку: стеблуння, бутонізацію, цвітіння, плодоношення, формування та досягання насіння. У зв'язку з проблематикою отримання великої кількості насіння та його низького сходження, розмноження стевії шляхом *in vitro* є доволі перспективним [3].

Коренева система є невеликою відносно поверхні ґрунту та інших культур.

Їй примана мичкувата коренева система двох типів:

1. Потовщені та вкорочені корені завдовжки 25 см, які радіально розходять від стебла.
2. Тонкі корені, що видовжені та відходять від потовщених [4].

Стевія є світлолюбивою рослиною короткого дня: за тривалості дня менше 12 годин вона переходить до цвітіння, якщо фотоперіод триває 14-16 годин спостерігається швидкий вегетативний ріст та накопичення біомаси. Стевія несприятлива до впливу низьких температур, тому в Україні її вирощують як однорічну культуру. Саджанці для подальшого висаджування у поле вирощують спочатку в умовах захищеного ґрунту [5].

## 1.2 Ботанічна характеристика *Mentha piperita*

Це стара культурна рослина виведена в Англії в 17 столітті шляхом схрещування диких видів м'яти: водяної (*Mentha aquatica*) і кучерявої або зеленої

(*Mentha spicata*), але остання можливо сама є природним гібридом, що виник з лісової (*Mentha laxiflora*) і круглолистої м'яти (*Mentha nemorosa*).

Перцеву м'яту ввели в культуру близько 300 років тому. Батьківщиною м'яти перцевої вважається Англія. В Україні її стали вирощувати на початку XVIII століття, а нині основні площі її розміщені в Чернігівській, Черкаській, Сумській, Київській та Полтавській областях. Останніми роками селекціонери створили багато сортів, які забезпечують високу врожайність фітомаси зі значним вмістом ефірної олії. Сприятливі кліматичні умови України дають змогу одержувати врожаї зеленої фітомаси в межах 250–300 ц/га і більше. Із 2–3 ц сирової маси в середньому одержують 1 кг олії, а з урожаю 150 ц/га – 55–60 кг цінної ефірної олії[6].

М'ята перцева — багаторічна трав'яниста рослина до 30–55 см заввишки. Кореневище горизонтальне, зі слабкомичкуватою кореневою системою, що проникає в ґрунт на глибину 60–80 см. На рисунку 1.1 зображено загальний вигляд м'яти перцевої.



**Рис. 1.1** М'ята перцева (*Mentha piperita*)

Стебла численні, галузисті, чотиригранні, трав'янисті, підведені, забарвлені у різний колір (залежно від сорту). Листки навхрест супротивні, короткочерешкові, яйцевидно-довгасті або ланцетні, нерівно-гостропилчасті, зісподу по жилках коротковолосисті. Центральне стебло і бокові пагони закінчуються кільчасто-колосовидним суцвіттям. Квітки дрібні, майже стерильні (плоди утворюються дуже рідко), чашечка правильна, п'ятизубчаста, з десятьма поздовжніми жилками; віночок злегка неправильний, з тупим чотири- або

п'ятилопатеvim відгином, червоно-фіолетовий, з білуватою трубчкою. Вся рослина має характерний сильний ароматно-охолоджувальний запах і смак. Плід - ценобій. Цвіте у червні–липні. Насіння утворюється лише у виняткових випадках, має дуже низьку схожість, а одержані з них сіянці внаслідок розщеплення сильно відрізняються від материнської форми[7].

Її біологічна класифікація:

Клас Евдикоти – (*Eudicots*)

Родина – Глухокропивові (*Lamiaceae*)

Рід – М'ята (*Mentha*)

Вид – Перцева м'ята (*Mentha × piperita L.*)

М'ята маловимоглива до тепла. Навесні вегетація м'яти відновлюється при температурі 2–3°C. Приморозки в цей період до мінус 8°C переносять добре, а зі сніговим покривом шаром 10–15 см – до мінус 18...20°C. У роки з теплими зимами м'ята добре перезимовує, але при температурі мінус 15–20°C без снігового покриву або спеціального вкриття вимерзає. Спочатку вимерзають надземні пагони (батого), а потім і кореневища. Оптимальна температура для росту та розвитку м'яти перцевої – 19...20°C. В умовах тривалої низької температури на рослинах зменшується кількість суцвіть і спостерігається рідке цвітіння травостою[6].

М'ята перцева дуже вибаглива до світла. Вона є рослиною тривалого дня і найкраще розвивається за достатнього освітлення. Для нормального розвитку вона потребує не менше 12 світлових годин. Якщо перенести культуру на північ, де тривалість дня збільшується, м'ята зменшує свій вегетаційний період, швидше розвивається й зацвітає. За сприятливої тривалості дня й достатнього освітлення вона формує високі врожаї надземної фітомаси з високим вмістом якісної олії. За недостатнього освітлення формується менша листкова поверхня, листки швидко відмирають і різко зменшується вихід якісної олії. Тому не варто висаджувати рослини густо, а міжряддя мають бути достатньо широкими для доброго освітлення. Садіння м'яти під плодіві культури допускається тільки в молодих садах з рідкою кроною [6].

М'ята характеризується підвищеними вимогами до родючості ґрунту та вологи. Найкраще росте вона на наносних ґрунтах у долинах річок, а також на ділянках з високим рівнем залягання ґрунтових вод, які не затоплюються навесні. Найбільш придатними ґрунтами для неї є легкі за механічним складом чорноземи та окультурені торфовища, з нейтральною реакцією сольового розчину (рН 7,0–7,5). Найкращими ґрунтами для м'яти є: чорноземи опідзолені темно-сірі та сірі лісові ґрунти, дерново-підзолисті, дерново-карбонатні, дернові ґрунти, окультурені торфовища. Не придатні для вирощування м'яти ґрунти, важкі за механічним складом, солонці, піщані, кислі, з недостатньою теплопровідністю й ті, що тривалий час затоплюються водою (понад 15–20 днів).

Розмножується м'ята кореневищами, пагонами або розсадою. Насінням її розмножують лише в селекції[6].

Уся рослина має характерний сильний аромат. Період цвітіння червень – липень.

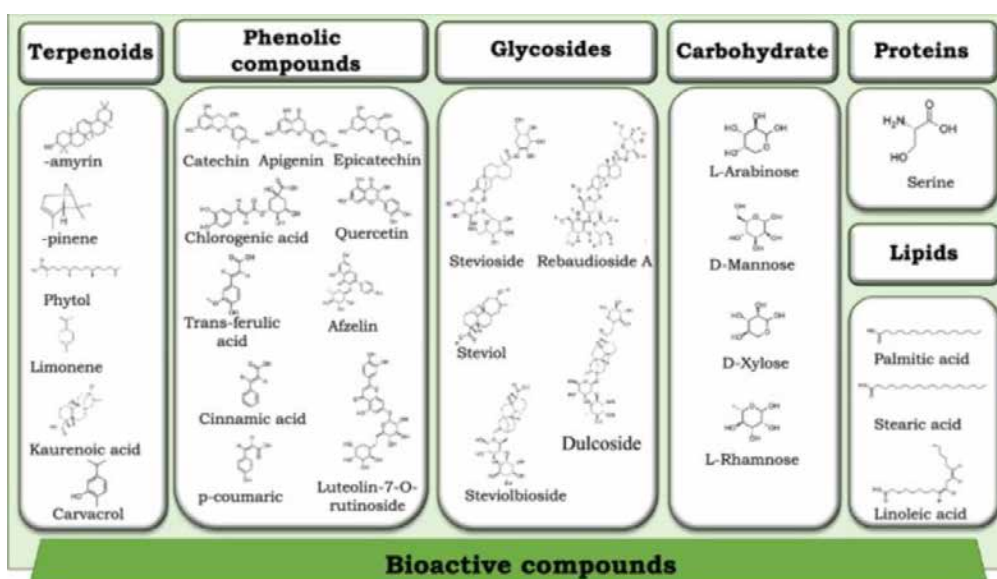
### **1.3 Біологічно активні речовини рослинної сировини**

#### **1.3.1 Основні біологічно активні речовини стевії**

Уперше сполуки були виділені у 1909 році, і лише у 1931 екстракт був очищений для отримання стевіозиду, хімічна структура якого була встановлена у 1952 році як дитерпеновий глікозид. Стевіозид описується як глікозид, що містить три молекули глюкози, приєднані до аглікону, стевіольного фрагмента. Протягом 1970-х років були виділені інші сполуки, включаючи рабаудіозид А, з підсолоджувальною силою вищою ніж у стевіозиду[8].

Листки стевії містять низькокалорійні дитерпенові глікозиди, які об'єднанні загальною назвою «стевіозиди». Їх сумарний вміст у сухій рослинній масі коливається в межах 4-20%, при цьому вміст стевіозиду становить у середньому 5-10%, рабаудіозиду А – 2-4%, рабаудіозиду С – до 1,4%, дулькозиду А – до 1% та інших сполук. Зазначені речовини характеризуються надзвичайною солодкістю: стевіозид у 210 разів солодший за сахарозу, рабаудіозид А – у 242 рази, рабаудіозид С та дулькозид А – у 30 разів [8,9].

Багато досліджень підтверджують, що листя стевії містять багато поживних речовин, з них дев'ять важливих амінокислот (аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, ізолейцин, серин, аланін, метіонін, пролін, тирозин), водорозчинні вітаміни (фолієва кислота, вітамін С, вітамін В2), шість жирних кислот (стеаринова, олеїнова, лінолева, пальмітинова, пальмітолеїнова, ліноленова), активні фітоскладові (стевіол, аустроінулін, бета-каротин, стевіозид, рибофлавін, тіамін), мінерали (кальцій, фосфор, натрій, калій, залізо, магній, цинк). Вторинні метаболіти (алкалоїди, таніни, сапоніни, стероли, тритерпени)[10].



**Рис 1.2** Біоактивні сполуки, виявлені у стевії

До рідкісніших глікозидів стевії належать пентаглікозид ребаудіозид D та гексаглікозид ребаудіозид M. Їхній вміст у висушених листках є незначним і становить близько 0,2% та 0,1% відповідно[11]. Незважаючи на низьку концентрацію ребаудіозид M набув комерціалізації та використовується компанією Coca-Cola у харчовій промисловості[12].

Останні дослідження свідчать про ідентифікацію в стевії нових глікозидів, зокрема ребаудіозидів U, T, R, S[13]. Крім того, продукти гідролізу стевіозиду – стевіол та ізостевіол – виявляють перспективність для застосування з лікувальною метою. Більшість ізольованих дитерпеноїдних глікозидів мають однаковий хімічний каркас – стевіол, проте відрізняються залишками вуглеводів у положеннях C13 та C19[14].

Окрім солодких глікозидів, листки *Stevia rebaudiana* містять широкий спектр інших біологічно цінних компонентів, зокрема білки, вуглеводи, ліпіди, клітковина, ефірні олії, вітаміни та фенольні сполуки. За даними хімічного аналізу, у 100г сухої маси листків виявлено 11,2 – 16 г білків, близько 61,9 г вуглеводів, 1,9 – 3,73 г ліпідів та 6,8 – 15,2 г клітковини[15].

Листки цієї культури містять ряд фенольних сполук із вираженим антиоксидантним властивостями. Загальний вміст поліфенолів та флавоноїдів у метанольних екстрактах становив відповідно 25,18 мг/г та 21,73 мг/г. Крім того, у листках стевії виявлено ефірні олії, багаті на пальмітинову, пальмітолеїнову, стеаринову, олеїнову, лінолеву та ліноленову жирні кислоти.

**Таблиця 1.1 Жирнокислотний склад олії листя *S. Rebaudiana*(г/100г сухої маси)[15,16]**

Жирна кислота	Korobko et al. (2008)	Atteh et al. (2011)
Пальмітинова	2,11	29,5
Пальмітолеїнова	ND	3,0
Стеаринова	2,03	4,0
Олеїнова	ND	9,9
Лінолева	9,32	16,8
Ліноленова	24,95	32,8

Важливим є і вміст водорозчинних вітамінів: вітаміну С (14,98мг/100г), вітаміну В2 (0,43мг/100г) та фолієвої кислоти (52,18мкг/100г)[16]. Листки також є джерелом макро- та мікроелементів серед яких цинк, залізо, кальцій, калій, натрій, магній та інші мінерали, необхідні для підтримання фізіологічних процесів в організмі.

### **1.3.2 Основні біологічно активні речовини м'яти перцевої**

М'ята перцева (*Mentha piperita* L.) є однією з найпоширеніших лікарських рослин, яка широко використовується у вигляді лікарських засобів, ароматичних добавок та функціональних харчових продуктів. Завдяки своєму унікальному

складу біологічно активних речовин ця культура посідає важливе місце у фітотерапії, фармації та харчовій промисловості.

Основними цінними компонентами є ефірна олія, поліфенольні сполуки, вітаміни, мінерали. Листки містять від 1,2 до 3,9 % ефірної олії, яка є головним джерелом фармакологічної активності рослини. До її складу входять ментол (33 – 60%), ментон (15 – 32%), ізоментон (2 – 8%), 1,8-цинеол (5 – 13%), ментиловий ацетат (2 – 11%), ментофуран (1 – 10%), а також лімонен,  $\beta$ -каріофілен, пулегон та карвон. Серед них ментол є ключовим компонентом, що визначає характерний аромат, охолоджувальний ефект та виражені антисептичні й спазмолітичні властивості[17].

Поліфенольний комплекс м'яти перцевої представлений переважно флаваноїдами та фенольними кислотами. Загальний вміст поліфенолів у листках становить близько 19 – 23%, з яких приблизно 12% припадає на флаваноїди. Найбільшу частку серед них займають ериоцитрин та розсарінова кислота (59 – 67%), що відомі завдяки вираженій антиоксидантній дії. Також виявлені лютеолін-7-О-рутозид, гесперидин, апігенін та інші похідні. Окрім ефірної олії та поліфенолів, у листках накопичуються каротиноїди ( $\beta$ -каротин), токофероли та аскорбінова кислота. Доведено, що вміст  $\beta$ -каротину у свіжих листках досягає 940 – 1016 ретинолових еквівалентів на 100г, що підкреслює значення м'яти як джерела провітаміну А[18].

Мінеральний склад культури є не менш цінним. Основними макроелементами у висушеній сировині є калій (до 33 г/кг), кальцій (15,3 г/кг) та магній (5,8 г/кг). Серед мікроелементів найбільше накопичуються залізо (239 мг/кг), марганець (188 мг/кг), цинк (51 мг/кг) та мідь (12 мг/кг). Крім того, виявлено значні кількості йоду (325 мкг/г), селену (147 мкг/г) та хрому (941 мкг/г), що мають важливе значення для нормалізації обміну речовин у людини. Відомо, що при приготуванні настоїв частка елементів, які переходять у розчин, коливається від 8 до 60%, причому найбільш легко екстрагуються йод і селен, тоді як залізо переходить у воду в найменших кількостях[18].

### 1.3.3 Фармакологічна та біотехнологічна цінність БАР

Рослини є унікальним джерелом біологічно активних речовин(БАР), зокрема вторинних метаболітів, серед яких виділяють алкалоїди, глікозиди, терпеноїди, феноли, флаваноїди. Ці сполуки відіграють ключову роль у сучасній фармакології, оскільки понад третина лікарських засобів має рослинне походження або використовує рослинну сировину як вихідну для синтезу. Біологічна активність таких метаболітів надзвичайно широка: вони проявляють антимікробні, антиоксидантні, протиракові, кардіопротекторні властивості[19].

Біотехнологічні підходи значно розширюють можливості отримання рослинних БАР. Зокрема, застосування культури калюсу, органів і клітин *in vitro* дозволяє забезпечити стабільне виробництво необхідних сполук незалежно від сезонності, кліматичних умов чи умов вирощування. Калюсна біомаса багатьох лікарських рослин містить не лише основні метаболіти, але й комплекс фенольних сполук та флаваноїдів із високим рівнем антиоксидантної активності, який інколи перевищує властивості традиційної рослинної сировини[20].

Особлива цінність рослинних БАР полягає в їхній хімічній різноманітності, що забезпечує появу унікальних молекулярних структур для створення нових лікарських засобів. На відміну від повністю синтетичних препаратів, природні сполуки часто характеризуються вищим рівнем біосумісності та меншою токсичністю. Доступність і відносно низька вартість роблять рослинні препарати більш конкурентоспроможними, а використання біопідсилювачів дозволяє знижувати терапевтичні дози, що зменшує навантаження на організм[21].

Попри труднощі, пов'язані зі скринінгом, виділенням та стандартизацією природних сполук, останні десятиліття демонструють відродження інтересу до рослинних БАР у фармацевтичній промисловості. Розвиток генної інженерії та сучасних аналітичних методів дозволяє швидше виявляти речовини, оптимізувати їх біосинтез і підвищувати вихід цільових продуктів. Це має особливе значення у боротьбі з антибіотикорезистентністю та пошуку нових

протипухлинних агентів, де природні молекули залишаються незамінним джерелом інновацій[22].

#### **1.4 Теоретичні основи отримання біологічно активних речовин за допомогою культури рослинних тканин *in vitro***

##### **1.4.1 Калусна культура, як основа для отримання біологічно активних речовин**

Калусною тканиною вищих рослин називають тканину, яка формується внаслідок неорганізованої проліферації клітин експлантів після першого субкультивування. Крім того, калус може утворюватися природнім шляхом у місцях механічного пошкодження рослин. Для ініціації культури калусу можуть бути використані різні типи експлантів – як цілі органи (корені, пагони, листки), так і окремі клітини або спеціалізовані тканини (ендосперм, пилкові зерна). При виборі експланту важливим чинником є вік донорної рослини: у молодих, ювенільних рослин здатність до ініціації калусу значно вища, ніж у зрілих рослин.

Загальними факторами, які визначають ефективність дедиференціації тканин експланту і розвитку первинного калусу є:

1. Генотип вихідної рослини. При цьому сорти, лінії в межах виду можуть суттєво відрізнятися.
2. Епігенетична характеристика експланту, в тому числі однорідність і неоднорідність тканини за рахунок груп різних клітин.
3. Зовнішні умови, із яких найбільш важливі екзогені регулятори росту (переважно фітогормони), а також речовини, що діють як засоби противиділення експлантом блокуючих калусогенез речовин (активоване вугілля, антиоксиданти).

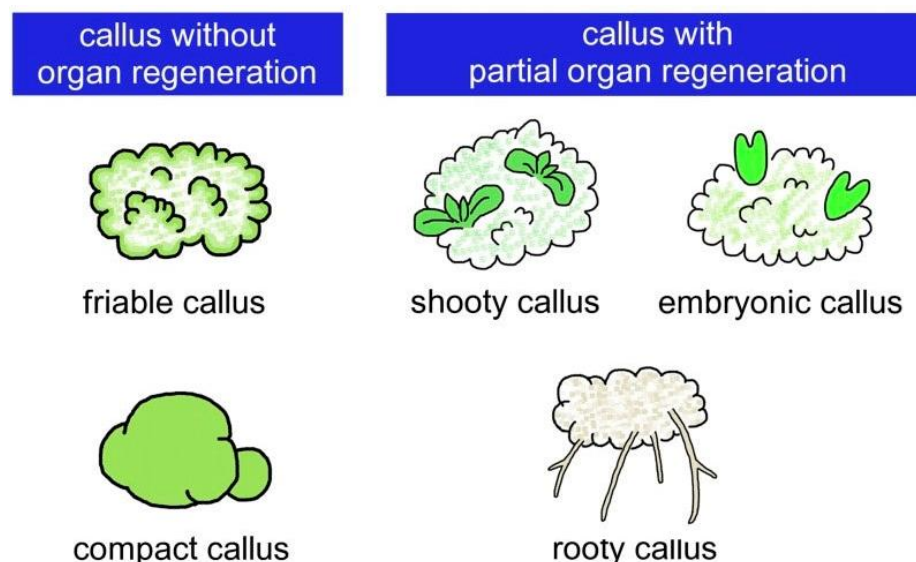
Розмір і форма експланту, як правило, не впливають на інтенсивність проліферації калусної тканини. Проте існує мінімальний критичний розмір експланту, зменшення якого унеможливорює ріст калусу, і цей показник становить 4 мг[64].

Калусна тканина, вирощена поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, яка не має чіткої анатомічної організації. Забарвлення калусу може варіюватись від білого та жовтуватого до зеленого або червоного. Залежно від походження експланту та умов культивування калусні тканини відрізняються за структурними характеристиками та щільністю.

Залежно від походження і умов вирощування калусні тканини бувають:

1. Рихлі, сильно обводнені, що легко розпадаються на окремі клітини.
2. Середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками.
3. Щільні, із зонами зредукованого камбію і судин.

Процес росту калусної тканини визначається наявністю клітин різного розміру: дрібних, середніх та великих. При перенесенні калусу на живильні середовища з індукторами органогенезу саме дрібні клітини починають активно ділитися, утворюючи меристематичні вогнища. Подальший розвиток цих осередків може призводити до формування бруньок із наступним розвитком пагонів або ініціації процесу ризогенезу (утворення коренів)[64].



**Рис 1.3** Різні типи калусних тканин

Калусні клітини та тканини, отримані в умовах *in vitro*, зберігають низку фізіологічних характеристик, притаманних вихідній рослині. Серед них відзначаються морозостійкість, адаптивність до абіотичних факторів

середовища, здатність до синтезу вторинних метаболітів. Водночас калусним клітинам властиві унікальні риси, серед яких найбільш значущими є фізіологічна асинхронність та генетична гетерогенність.

Фізіологічна асинхронність є ключовою особливістю нестатевої популяції клітин. Вона полягає в тому, що в один і той самий момент клітини перебувають у різних фазах росту й розвитку: одні активно діляться, інші знаходяться у фазі росту, тоді як інша частина клітин старіє. Саме тому оцінка фізіологічного стану калусної культури здійснюється на основі аналізу більшості клітин популяції. Причинами виникнення асинхронності можуть бути: видові та сортові особливості, генотип рослини чи експланту, стресові фактори культивування, зміни в балансі ендогенних та екзогенних фітогормонів, генетична гетерогенність клітин та клонів, а також аномалії мітотичного циклу. Значний вплив мають і фізичні умови культивування – температура, освітлення, вологість. Асинхронність - стійка властивість популяції калусних клітин. Якщо за допомогою специфічного впливу синхронізувати клітинну популяцію, то вже через 3-4 поділи вона знову стає асинхронною.

Іншою важливою властивістю є генетична гетерогенність, що відображає геномну нестабільність популяції. Генетично стабільними залишаються переважно клітини меристематичних тканин, тоді як у клітинах інших типів під час тривалого культивування можуть виникати поліплоїдія, анеуплоїдія, хромосомні аберації та генні мутації. Генетична гетерогенність - необхідна умова існування популяції клітин і слугує основою для їх адаптації.

Причинами генетичної гетерогенності є:

1. Генетична гетерогенність первинного матеріалу. У рослинах клітини характеризуються різною плідністю, диплоїдні тільки меристематичні клітини, які активно діляться.
2. Порушення корелятивних зв'язків при виділенні первинного експланта.
3. Дія компонентів середовища. Екзогенні гормони й стимулятори можуть здійснювати мутагенний вплив.

4. Довге субкультивування, при якому накопичуються генетичні зміни у калусних клітинах[23].

Культура калусу є добре апробованим методом *in vitro* для маніпуляцій з рослинними клітинами. Вона ґрунтується на індукції дедиференціації рослинних експлантів, найчастіше листових, на живильному середовищі, яке містить високі концентрації ауксинів або поєднання ауксину з цитокініном. Такий підхід розглядається як перспективна альтернатива отриманню вторинних метаболітів, зокрема тих, що локалізуються переважно в листках. Процес передбачає ініціацію калусних культур з листових експлантів у контрольованих лабораторних умовах. Ключове значення має склад поживного середовища, адже саме оптимальне співвідношення ауксину та цитокініну забезпечує дедиференціацію клітин і подальшу проліферацію калусної тканини. У ході ростового циклу калусу синтез вторинних метаболітів найчастіше досягає максимуму у стаціонарній фазі, тому саме на цьому етапі проводять збір культури з метою отримання найбільшого виходу біологічно активних сполук. Після збору калус висушують і піддають екстракції, а одержані витяжки аналізують за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (ВЕРХ–МС) чи інших методів, що дозволяють ідентифікувати та кількісно визначати цільові метаболіти. Для промислового масштабування та підвищення продуктивності калусні культури часто переводять у суспензійні. Такий підхід базується на перенесенні калусу у рідке середовище у колбах зі струшуванням або у біореакторах, що забезпечує покращене аерування, масоперенесення і рівномірність культури. Це дозволяє значно підвищити ефективність синтезу необхідних вторинних метаболітів[24].

#### **1.4.2 Суспензійна культура: особливості росту та метаболізму**

Суспензійні культури – це одиночні клітини або їх групи клітин в рідкому середовищі, які утворюють гомогенну популяцію, що піддається впливу хімічних речовин. Суспензійну культуру клітин отримують шляхом перенесення калусної тканини, попередньо вирощеної на твердому агаризованому живильному середовищі, у рідке середовище. При цьому як інокулянт використовують

первинний калус, що характеризується пухкою структурою та здатністю розпадатись на окремі агрегати. Для запобігання потраплянню великих клітинних агрегатів перед висіванням клітинну масу додатково очищують методом фільтрації або відстоювання. Після цього суспензію вносять у рідке середовище, яке підтримується у стані постійного перемішування з метою забезпечення рівномірного розподілу клітин та оптимальних умов для їхнього росту і розвитку.

У лабораторній практиці клітинні суспензії зазвичай культивують у колбах на шейкерах із швидкістю обертання 100 – 120 об/хв. За таких умов забезпечується інтенсивна аерація культури та рівномірне перемішування середовища, що сприяє подрібненню агрегатів калусних клітин на менші фрагменти й окремі клітини. Для отримання 100 мл суспензії використовують 2 – 3 г свіжої калусної тканини.

Важливою умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування або струшування поживного середовища. У разі відсутності руху клітини активно діляться, але замість підтримання суспензійного стану це призводить до формування вторинної калусної тканини. Стабільний мітотичний поділ у суспензійних культурах забезпечується присутністю в середовищі ауксинів та цитокінінів – фітогормонів, що відіграють ключову роль у запуску калусогенезу та підтриманні росту типових калусних клітин, які лежать в основі суспензійної культури[25].

Фактори, що визначають процес дисоціації калусної тканини:

1. Тип вихідного калусу. Найбільш придатною вважається калусна тканина пухкої структури, яка легко піддається фрагментації. Досягти рихлості можливо шляхом виключення цитокінінів із живильного середовища.
2. Умови вирощування. Фактори, що знижують механічну стабільність клітинних стінок і послаблюють їх міжклітинні зв'язки, сприяють підвищенню рихлості тканини.

3. Видалення пектинату кальцію. Оскільки він є основним компонентом, що забезпечує зв'язування рослинних клітин, його усунення полегшує дисоціацію. Це може здійснюватися вилученням кальцію з середовища ферментативно, або зв'язуванням його з хелатами. Хелатуючий агент – оксалат амонію.

Важливою відмінністю суспензійної культур рослин є їхня висока щільність, яка є необхідною умовою для нормального росту. Під час культивування клітин надзвичайно важливим є підтримання в'язкості середовища та створення оптимальних умов для приросту біомаси. У процесі збільшення клітинної маси відбувається явище адгезії - злипання клітин між собою та з поверхнями культуральних посудин. У верхніх шарах середовища поступово формується піна, до складу якої входять білки та полісахариди, що виділяються клітинами. Частина клітин концентрується у цій піні, утворюючи характерну плівку або так звану «кірку». З ростом біомаси товщина цієї плівки зростає, що негативно впливає на ефективність аерації та інтенсивність перемішування. У разі значного накопичення така структура може призвести до загибелі культури[25].

Клітинні суспензії, подібно до калюсних культур, характеризуються S-подібною кривою росту. Середня тривалість одного пасажу становить 14 – 16 діб. За цей час щільність клітинної популяції підвищується з  $5 \times 10^4$  до  $5 \times 10^6$  клітин/мл. Оптимальний матеріал для субкультивування відбирають наприкінці експоненціальної фази, коли клітини зберігають найбільшу активність і здатність до подальшого поділу. Основними показниками росту суспензійної культур вважають збільшення кількості клітин, а також наростання її біомаси.

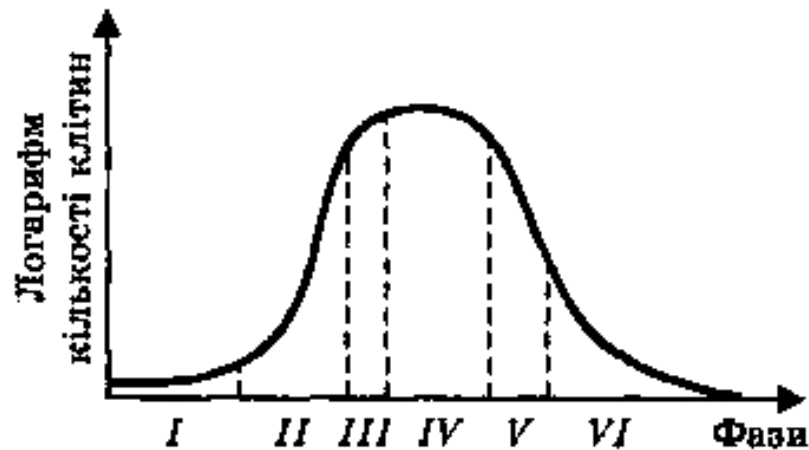


Рис 1.4 S-подібна крива росту клітинної суспензії

1. Лаг фаза(I) Видиме зростання інокулята не спостерігається ні по одному з критеріїв. При цьому спостерігається висока інтенсивність дихання, поглинання води і поживних речовин, максимальні значення енергетичного рівня, інтенсивний синтез ДНК, РНК, білків та інших компонентів клітини, але низький мітотичний рівень. Тривалість періоду адаптації залежить від кількості і фізіологічного стану інокулята і умов культивування.

2. Експоненціальна фаза(II). Характеризується зростанням з максимальною швидкістю, максимальними величинами мітотичної активності, а також переважанням дрібних клітин меристематичного типу. Можна виділити ранню і пізню експоненціальні фази. Протягом ранньої спостерігається ряд цитологічних змін: в клітинах зникає велика вакуоль, відбувається збільшення обсягу цитоплазми, числа рибосом і мітохондрій. Активується клітинний метаболізм. У пізній експоненціальній фазі спостерігається уповільнення клітинного поділу, але збільшення розміру клітин.

3. Фазу уповільнення зростання(III) Пов'язана з субстратним обмеженням і пригніченням продуктами обміну, характеризується незбалансованим зростанням популяції за основними критеріями, зниженням рівня дихання, переходом частини клітин в диференційований стан, збільшенням частки великих вакуолізованих клітин. Збільшується синтез вторинних метаболітів (серцевих глікозидів, антрахінона, диосгеніна та ін.

4. Стаціонарна фаза(IV) Характеризується ще малою швидкістю деградації клітин, яка врівноважується поділом клітин, високими біосинтетичними і біотрансформаційним потенціями життєздатних диференційованих клітин, низьким рівнем дихання і появою надзвичайно великих вакуолізованих клітин. До цього періоду суспензійна культура досягає максимуму сухого ваги. В середньому від початку культивування до стаціонарної фази проходить 21-28 діб.

5. Фазу деградації клітин(V) Характеризується питомою швидкістю росту, що приймає негативне значення.

У суспензійних культурах клітин синтез вторинних метаболітів зазвичай відбувається у два етапи. Спершу клітини проходять фазу інтенсивного росту, що забезпечує формування зрілої популяції, здатної продукувати цільові сполуки. На другому етапі безпосередньо індукується біосинтез вторинних метаболітів[26].

### **1.4.3 Культура «бородатих» коренів як перспективний біотехнологічний інструмент**

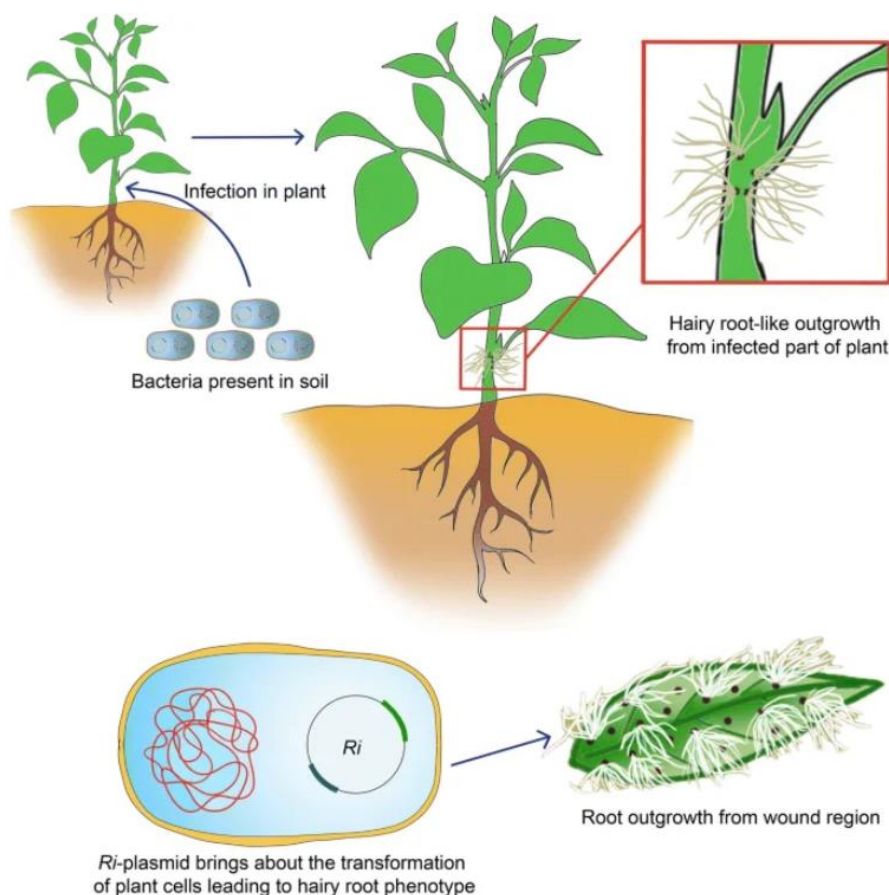
Культура «бородатих» коренів – це різновид тканинної культури, яка ґрунтується на інфікуванні експлантів рослин ґрунтовою грамнегативною бактерією *Agrobacterium rhizogenes*. Такі культури відзначаються високою генетичною стабільністю, інтенсивним ростом без потреби у додаванні екзогенних фітогормонів, а також здатністю до активного синтезу вторинних метаболітів. Крім отримання цінних біологічно активних сполук, культура «бородатих» коренів використовується як ефективна система для експресії рекомбінантних білків і дослідження метаболічних процесів у рослин. Також вона має практичне значення у вивченні процесів фіторемедіації та дозволяє глибше зрозуміти генетичні, молекулярні й біохімічні аспекти трансформації рослин[27].

Інфікування рослин *A. rhizogenes* призводить до утворення характерний «бородатих» коренів у місцях проникнення бактерії, що зумовлено інтеграцією плазмідної Т-ДНК, яка містить онкогенні локуси *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*)[31].

Використання ґрунтових бактерій *Agrobacterium rhizogenes* дає змогу отримати у такий спосіб не тільки культури «бородатих» коренів, які характеризуються швидким гормонезалежним ростом, а й створити корені, здатні синтезувати біологічно активні сполуки. Кількість цих сполук, синтезованих у клітинах трансформованих коренів, може значно перевищувати їх кількість у контрольних рослинах. Такий ефект стимулювання синтезу є результатом трансформації, в процесі якої переносяться власні гени агробактерій (rol гени)[28].

Процес трансформації можна розділити на такі етапи:

1. Фенольні сполуки, що сприймаються бактеріями, вивільняються експлантом рослини після поранення, активуючи прикріплення бактерій до експланта/клітин.
2. У бактеріальних клітинах відбувається Т-ДНК і формування Т-комплексів, що включають Т-ланцюги та асоційовані білки.
3. Перенесення Т-комплексів у клітини рослини-господаря та інтеграція Т-ДНК в геном.
4. Включення та експресія Т-ДНК у геномі рослини.
5. Поширення трансформованих структур з місця інфекції-порізу[29].

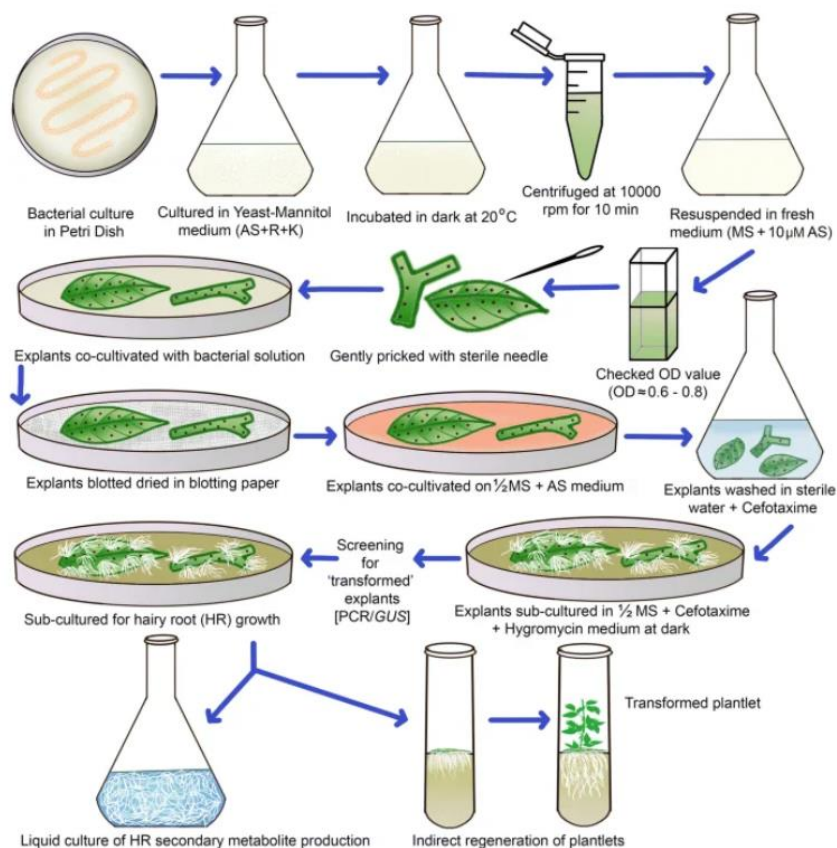


**Рис 1.5** Схематичне зображення індукції волосистих коренів у рослин бактеріями *Agrobacterium rhizogenes* у природних умовах[30]

Основні етапи отримання культур «бородатих коренів»:

1. Пошкодження експланта. Рослинний матеріал піддають механічному ушкодженню за допомогою стерильного скальпеля та інокують бактеріальну суспензію.
2. Культивування з бактеріями. Експланти розміщують на напівтвердому живильному середовищі з додаванням антибіотиків(цефатоксим), що дозволяє усунути надлишкові бактерії з поверхні.
3. Індукція коренів. Через 7-30 днів на місці пошкодження утворюються кореневі відростки.
4. Пересадка культури. Отриманні корені пересаджують на безгормональне середовище, або з невеликим додаванням ауксинів, що забезпечує їх подальший розвиток.
5. Стимуляція вторинного метаболізму. Для підвищення синтезу біологічно активних сполук у живильне середовище додають амоній, фосфати,

нітрати, що активують вторинний метаболізм у трансформованих культурах[27].



**Рис 1.6** Схематичне зображення етапів індукції «бородатих» коренів за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* та регенерації трансформованих рослин[30]

Вторинні метаболіти знаходять широке застосування фармацевтичні препарати, агрохімікати, ароматизатори, барвники та пестициди. Через надзвичайно складну будову отримати шляхом хімічного синтезу в економічно вигідний спосіб практично неможливо. Саме тому використання культур «бородатих» корені розглядається як ефективний підхід для синтезу вторинних метаболітів у значних кількостях. Присутність будь-яких генів *rol*, особливо *rolB*, має вирішальне значення, оскільки було доведено, що вони є потужними індукторами вторинного метаболізму рослин [32].

## **1.5 Перспективи використання стевії та м'яти у різних сферах та галузях промисловості**

### **1.5.1 Застосування стевії у харчовій промисловості**

У 2004 році фахівці Всесвітньої організації охорони здоров'я затвердили використання стевії як харчової добавки, а у 2006 році довели її повну безпечність. Проводились дослідження дитерпенових глікозидів стевії на тваринах та людях, враховуючи їх результати не було підстав для свідчень, що стевіозид та реудіозид є генотоксичним та канцерогенними сполуками. У 2007 році стевію включили до Codex Alimentarius, що свідчить про її відповідність до міжнародним стандартам безпечності. У 2010 році було прийнято рішення про безпечність застосування стевіоглікозидів як харчової добавки в європейській харчовій промисловості Європейським управлінням з безпеки харчових продуктів.

У 2008 році Адміністрація з контролю за продуктами харчування і ліками США (FDA) дозволила широке використання очищеного ребаудіозиду А як підсолоджувача у харчовій галузі через його високу безпечність при постійному вживанні. Йому був присвоєний Е-номер у вигляді Е 960. У 2015 році, після аналізу результатів, FDA було повідомлено, що нема підстав для заборони використання очищених препаратів стевії у їжі. Харчові добавки на основі стевії мають дозвіл на використання в багатьох країнах. Препарати з листя стевії широко використовуються для приготування різноманітних страв таких як десерти, морозиво, вафлі, жувальні гумки, соки, напої, соуси, рибні пасти та дієтичні продукти. В порівнянні з штучними підсолоджувачами, стевіозид не втрачає своїх властивостей під час нагрівання, тому його використовують для приготування кондитерських виробів та гарячих напоїв.

Порошок з листя стевії має об'ємну густину 0,443 г/мл, водоутримуючу здатність 4,7 мл/г, здатність до поглинання ліпідів 4,5 мг/г, значення емульгування 5,0 мл/г, індекс поглинання вологи 5,01 г/г, розчинність 0,365 г/г, рН – 5,95. Підвищена водоутримуюча здатність порошку листя стевії може бути пов'язана з високим вмістом білка, що є важливим при приготуванні в'язких продуктів,

таких як супи, соуси, тісто та хлібобулочні вироби. Здатність білка стевії утворювати та стабілізувати емульсії також має вирішальне значення при виробництві та приготуванні багатьох харчових продуктів, таких як торти, масло, вершки до кави, молоко, заморожені десерти. Ця властивість в значній мірі визначається складом, а також способом кулінарної обробки продукту. Порошок з листя стевії має достатній потенціал поглинання жиру, що дозволяє йому відігравати важливу роль у харчовій промисловості, оскільки жир діє як харчова добавка (ароматизатор) і підсилює смак продуктів[33].

Компанії Coca-Cola і Cargil, Inc. Працюють над створенням та розповсюдженням підсолоджуючих речовин зі стевії – стевіозиду та ребаудіозиду А. Ребіана (ребаудіозиду А високої чистоти) стабільніший за аспартам та неотам при низькому та високому значенні рН[34].

Використання стевії у виробництві хлібопекарських виробів є також перспективним. Усі продукти можуть бути підсолоджені деякою кількістю порошку стевії. Встановлено, що застосування водної витяжки стевії дозволяло повністю замінити цукор у хлібові зі збереженням його якості. Хліб з додаванням витяжки мав високі споживчі якості, а термін його зберігання збільшувався на 5-7 днів[35].

### **1.5.2 Застосування стевії у медицині та фармацевтичній промисловості**

Висновок Міністерства охорони здоров'я України в ході проведених гігієнічних, мікробіологічних, біохімічних, медикобіологічних, морфологічних, фізико-хімічних досліджень показав, що глікозиди стевії мають корисні властивості, такі як зниження артеріального тиску, підтримка імунної системи, антибактеріальну дію та ряд інших. У порівнянні зі синтетичними замінниками цукру, які використовуються в промисловості, стевія вважається абсолютно безпечною навіть при тривалому вживанні [36]. Через це вона знайшла широкий спектр використання у медицині, а препарати на її основі виробляються фармацевтичними підприємствами.

Багато досліджень підтверджують, що листя стевії містять багато поживних речовин, з них дев'ять важливих амінокислот (аспарагінова кислота,

глутамінова кислота, лізин, ізолейцин, серин, аланін, метіонін, пролін, тирозин), водорозчинні вітаміни (фолієва кислота, вітамін С, вітамін В2), шість жирних кислот (стеаринова, олеїнова, лінолева, пальмітинова, пальмітолеїнова, ліноленова), активні фітоскладові (стевіол, аустроінулін, бета-каротин, стевіозид, рибофлавін, тіамін), мінерали (кальцій, фосфор, натрій, калій, залізо, магній, цинк). Вторинні метаболіти (алкалоїди, таніни, сапоніни, стероли, тритерпени) [10]. На основі всіх цих речовин і формуються її основні види застосування у медицині та препарати, які виробляються на їх основі.

### **Антигіперглікемічний ефект**

Стевія впливає на бета-клітини підшлункової залози, де вона покращує чутливість до інсуліну та сприяє його виробленню. Стевіозид може регулювати рівень глюкози в крові, підвищуючи не лише рівень інсуліну, але й покращене його використання при дефіциті. Стевіозид також знижує рівень глюкози в крові після їжі. Кілька клінічних випробувань, проведених на добровольцях, показали, що екстракт листя стевії можуть підвищувати глюкозотолерантність у людей. Через це, стевія може бути використана у лікуванні цукрового діабету 2 типу[37].

### **Протидіабетичне застосування**

Дослідники зосереджуються на створенні ліків, які мають відповідати двом основним умовам. По-перше, вони повинні підвищувати виділення інсуліну, по-друге, вони повинні бути доступні та недорогі для людей в країнах, що розвиваються. Відомо, що тривалий вплив жирних кислот на бета-клітини порушує їхню активність, що призводить до розвитку діабету. Про наслідки їх впливу на активність альфа-клітин і гени, що відповідають за обмін жирних кислот мало відомо. У цьому аспекті досліджувалась роль стевіозиду, і дійшли висновку, що стевіозид компенсує гіперсекрецію альфа-клітин, а й підвищує активність генів, що відповідають за окислення, перетворення та виведення жирних кислот, що свідчить про його потенційну ефективність як протидіабетичного засобу [38].

Крім того, звітують про інсулінотропну активність стевіозиду та стевіолу, яка залежить від концентрація наявної глюкози. Обидві ці сполуки

продемонстрували тривалу та зворотну інсулінотропну активність при наявності 16,7 ммоль/л глюкози. Крім того, ці глікозиди мають позитивний ефект на виділення інсуліну, діючи безпосередньо на бета-клітини, що підтверджує стевіозид і стевіол є потужними антигіперглікемічними засобами[10].

### **Антиоксидантна дія**

Стевія є потенційним джерелом антиоксидантів. З її екстрактів отримано кілька антиоксидантів, включаючи кемпферол, кварцетин та опігенін, які захищають ДНК від пошкоджень. Ізостевіол інгібує проліферацію клітин, спричинену ангітензином II, та виділенням ендотеліну I, а також зменшує утворення реактивних форм кисню. Тому він може бути корисним у лікуванні або профілактики захворювань таких як, рак, проблеми з репродукцією. Чотири ізоляти глікозидів – стевіозид, ребаудіозиди А і С та дулькозид А мають сильний інгібіторний ефект на запалення, спричинений 12-0-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТРА) у мишей, що свідчить про їхню протиракову дію[39].

### **1.5.3 Застосування м'яти у харчовій промисловості**

Ефірні олії м'яти набувають дедалі більшого поширення у харчовій промисловості завдяки вираженим антимікробним та антиоксидантним властивостям. Їх активно застосовують як природні ароматизатори у напоях та продуктах харчування, а ментол, використовують у виробництві кондитерських виробів, жувальних гумок, освіжувачів рота, зубних паст[40]. Доведено, що ефірні олії, здатні пригнічувати ріст фітопатогенних грибів, таких як *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, які спричиняють псування плодів і овочів під час зберігання. Особливу ефективність показало комбіноване застосування м'ятної ефірної олії з хітозаном, яке значно знижувало розвиток пліснявих грибів на поматах та винограді, а також антрактнозних уражень манго[41]. За ефективністю такі натуральні покриття виявилися співставними або навіть не поступалися синтетичним фунгіцидам, що робить її альтернативою хімічним засобам захисту у харчовій промисловості.

Ефірна олія ефективно пригнічує розвиток патогенних бактерій (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*) у фруктових соках, а також виявляє

інгібуючий ефект проти дріжджів, що викликають псування харчових продуктів[42]. У м'ясній промисловості ефірна олія проявляє виражену антимікробну активність проти *E.coli* O157:H7 та *Staphylococcus aureus*, знижує ріст бактерій у фарші, зменшує інтенсивність окиснення ліпідів і сприяє збереженню кольору, запаху та зовнішнього вигляду м'яса під час зберігання[43].

#### **1.5.4 Застосування м'яти у медицині та фармацевтичній промисловості**

М'ята перцева широко використовується у лікувально-профілактичних заходах, спрямованих на боротьбу з різними захворюваннями. Препарати на основі ментолу чи ефірної олії м'яти виявляють заспокійливу, знеболювальну, протизапальну дію. Їх призначають як безпечний потогінний, бактерицидний та анальгезуючий засіб при станах, що супроводжується підвищеною температурою, болем чи запаленням слизових оболонок носоглотки та ротової порожнини. Ефірна олія м'яти ефективно застосовується при ринітах, фарингітах, тонзилітах, стоматитах та інших запальних процесів дихальних шляхів. Також використовується при лікуванні захворювань сечостатевої системи, шлунка та печінки[44].

#### **Антиоксидантна дія**

Антиоксидантна дія м'яти перцевої тісно пов'язана з наявністю в її складі біологічно активних сполук, здатних ефективно нейтралізувати вільні радикали та зменшувати впливи окисного стресу. У проведених дослідженнях встановлено, що серед різних видів роду *Mentha* саме м'ята перцева демонструє найсильнішу радикал-знешкоджуючу здатність, зокрема високу ефективність у DPPH-тесті. Різні екстракти цієї рослини показали антиоксидантну активність на рівні 70-93 %. Завдяки такій дії м'ята перцева сприяє збереженню структурної цілісності клітин, захищає мембрани від перекисного окислення та підтримує баланс антиоксидантних ферментів організму. Її екстракти підвищують рівень каталази, глутатіону та пероксидази, що забезпечує додатковий захист печінки та серцево-судинної системи від ушкоджень, спричинених токсичними сполуками чи метаболічними порушеннями[45].

#### **Протидіабетичне застосування**

У низці експериментальних досліджень підтверджено, що м'ята перцева проявляє виражену антидіабетичну дію. Так, внутрішнє введення інфузії м'яти перцевої з саліциловою кислотою протягом чотирьох тижнів у діабетичних щурів знижувало рівень глюкози в крові й сечі, а також зменшувало концентрацію альбуміну, сечовини та сечової кислоти в сечі. Інші дослідження показали, що екстракт листя м'яти сприяв значному зниженню рівня глюкози в крові та одночасно підвищував рівень інсуліну як у здорових тварин, так і у щурів з експериментально індукованим діабетом[46].

Хоча точний механізм цієї дії ще остаточно не з'ясований, експериментальні дані підтверджують багатофакторний вплив м'яти перцевої. Зокрема, застосування олії м'яти в дозах 100–250 мг/кг знижувало рівні глюкози, тригліцеридів, холестерину, ліпопротеїнів дуже низької щільності (VLDL) та низької щільності (LDL) у крові. Це свідчить про потенціал м'яти перцевої як природного засобу для корекції гіперглікемії та порушень ліпідного обміну, що є ключовими патогенетичними ланками розвитку цукрового діабету[47].

### **1.6 Методи аналізу біологічно активних речовин та підтвердження трансгенності культур *in vitro***

У сучасній біотехнології рослин особливу увагу приділяють методам аналізу біологічно активних речовин та підтвердженню трансгенності отриманих культур. Аналіз БАР є важливим етапом у дослідженні, спрямованих на вивчення та використання рослинних метаболітів з медичних, фармацевтичних та харчових цілях. Застосування культур рослинних тканин *in vitro* дозволяє отримувати стабільні джерела БАР, що можуть бути використанні для подальших досліджень та виробництва. Методи аналізу БАР включають різні техніки, такі як екстракція, очищення, детекція та верифікація, які мають свої особливості в залежності від цілей дослідження. Екстракція дозволяє виділити цільові сполуки з клітинної маси або рідини культивування, очищення забезпечує видалення сторонніх компонентів, а детекція ідентифікує(якісно) та кількісно оцінює склад екстракту. Верифікація підтверджує трансгенність отриманих культур, що особливо важливо при роботі з «бородатими» коренями або іншими

трансформованими рослинними системами. Це є комплексна оцінка продуктивності культур *in vitro*.

Екстракція є одним із ключових методів виділення біологічно активних речовин з культур рослинних тканин, оскільки дозволяє перевести цільові сполуки з клітинного матриксу у рідке середовище. Принцип методу ґрунтується на явищах дифузії та різниці у полярності між розчинником і речовиною: речовини, що мають подібну полярність до розчинника, переходять у нього більш ефективно. Вихід екстракту значною мірою залежить від таких факторів, як температура, час екстракції, ступінь подрібнення рослинної сировини та співвідношення маси матеріалу до об'єму розчинника[48]. Для класичних екстракцій застосовують полярні розчинники - воду, етанол, метанол, які ефективно вилучають фенольні сполуки, флавоноїди та інші глікозидні метаболіти, менш полярні розчинники(ацетон, хлороформ, гексан) використовують для ізоляції алкалоїдів, ефірних олій чи ліпофільних сполук[49]. Останнім часом дедалі більшої уваги набувають сучасні методи, спрямовані на підвищення ефективності процесу та зменшення використання токсичних речовин: ультразвукова екстракція(UAE), мікрохвильова екстракція(MAE), а також застосування нових екологічно безпечних розчинників, надглибокі евтектичні системи(NADES)[50].

Після екстракції БАР потрібно провести її очищення для видалення нерозчинних часток, білків, полісахаридів та інших домішок, що можуть впливати на точність подальшого аналізу та чистоти вихідного продукту. Початкові етапи очищення включають фільтрацію та центрифугування, які дозволяють видалити грубі домішки та частки, роблячи екстракт придатним для більш тонкого очищення. Фільтрація через фільтри з розміром пор 0,5 – 1 мкм є ефективною для видалення дрібних часток, тоді як центрифугування допомагає осадити важчі компоненти та концентрувати цільові продукти в надосадовій рідині. Для більш тонкого очищення проб застосовують різноманітні сорбційні та хроматографічні методи, включаючи твердофазну екстракцію, іонообміну

хроматографію, гель-хроматографію та високоефективну рідинну хроматографію[51].

Після очищення екстрактів рослин наступним етапом є детекція біологічно активних речовин, що включає ідентифікацію та кількісне визначення. Серед основних методів виділяють:

1. Тонкошарову хроматографію(ефективна для попереднього скринінгу та розділенню компонентів за полярністю)

2. Високоефективна рідинна хроматографія (забезпечує точну ідентифікацію та кількісне визначення сумішей біологічно активних компонентів. Її використовують для аналізу флавоноїдів, фенольних сполук та інших в екстрактах.

3. Газова хроматографія(використовується для аналізу летких термостабільних сполук, ефірні олії)

4. Спектрофотометричний метод(дозволяє кількісно оцінити наявність речовини в суміші за оптичною густиною)[52,53].

Для підтвердження трансгенності рослинних культур, зокрема «бородатих коренів», одним із найпоширеніших методів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Даний підхід базується на специфічному розпізнаванні та ампліфікації ділянок ДНК за допомогою праймерів, які є комплементарними до генів, інтегрованих у геном рослини. Найчастіше ідентифікацію трансформації здійснюють за генами *rolA*, *rolB*, *rolC*, характерними для *Agrobacterium rhizogenes*, що відповідають за індукцію ризогенезу та формуванню характерного фенотипу «бородатих коренів». Отримання специфічних ампліконів певного розміру на електрофореграмі свідчить про успішну інтеграцію відповідних фрагментів у геном рослини [54]. Для підвищення достовірності перевірки паралельно використовують праймери до бактеріальних генів, наприклад *vir*-гена, відсутність яких у ПЛР-продуктах підтверджує, що реакція виявляє саме інтегровані трансгени, а не залишкову бактеріальну ДНК. Також щоб уникнути хибнопозитивних результатів обов'язковим є використання контролів.

Позитивний контроль(плазмідна ДНК, або відома трансгенна лінія) та негативний контроль(ДНК нетрансформованої рослини)[55].

### **1.7 Порівняльна характеристика типів рослинних культур, як сировини для синтезу вторинних метаболітів *in vitro***

Розвиток біотехнології рослин відкрив можливість синтезу вторинних метаболітів в умовах *in vitro*. Для такого процесу найчастіше застосовують різні типи культур, а саме калюсну, клітинну суспензію, та культуру трансформованих «бородатих» коренів. Кожен з цих типів відрізняється рівнем морфологічної організації, швидкості росту, стабільністю біосинтетичних процесів і придатністю до масштабування.

Калюсна культура - це недиференційована маса клітин рослини, яка утворюється *in vitro* під дією регуляторів росту(ауксинів і цитокінінів), на різних типах експлантів(корені, листки, стебла). Використання калюсу у біотехнології рослин є найпоширенішим, забезпечує можливість підтримання та регулювання росту у контрольованих умовах.

Ініціація калюсу зазвичай досягається завдяки оптимальному співвідношенню регуляторів росту, що стимулюють клітинну проліферацію та втрату диференціації. Простота індукції з різних органів рослини робить її зручною моделлю для подальших досліджень і відбору висопродуктивних ліній. Водночас така морфологічна недиференційованість може призводити до втрати органоспецифічного синтезу сполук, а довготривале культивування супроводжується соматональними варіаціями та зниженням стабільності метаболічної активності[57].

Ініціація калюсу зазвичай здійснюється шляхом культивування експланта на середовищі МС з різними концентраціями та співвідношеннями ауксинів і цитокінінів. Для стевії було виявлено, що культури, отримані на середовищі з 2 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л БАП, демонстрували значний приріст біомаси, з якої можна було отримати стевіозид. Подальший аналіз показав, що при вирощуванні калюсів стевії на білому світлі з фотоперіодом 16 год світла, 8 год темрява, забезпечило максимальну індукцію з 92,73 % експлантів, а суха біомаса досягла

5,78 г/л на 18 добу, що супроводжувалось підвищеним загальним вмістом фенолів(102,32 мкг/г) та флаваноїдів(22,07 мкг/г)[58]. Для м'яти у дослідженнях, було виявлено, що при додаванні БАП у живильне середовище давало змогу підвищити вміст ефірних олій на 40%, а додавання саліцилової кислоти підвищує рівень ментолу, завдяки регуляції генної експресії біосинтетичних шляхів[59].

Разом із перевагами – відносно простою схемою індукції калюсу, можливістю модифікувати умови росту та стимулювати синтез метаболітів, ці культури мають певні обмеження. У багатьох дослідженнях застосування елістиролів до калюсних культур не приводило до значних зростань концентрацій цільових вторинних метаболітів. Морфологічна недиференційованість калюсу може призводити до втрати внутрішньої біосинтетичної спеціалізації тканини, яка притаманна саме конкретному органу рослини, що негативно впливає на спектр та кількість синтезованих сполук. Через свій морфологічний стан, а саме щільну структуру тканина у тканинах калюсу спостерігались труднощі з масообміном(обмежена дифузія поживних речовин), що ускладнює масштабування до великих об'ємів(якщо використовувати калюсну культуру).

Суспензійна культура – це система культивування рослинних клітин або дрібних клітинних агрегатів у рідкому живильному середовищі з активним перемішуванням або аерацією, що дозволяє підтримувати їх у стані проліферації. Інколи їх ототожнюють з терміном «хімічної фабрики» для виробництва вторинних метаболітів, але низька продуктивність, у деяких випадках, невід'ємною перешкодою їх масштабного впровадження.

Одна з переваг цієї системи – можливість контролю ключових факторів культивування, а саме: середовище(рН, поживні речовини), світло, ступінь перемішування, аерація, це сприяє відтворюваності та стандартизації процесу. Суспензійна культура характеризується відносно швидким приростом біомаси та маніпулюванням умовами культивування.

Втім, кілька критичних обмежень залишаються значними: неоднорідність клітинної популяції призводить до змінної продуктивності, генетична або

епігенетична нестабільність високопродуктивних ліній може призвести до зменшення виходу з часом (падіння продуктивності з пасажми), масштабування процесу до біореакторного об'єму супроводжується проблемами з аерацією, перемішуванням та контролем рН. Для подолання цих бар'єрів рекомендовано використовувати такі методи: застосування прекурсорів синтезу вторинних метаболітів, чіткий контроль за генетичною стабільністю ліній, оптимізація середовищ, покращення конструкцій та технологічного оснащення біореакторів[60].

«Бородаті» корені формуються після інфікування екслантів *Agrobacterium rhizogenes*, коли T-ДНК Ri-плазмиди інтегрується в геном рослини й індукує ріст численних кореневих утворень. Такі культури відзначаються швидким ростом, генетичною та біохімічною стабільністю і здатністю рости на середовищах без додавання регуляторів росту. «Бородаті» корені стабільно ростуть без екзогенних регуляторів росту, що саме по собі зменшує вартість на підтримання культури, порівняно з культурами (калюсна, суспензійна), де це є обов'язковою умовою для успішної індукції та росту системи. Для ряду видів найкраще накопичення біомаси досягали на  $\frac{1}{2}$  МС (інколи й краще ніж на повному МС), такі приклади описані для різних об'єктів, де  $\frac{1}{2}$  МС забезпечувало вищий приріст кореневої маси та продуктивність у порівнянні з повним МС[61]. Таким чином, це підтверджує потенційну економію на поживних елементах та регуляторах росту.

Така культура часто зберігають органоспецифічні біосинтетичні шляхи, характерні для коренів рослин в *in vivo* умовах, і в ряді випадків демонструють вищу або стабільнішу продуктивність порівняно з недиференційованими культурами клітин (калюс та суспензія) саме для класів сполук, природно активних у корені. Так для м'яти за допомогою культури «бородатих» коренів було зафіксовано накопичення фенольних кислот, зокрема розмаринової кислоти, що забезпечило активний біосинтетичний шлях фенольних сполук через кореневу органоспецифіку в порівнянні з контролем[62].

Щодо недоліків ефективність індукції «бородатих» коренів суттєво залежить від виду, генотипу, типу експланта, штама *Agrobacterium rhizogenes*,

часу кокультивування, способів елімінації бактерії, тому процедура не є тривіальною і часто потребує оптимізації на кожному об'єкті. Водночас, коли методику відпрацьовано, система дає високі частки індукції, швидкий ріст на безгормональних середовищах і відтворений фенотип, що робить її привабливою для подальших біотехнологічних цілей[63]. Також є ряд технологічних обмежень: при масштабуванні фіксуються проблеми з масообміном кисню, неоднорідним перемішуванням, через чутливість коренів до механічного перемішування розробляють газофазні біореактори.

**Таблиця 1.2 Основні переваги та недоліки калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів**

Тип культури	Переваги	Недоліки
Калюсна	Простота індукції з різних органів(листки стебла корені) легко отримати вихідний матеріал, можливість регулювання росту і метаболіму через співвідношення ауксинів і цитокінінів, підходить для відбору високопродуктивних ліній та первинного скринінгу, робота в контрольованих умовах незалежно від сезону і середовища	Морфологічна недиференційованість – втрата органоспецифічного синтезу сполук, зниження стабільності метаболічної активності при тривалому культивуванні(сомаклональні варіації), щільна структура тканини ускладнює масообмін, обмежує ріст у великих об'ємах, обмежена масштабованість процесу
Суспензійна	Швидкий приріст біомаси, легке масштабування в біореакторах, можливість тонкого контролю параметрів(pH, аерація, поживні речовини, світло), висока однорідність середовища й стандартизація процесу, легке внесення	Часто низька продуктивність вторинних метаболітів, неоднорідність клітинної популяції, генетична та епігенетична нестабільність високопродуктивних ліній, проблеми з аерацією перемішуванням і контролем pH у великих об'ємах, потребує складного технологічного обладнання

	прекурсорів для стимуляції синтезу вторинних сполук	
«Бородаті» корені	Висока швидкість росту без додавання регуляторів росту – зниження вартості культивування, може ефективно рости на «бідних» середовищах(1/2 МС), що забезпечує економічну перевагу, забезпечує органоспецифічні шляхи синтезу – особливо ефективна для метаболітів природно локалізованих у коренях(фенольні кислоти, алкалоїди, терпеноїди), генетична та біохімічна стабільність у часі	Процедура трансформації складна, залежить від виду, генотипу, типу експланта, штаму <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (вимагає оптимізації), при масштабуванні виникають проблеми з масообміном, аерацією, неоднорідним перемішуванням, потребує спеціальних конструкцій біореакторів(газофазні).

З огляду літератури, можна порівняти ці три види культури між собою за такими критеріями: простота одержання, простота в роботі, легкість масштабування, економічний фактор, продуктивність вторинних метаболітів, стабільність біосинтезу, органоспецифічність синтезу. Детальна характеристика за цими критеріями наведена у таблиці 1.2.

**Таблиця 1.3 Порівняльна характеристика типів рослинних культур за факторами вирощування**

Критерій	Калюсна	Суспензійна	Культура «бородатих» коренів
Одержання первинного матеріалу	Легко індукується з різних експлантів	Потребує отримання калюсу для старту	Потребує трансформацією <i>Agrobacterium rhizogenes</i>

Простота в роботі	Помірна, потребує контролю контамінацій і гормонів	Вимагає стерильних умов і роторних систем	Просте підтримання після індукції, без гормонів. Проблематика елімінації бактерії з експланту
Легкість масштабування	Труднощі з масообміном у щільних тканинах	Добре адаптується до біореакторів	Потребує більш складної технологічної схеми біореактора
Економічний фактор	Відносно дешевше середовище, але потребує гормонів	Витрати на аерацію, контроль факторів культивування	Росте без гормонів на ½ МС або подібних, низька собівартість
Продуктивність вторинних метаболітів	Помірна	Помірна	Висока для метаболітів локалізованих в коренях
Стабільність біосинтезу	Сильна до варіацій	Залежить від пасажів і умов	Висока генетична та біохімічна стабільність
Органоспецифічність синтезу	Втрачається при дедиференціації	Частково зберігається в агрегатах	Повністю зберігається в корневих тканинах

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1 Місце проведення досліджень

Дослідження проводились у товаристві з обмеженою відповідальністю «Науково - виробниче об'єднання «БІОТЕХ ПЛАНТС», та у навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Структура лабораторії складається з таких кімнат:

1. Кімната для чищення та миття посуду. Вона оснащена декількома глибокими раковинами, щоб декілька людей могли одночасно виконувати роботу. Підключена гаряча та холодна вода. Також встановлюють стелаж для сушіння посуду.

2. Кімната приготування живильних середовищ. В ній наявний основний інструментарій для приготування, а саме: технічні, аналітичні ваги, рН – метром, дистильатором для отримання дистильованої води, холодильником, морозильною камерою, електроплитками, водяною баньою, магнітними мішалками, лабораторними столами, шафами для зберігання посуду, полиці на яких розміщуються хімічні реактиви, приладів.

3. Приміщення для стерилізації інструментів та живильних середовищ, посуду, матеріалів оснащена вертикальним автоклавом, сухожаровою шафою, полицями для розміщення простерилізованих предметів.

4. Ламінарна (асептична) кімната. Оснащена ламінар-боксами і використовуються для проведення робіт, для яких необхідні стерильні умови. Ламінар-бокс - шафа, для роботи з біологічними або хімічними об'єктами, призначення для унеможливлення забруднення зразків або інших матеріалів, чутливих до мікрочастинок, в потоці стерильного повітря.

5. Світлова культуральна кімната (термальна) використовуються для культивування ізолюваних тканин рослин та рослин-регенерантів. В цій кімнаті за допомогою автоматизованої системи підтримується на постійному рівні освітленість, температура 25-26 °С, вологість повітря на рівні 70-80%, 14-

годинний фотоперіод, кондиційоване повітря. Кімната оснащена стелажми, в яких полиці розташовані ярусами. Культуральні банки або колби встановлюють так, щоб вони не затіняли один одного. Джерела світла повинні забезпечувати спектр, сприйнятливий для процесів для росту та розвитку рослин. Довжина хвилі (400-700нм), інтенсивність випромінювання в межах 1000-10000 Лк. Джерело світла розташовуються зверху.

6. Кімната для приготування рослинних екстрактів повинна містити прилади необхідні для приготування екстрактів. Кімната оснащена дробарками, технічними та аналітичними вагами, необхідним посудом, рН-метром, вакуумним насосом, витяжною шафою, термостатом, мікрохвильовою піччю, різноманітні фільтри.

7. Аналітична кімната(Кімната оснащена приладами: термошейкерами, спектрофотометрами, центрифугами, апаратами для ПЛР та іншими необхідними аналітичними пристроями.)



**Рис. 2.1** Кімната для приготування рослинних екстрактів

Для приготування живильних середовищ та підготовки рослинних екстрактів необхідний посуд із термостійкого скла та прилади:

1. Стакани з термостійкого скла та хімічною стійкістю 250, 500, 1000 мл.
2. Мірні циліндри місткістю 25, 50, 100, 250 та 500 мл.

3. Колби з плоским дном на 100, 250 мл.
4. Скляні палички.
5. Автоматичні піпет-дозатори на 0,1-1мл з наконечниками до них.
6. Пластикові наважки.
7. Залізні шпателі.
8. Аналітичні ваги.
9. Магнітна мішалка.
10. рН-метр.
- 11.Шейкер.

Для вирощування рослин-регенерантів та калюсної культури використовувався такий посуд:

1. Колби Ерлмейєра на 250 мл.
2. Чашки Петрі високі і низькі із діаметром 5, 9, 12 см.
3. Скляні банки на 210 мл.

Також у лабораторії повинні бути присутні інструменти для проведення маніпуляцій з рослинами та калюсними тканинами(скальпелі, анатомічні пінцети різних розмірів, ножицями медичними, спиртівками, штативами) і матеріалами (фільтрувальним папером, ватою, марлями, алюмінієвою фольгою для виготовлення ковпачків на стакани або колби).

Роботи з приготувань живильних середовищ та первинної обробки рослинного матеріалу проводились у кімнаті приготування.

Роботи з стерильним рослинним матеріалом проводять в асептичних умовах – в ламінар-боксах, які стерилізують протягом 30 хвилин ультрафіолетовим світлом, продувають стерильним повітрям протягом 10 хв після цього всі робочі поверхні та руки протирають 70 % спиртом. Інструменти також попередньо змочують у 96 % спирті та пропалюють у полум'ї спиртівки.

Живильні середовища та дистильовану воду стерилізують в автоклаві при тиску 1 атм 15-20 хв та 30 хв за температури 121 °С відповідно. Культуральний посуд, інструменти, чашки Петрі, стерилізують у сухожаровій шафі при температурі 160-180 °С протягом 2 годин.

У боксі перед роботою інструменти, якими будуть проводитись маніпуляції вміщують у фарфоровий стакан із 96 % етиловим спиртом, пропалюючи після цього кожен із них в полум'ї спиртівки. Після стерилізації обпалюванням інструменти розміщують на підставці, кожен інструмент можна використати тільки для однієї маніпуляції, після цього їх потрібно пропалити ще раз.

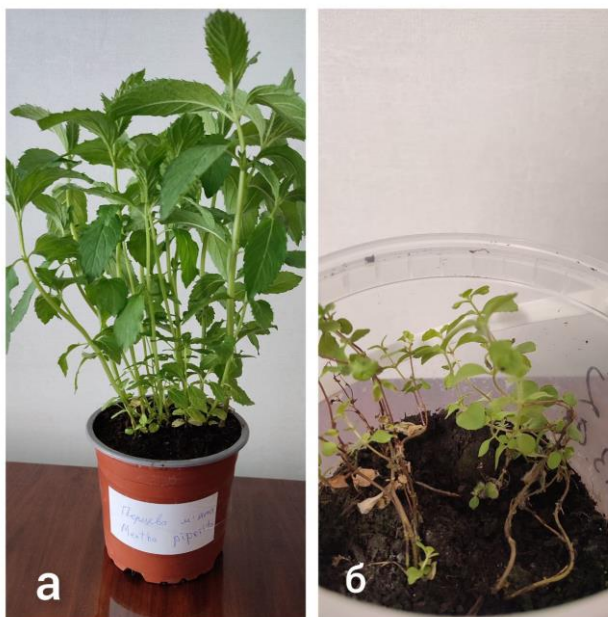
При проведенні досліджень було використане наступне обладнання:

1. Ламінар-бокси.
2. Дистилятор.
3. Сухожарова шафа.
4. Аналітичні ваги
5. Автоклав.
6. Магнітна мішалка(Velp scientifica).
7. рН-метр.
8. Центрифуга.
9. Ампліфікатор(Mastercycler personal)

## 2.2 Матеріали дослідження

### 2.2.1 Вихідний матеріал

Матеріалом досліджень слугували рослини *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L.* вирощені в умовах теплиці. Загальний вигляд рослин *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L.* наведено на рисунку 2.2.



**Рис. 2.2** Загальний вигляд рослин *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L* культивованих в умовах теплиці

## 2.3 Методи дослідження

### 2.3.1 Підготовка рослинного матеріалу *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L* до введення в культуру *in vitro*

Отримання стерильного рослинного матеріалу – важливий процес і доволі важкий, тому що необхідно нейтралізувати мікрофлору, та не призводити до загибелі самої рослини. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини (стериліанти), які не проникають до рослинної тканини та легко відмиваються водою.

Рослинний матеріал, такий як листки, сегменти стебла з бічними бруньками, апікальні меристеми, корені та насіння, піддавали попередній обробці у 70% етиловому спирті для знищення грибів, їх спор та бактерій, які можуть бути присутніми в природних умовах, також щоб, прибрати зайву вологу з поверхні, щоб наступні стериліанти подіяли ефективніше.

Для подальшої стерилізації можна застосовувати наступні препарати:

1. Препарати з активним хлором (0,5 – 5 % гіпохлорит натрію NaClO); гіпохлорит кальцію Ca(ClO)<sub>2</sub>; хлорамін; комерційний препарат «Білизна».
2. Ртутні препарати: 0,1 – 0,5 % розчин сулеми HgCl<sub>2</sub>, діюцид, фапосент.
3. 5 – 20 % розчин перекису водню H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
4. 1% бромна вода Br<sub>2</sub>.
5. 0,5 – 2 % азотнокисле срібло AgNO<sub>3</sub>.

Час, необхідний для стерилізації, визначається експериментально і залежить від вибраної речовини для стерилізації та об'єкту, який потрібно зробити асептичним. Щоб видалити залишки стерилізуючої речовини з тканин, експлант промивають 3 – 5 разів протягом 10 хвилин кожний раз. Якщо цей процес порушити, може відбутися отруєння культури, що може викликати затримки в рості або повну загибель рослин[34].

Для стандартизації та узагальнення для двох видів рослин було обрано один стерилізуючий агент - дихлорит ртуті 0,1 %  $\text{HgCl}_2$  з попередньою обробкою 70% спиртом.

Стерилізацію сулемою та відмивання від стерилізуючих речовин проводили у ламінар-боксі. Далі на рослинах омолоджували зріз на частинах, які контактували з стериліантом та висаджувались на середовище МС.

Рослини культивувались за температури 23 °С, освітленості 3000 люкс і фотоперіоді 16 годин. Субкультивування проводили кожних 30 діб.

### 2.3.2 Підбір живильного середовища для культивування *Stevia rebaudiana Bertonii* та *Menta piperita L*

Для регенерації рослин стевії та м'яти було обрано середовище МС. Для приготування базальних твердих середовищ МС всі вихідні розчини змішувались разом з 30 г/л сахарози за прописом Myrashige and Skoog[56].

Склад живильного середовища МС наведено у таблиці 2.1

**Таблиця 2.1 Склад поживного середовища МС [56]**

Назва елемента	Хімічна формула	Концентрація мг/л
Макросолі		
Нітрат амонію	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
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
Гідроортофосфат калію	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Нітрат калію	$\text{KNO}_3$	1900
Мікросолі		
Борна кислота	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
Хлорид кобальта	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Сульфат міді(II)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Сульфат марганцю	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	22,30
Калій йодистий	$\text{KI}$	0,83
Молибдат натрію	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25

Сульфат цинка	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
Розчин ферум хелата		
Динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3
Сульфат заліза(II)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
Вітаміни і органічні речовини		
B1	Вітамін B1	0,1
B6	Вітамін B6	0,5
PP	Вітамін PP	0,5
Сахароза	$C_{12}H_{22}O_{11}$	30 г/л
Мезоінозит	Вітамін B8	100
Агар	-	7 г/л
pH 5,7 – 5,8		

Для введення в культуру *in vitro* рослинного матеріалу, використовувалось середовище МС. Також воно використовувалось при пересадці у перший парсаж та подальших субкультивувань. Склад, та концентрації елементів на 1л середовища наведено у таблиці 2.1.

Експланти культивувались протягом місяця, за регульованої температури 22 – 24 °С за освітлення 3000 лк, далі дочірні рослини пересаджувались для стабілізації, та накопичення біомаси на середовище МС.

### **2.3.3 Підбір живильних середовищ для отримання калюсної культури стевії та м'яти**

Після введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro* та отримання стерильних дочірніх рослин, наступним етапом була індукція калюсогенезу. Для індукції калюсу використовували ряд модифікованих середовищ доповненні різними концентраціями та регуляторами росту. За основу слугувало базове середовище МС(табл 2.1.). Варіанти живильних середовищ для калюсогенезу наведені у табл 2.2.

**Таблиця 2.2 Живильні середовища для індукції калюсу м'яти та стевії**

Назва	Основа	Регулятори росту				
		Кін(мг/л)	БАП(мг/л)	2,4-Д(мг/л)	НОК(мг/л) )	ІОК(мг/л)
С11	МС	0	0,02	1	0	0
С12	МС	0,25	0	0	2	0
С13	МС	0	0	0	0,25	0
С14	МС	0	0	0	0,5	0
С15	МС	0	0	0	1	0
С16	½ МС	0,25	0	0	2	2

Як первинний експлант використовували листкові пластини, стебла та корені. Для ініціації калюсоутворення на їх поверхні скальпелем робили невеликі порізи(раневу поверхню), на листках з обох сторін для збільшення раневої поверхні. Культивували калюсу здійснювали за двох умов:

1. У термостаті при температурі 23 °С та вологості 60-70% в абсолютній темряві.
2. На світлі 3000 лк за регульованої температури 22 – 24 °С, та вологості 60-70%.

Оцінку проводили за морфологічними ознаками: колір, щільність, структура. Пасажування здійснювали кожні 30 днів

#### **2.3.4 Отримання суспензійної культури *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L***

Для отримання суспензійної культури використовували добре проліферуючий калюс *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Mentha piperita L*, отриманий на твердому живильному середовищі. Фрагменти калюсної тканини масою приблизно 100-250 мг переносили у колби Ерленмейєра об'ємом 100 мл, які містили 50 мл рідкого живильного середовища того ж складу, що й тверде, але

без додавання агар-агару. Культивування здійснювали на лабораторному качалковому пристрої(шейкері) Edmund Bühler (модель D-7400/ KL1, Tübingen) зі швидкістю 150 об/хв. Орбіта платформи для даного приладу становила приблизно 10–25 мм. Це забезпечувало рівномірну суспензію клітин у середовищі.

Температурний режим підтримували на рівні 22 – 24 °С, за умов освітлення із фотоперіодом 16 год світло/ 8 год темряви. Первинну суспензію інкубували протягом 30 діб до появи рівномірної клітинної маси, після чого проводили пересівання шляхом перенесення 5 мл суспензії у свіжу порцію живильного середовища у співвідношенні 1:10.

Підтримання культури здійснювали шляхом регулярних пересівів через кожні 30 діб, що забезпечувало стабільну життєдіяльність клітин та постійне зростання біомаси. Для оцінки росту суспензійної культури використовували біометричні показники: визначали масу сирової біомаси.

### 2.3.5 Індукція культури «бородатих» коренів за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*

Для отримання культури «бородатих» коренів використовували листкові пластини та сегменти стебел асептичних рослин *Mentha piperita* та *Stevia rebaudiana Bertoni* вирощені в культурі *in vitro*. Як агент трансформації застосовували нічну культуру *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4), відому високою ефективністю індукції коренеутворення у різних видів рослин. Бактеріальні клітини культивували на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані(LB). Склад поживного середовища LB наведено у таблиці 2.3

**Таблиця 2.3 Склад поживного середовища LB(на 1л середовища)[65]**

Назва компоненту	Кількість г/л
Триптон	10
Дріжджовий екстракт	5
NaCl	10

Для приготування бактеріальної суспензії нічну культуру *A. Rhizogenes* осаджували центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15 хв, після чого осад клітин ресуспендували у 5 мл рідкого середовища МС для отримання однорідної бактеріальної суспензії, придатної для інфікування експлантів (розведення 1:4).

Для здійснення генетичної трансформації на поверхні експлантів робили поперечні насічки, що сприяло підвищенню ефективності проникнення *A. Rhizogenes* у клітини рослинних тканин. Підготовлені експланти занурювали у бактеріальну суспензію та проводили кокультивування протягом 30 хв. Після завершення кокультивування експланти переносили на поверхню твердого живильного середовища МС зі зменшеним у двічі вмістом мінерального живлення (1/2 МС). Культивування здійснювали в умовах темряви при температурі 28 °С.

Через 48 годин експланти переносили на свіже живильне середовище 1/2 МС, доповнене 600 мг/л антибіотика цефотаксиму з метою елімінації залишкових клітин агробактерії. Подальше спостереження за експлантами здійснювали з метою виявлення формування коренів, характерних за морфологічними ознаками: інтенсивне галушення та від'ємний геотропізм. Частоту трансформації визначали як відношення кількості експлантів, на яких утворилися корені трансформованого типу, до загальної кількості оброблених експлантів.

### **2.3.6 Виділення ДНК та молекулярно – генетичне підтвердження трансгенної природи «бородатих» коренів**

Для підтвердження трансгенної природи отриманих коренів м'яти та стевії проводили виділення геномної ДНК та полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) із використанням специфічних праймерів до гена *rolB*. Геномну ДНК із трансформованих коренів ізолювали за допомогою ЦТАБ-методу. Для аналізу відбирали по 100 мг біомаси трансгенних коренів з кожної лінії, а також 100 мг коренів нетрансформованої рослини, що використовували як негативний контроль. Рослинний матеріал гомогенізували у 1,5 мл буфера для екстракції ДНК (таблиця 2.3.6.1).

**Таблиця 2.3.6.1 Склад ЦТАБ-буферу(x2) для екстракції рослинної ДНК**

Назва реактиву	Кількість на 100 мл
1М ТРІС-НСL рН 8,0	10 мл
5М NaCl	28 мл
ЦТАБ	29 г
0,5М Na-ЕДТА	4 мл
2-меркаптоетанол	28 мл

Отриманий гомогенат інкубували при температурі 56 °С протягом 20 хв, після чого проводили депротейнізацію із використанням суміші хлороформ: ізоаміловий спирт (у співвідношенні 24:1). Отриману реакційну суміш розділяли центрифугуванням при 14000 об/хв, у результаті чого формувались дві фази. Верхню водну фазу(супернатант), що містила ДНК, обережно відбирали та повторно очищували тим самим розчином хлороформ: ізоаміловий спирт(24:1) для видалення залишкових білкових домішок

Після очищення водну фазу переносили у нові мікропробірки для осадження ДНК із використанням відповідного буфера для преципітації (таблиця 2.3.6.2).

**Таблиця 2.3.6.2 Склад ЦТАБ-буферу (1%) для осадження ДНК**

Назва реактиву	Кількість на 100 мл
1М ТРІС-НСL рН 8,0	5 мл
0,5М Na-ЕДТА	2 мл
ЦТАБ	4 г

Після додавання буфера суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 20 – 60 хв, залежно від швидкості осадження ДНК у кожному

конкретному зразку. Осадження ДНК здійснювали центрифугуванням при 14000 об/хв протягом 5 хв. Отриманий осад розчиняли у 200 мкл стерильного буфера, що містив 1,2М NaCl, після чого проводили повторне осадження двома об'ємами 96% етанолу з інкубацією 12 – 16 год при температурі +4 °С. ДНК осаджували центрифугуванням 14000 об/хв протягом 5 хв, отриманий осад двічі промивали 70% етанолом, підсушували на повітрі та розчиняли у 50 мкл стерильної деіонізованої води. За потреби зразки зберігали при -20 °С до подальших досліджень.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих культур «бородатих» коренів використовували виділену геномну ДНК як матрицю для проведення полімеразно-ланцюгової реакції із застосуванням специфічних праймерів до гена *rolB* (таблиця 2.3.6.2)

**Таблиця 2.3.6.2 Послідовність специфічних праймерів до гена *rolB* для проведення ПЛР-аналізу**

Ген	Послідовність праймерів
<i>rolB</i>	<i>rolB</i> -F(forward): 5' – atggatcccaaattgctattccttccacga – 3' <i>rolB</i> -R(reverse): 5' – ttaggcttctttcttcaggtttactgcagc – 3'
<i>virG</i>	<i>virG</i> -F(forward): 5'-ggtcgctatgcggcatc-3' <i>virG</i> -R(reverse): 5'-cctgagattaagtgtccagtcag-3'

Як позитивний контроль використовували ДНК *Agrobacterium rhizogenes*. З метою перевірки та виключення хибнопозитивних результатів, зумовлених наявністю залишкових бактеріальних клітин у зразках, додатково проводили ампліфікацію з використанням праймерів, специфічних до гена *virG* (таблиця 2.6). Відсутність продукту ампліфікації цього гена свідчила про ефективну елімінацію агробактерії з культури трансформованих коренів.

Полімеразно-ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл:

- 2 мкл (приблизно 100 нг) сумарної рослинної ДНК.

- 2 мкл сольового буфера (10 мМ Tris-HCl рН 9,0, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> , 50 мМ KCl, 0,01 % Тритон X-100)
- 2 мкл суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів із розрахунку 200 мкМ кожного в реакційній суміші.
- 0,5 мкл кожного з праймерів(0,2 мкМ).
- 0,5 мкл Taq-полімерази.
- 13 скл стерильної деіонізованої води.

Реакція проводилась за таких умов:

- Первинна денатурація – 94 °С, 3 хв.
- 30 циклів ампліфікації (94 °С, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с)
- Остаточна полімеризація 72 °С, 5 хв.

Продукти полімеразно-ланцюгової реакції аналізували методом електрофорезу в 1% агарозному гелі з використанням Трис-ацетатної буферної системи (ТАЕ-буфер). Для контролю специфічності ампліфікації як негативний контроль застосовували геномну ДНК, виділену з нетрансформованих коренів рослин, а як позитивний контроль – тотальну ДНК *Agrobacterium rhizogenes*. Очікуваний розмір амплікона: ~780 bp

#### **2.4 Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів одержаних експериментальних даних здійснювали з використанням пакету програм «Аналіз електронних таблиць «Microsoft Excel», Statistica 6,0.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1 Отримання асептичного матеріалу *Stevia rebaudiana Bertoni* та *Menta piperita L*

Перед стерилізацією рослинного матеріалу, рослини живцювали на сегменти, які містили на кожному експланті по дві бічні бруньки, розташовані при основі листка. Перед подальшою роботою листкові пластини з черешком зрізались, залишаючи тільки бруньки для кращої стерилізації стериліантом.



**Рис. 3.1.1.** Вигляд експлантів *Menta piperita L* перед введенням

Візуально рослинний матеріал був чистий від частин ґрунту або залишкового бруду від вирощування у теплиці, тому відмивання у мильному розчині не використовувалось. Для стерилізації використовувались: 70% етиловий спирт та 0,1% розчин  $\text{HgCl}_2$  та наступне трикратне промивання стерильною дистильованою водою.

Стерилізація рослинного матеріалу складалися з таких етапів:

1. Промивання під проточної водою 10 хв.
2. У ламінар-боксі, заунрення на 5с у 70% спирт.
3. Занурення у 0,1% розчин  $\text{HgCl}_2$  на 4 хв.
4. Трикратне відмивання у стерильній дистильованій воді по 10 хв кожне

Узагальнена схема стерилізації наведена у таблиці 3.1

**Таблиця 3.1** Схема стерилізації рослинного матеріалу

Етап стерилізації	Стериліант	Концентрація	Експозиція
1	Промивання під проточною водою		10 хв
2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	70%	5 с
3	HgCl <sub>2</sub>	0,1 %	4 хв
4	Трикрратне промивання стерильною дистильованою водою		10 хв

Всього було висаджено по 30 експлантів кожного виду рослин. Оцінка ефективності стерилізації проводилась через 7 діб культивування. У рослинному матеріалі була присутня грибоквона контамінація та некрози, бактеріального ураження не зазнало. Для стевії з загальної кількості висадженого матеріалу, грибоквона контамінація була присутня у 4 експлантів, некроз у 7. Для м'яти у 7 та 2 експлантах відповідно. Вищий відсоток некрозів у стевії можна пояснити більш тонкою структурою експлантів, яка підвищує їх чутливість до стерилізації під час введення в культуру *in vitro*. Загальні результати по життєздатності та відсотку контамінацій наведено в таблиці 3.2.

**Таблиця 3.2** Оцінка ефективності стерилізації

Матеріал введення	К-сть висадженого матеріалу	К-сть контамінованого матеріалу	К-сть некротизованого матеріалу	К-сть життєздатних рослин-регенерантів	Ефективність стерилізації %
<i>Stevia rebaudiana bertonii</i>	30	4	7	19	63,3 %
<i>Menta piperita L</i>	30	7	2	21	70 %

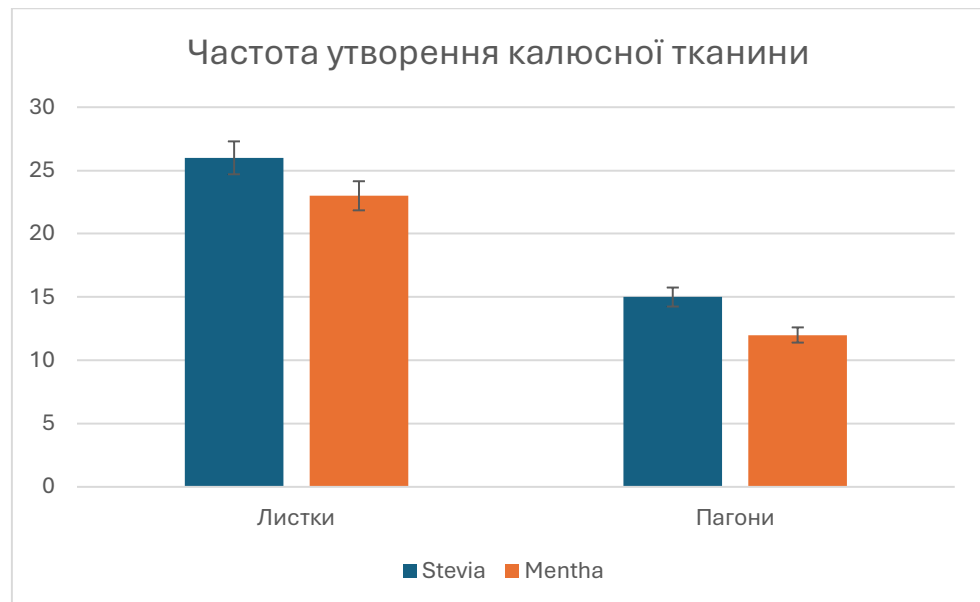
На рослинному матеріалі який пройшов стерилізацію і не зазнав контамінації спостерігався позитивний ріст дочірніх рослин з бічних бруньок, з

яких потім проводилась відсадка новоутвореного рослинного матеріалу на базове безгормональне середовище за прописом МС(таблиця 2.1).

### **3.2 Індукція та морфологічна характеристика калюсних тканин *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita L***

Для одержання калюсних культур було використано асептичні рослини *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*, отримані на попередньому етапі дослідження. Як первинні експланти застосовувались сегменти стебел та листові пластини, щоб порівняти їх здатність до калюсоутворення. Експланти висаджувались на живильні середовища на живильні середовища з різними комбінаціями регуляторів росту з метою індукції калюсогенезу.

У процесі культивування спостерігали формування калюсних утворень, не залежно від складу живильного середовища, але від типу вихідного експланта. Було відмічено, що листові пластинки характеризувались вищою частотою утворення калюсу порівняно зі стебловими сегментами, що свідчить про їх більшу морфогенетичну активність у даних умовах. Загальна вибірка для обох культур становила по 30 експлантів стеблового та листового походження. Для стевії з загальної вибірки калюс утворився лише на 15 експлантатах стеблового походження, з листової пластини на 26. Для м'яти результати виявились схожими, на стеблах частота утворення калюсу склала 12, на листках 23. Термін культивування та оцінки проводився на 28 добу культивування.



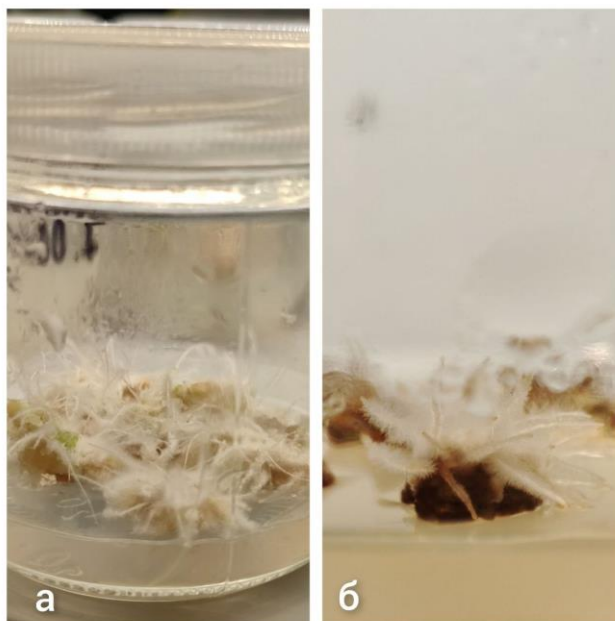
**Рис 3.2.1.** Графічна візуалізація частоти утворення калюсу на стеблах та листкових пластинах *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*

Морфологічну характеристику проводили для калюсних тканин, індукованих із листкових пластин *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*. Цей тип експлантів було обрано як оптимальний для подальшої роботи, оскільки за попереднім етапом встановлено вищу здатність до калюсоутворення. Оцінку здійснювали через 28 діб культивування на різних варіантах живильного середовища (таблиця 2.3) за візуальними та морфологічними показниками – колір, консистенція, поверхнева структура, щільність тканин.

Калюсоутворення у стевії відбувалось на 14 добу культивування, та спостерігалось на всіх варіантах середовищ, проте інтенсивність і характер морфологічних ознак суттєво відрізнявся.

На середовищі С11 (МС + 1 мг/л 2,4-Д + БАП 0,02 мг/л) утворювався пухкий жовтого кольору калюс, який зростав до 21 доби, але після швидко темнів та новоутворена тканина некротизувалась. Схожий результат спостерігали і на експлантах м'яти. Можливо це пов'язано з інтенсивним виділенням фенольних сполук, для яких 2,4-Д виступало прекурсором. Щоб запобігти потемнінню тканин, до середовища вносили аскорбінову кислоту у концентрації 20 мг/л, але дана модифікація середовища не викликала очікуваного ефекту.

На середовищах із НОК спостерігали формування більш щільних структур. Середовища в яких був присутній лише ауксин (C13-5), на стевії формувалася жовтий щільний калюс на 14 добу культивування; м'ята характеризувалася більш темнішим кольором калюса. При продовженні культивування на даних середовищах спостерігалось спонтанне утворення коренів для обох культур. Також відстежувалась залежність у концентрації ауксину на час індукції спонтанного ризогенезу, чим вища концентрація НОК була у середовищі, тим у коротший термін формувались корені. Також на експлантах стевії це відбувалось інтенсивніше.



**Рис. 3.2.2** Спонтанний ризогенез на листкових експлантах (а – *Stevia rebaudiana bertonii*, б – *Mentha piperita*)

Середовище C16, було розроблено з метою перевірки впливу зменшеної концентрації макро- та мікроелементів на індукцію калюсу та його морфологічні властивості. Передбачалось, що зменшена мінеральна насиченість середовища може зменшити потемніння калюсних тканин, а комбінована дія ауксину НОК+ІОК забезпечить стабільний ріст. Проте для обох видів рослин дане середовище не сприяло покращенню росту калюсу: утворення пухкого активно ростучого калюсу не спотерігалось, а забарвлення залишалось жовтого кольору з тенденцією до потемніння тканин.

Найвищу інтенсивність проліферації калюсної тканини та найкращі морфологічні характеристики спостерігали на середовищі C12(МС + НОК 2 мг/д + 0,25 мг/л Кін) для обох видів рослин. Калюс мав однорідну структуру, помірну щільність, світло-зелений колір у експлантів стевії, та світло-жовтий або кремовий колір у м'яти і швидкий темп наростання біомаси. Комбінація низької концентрації цитокініну(кінетину) з оптимальною дозою ауксину(нафтилоцтовою кислотою) сприяла поділу клітин і підтриманню їх у недиференційованому стані. Воно було обране як оптимальне середовище для подальшого культивування. Загальні морфологічні показники калюсних тканин м'яти та стевії наведені у таблиці 3.3 на 28 добу культивування.

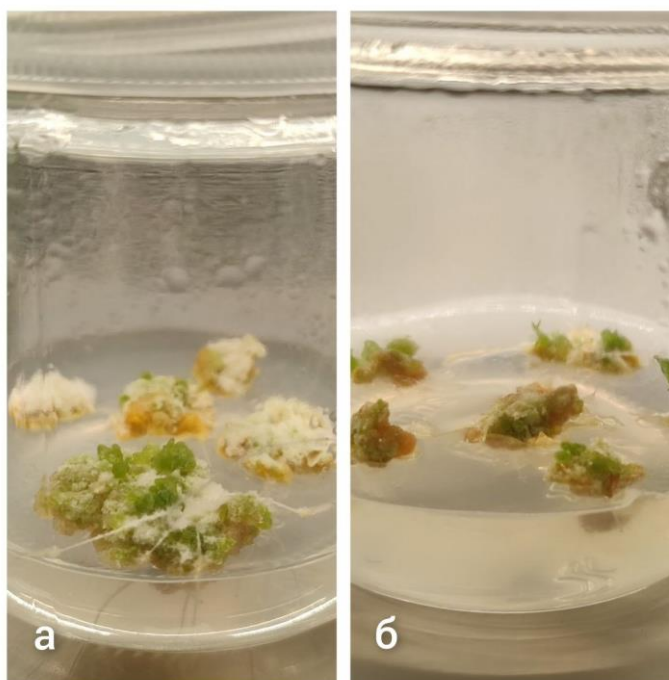
**Таблиця 3.3 Морфологічні показники калюсних культур стевії та м'яти**

Вид	Середовище	Колір калюсу	Консистенція	Інтенсивність росту	Ознаки органогенезу
<i>Stevia</i>	C11	Жовтий	Пухкий	++ <sup>1</sup>	-
<i>Stevia</i>	C12	Світло-зелений	Пухкий	+++ <sup>2</sup>	-
<i>Stevia</i>	C13	Жовтуватий	Щільний	+ <sup>3</sup>	+
<i>Stevia</i>	C14	Жовтуватий	Щільний	+	++
<i>Stevia</i>	C15	Жовтуватий	Щільний	+	+++
<i>Stevia</i>	C16	Темно-жовтий	Щільний	+	-
<i>Mentha</i>	C11	Жовтий	Пухкий	++	-
<i>Mentha</i>	C12	Кремовий	Пухкий	+++	-
<i>Mentha</i>	C13	Жовтий	Щільний	+	+
<i>Mentha</i>	C14	Жовтий	Щільний	+	++
<i>Mentha</i>	C15	Жовтий	Щільний	+	+++
<i>Mentha</i>	C16	Темно-жовтий	Щільний	+	-

1 Помірна інтенсивність росту (ступінь органогенезу)

2 Висока інтенсивність росту (ступінь органогенезу)

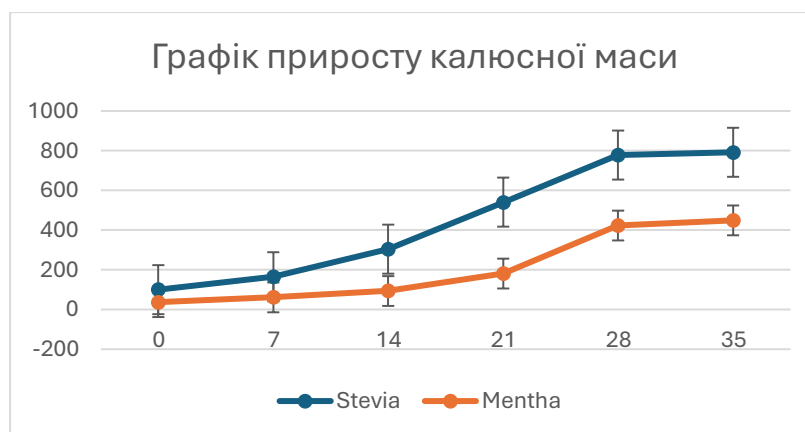
3 Низька інтенсивність росту (ступінь органогенезу)



**Рис. 3.2.3** Зовнішній вигляд калюсу на 28 добу культивування (а - *Stevia rebaudiana bertonii*; б - *Mentha piperita*)

Для оцінки росту калюсних тканин *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* вимірювали приріст маси калюсу. Культуру утримували на середовищі С12 протягом 30 діб при стандартних умовах культивування.

Маса калюсу фіксувалась на початку та на 7, 14, 28, 35 добу культивування. Приріст маси обчислювався як різниця між масою калюсу на відповідний день та початковою масою експланту. Отримані дані були використані для побудови графіка динаміки росту калюсу, що дозволило оцінити темп приросту на середовищі С12.



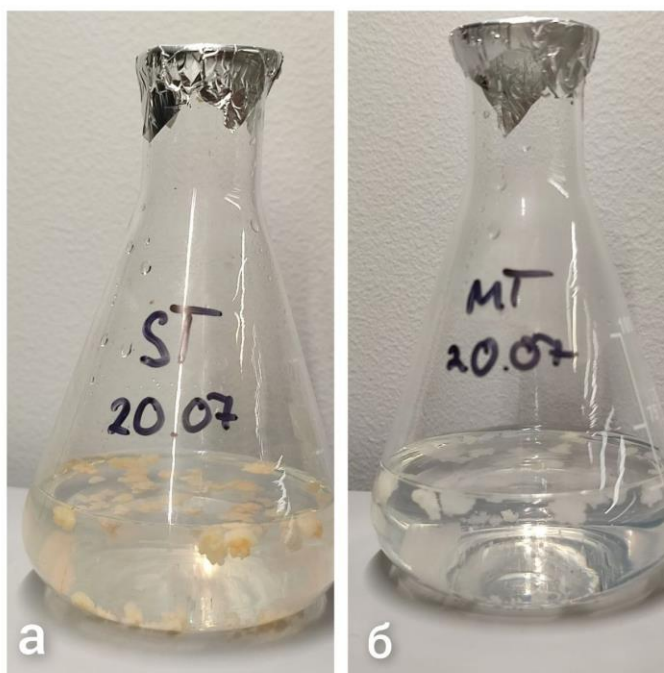
**Рис 3.2.4** Графік приросту маси калюсів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*

### 3.3 Одержання та оцінка росту суспензійної культури *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita L*

Для формування суспензійної культури *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* використовували калюсну тканину, отриману на попередньому етапі культивування. Як вихідний матеріал брали калюс у віці 21 – 28 діб, оскільки саме в цей період спостерігався найінтенсивніший приріст миса, що свідчить про високу метаболічну активність клітин.

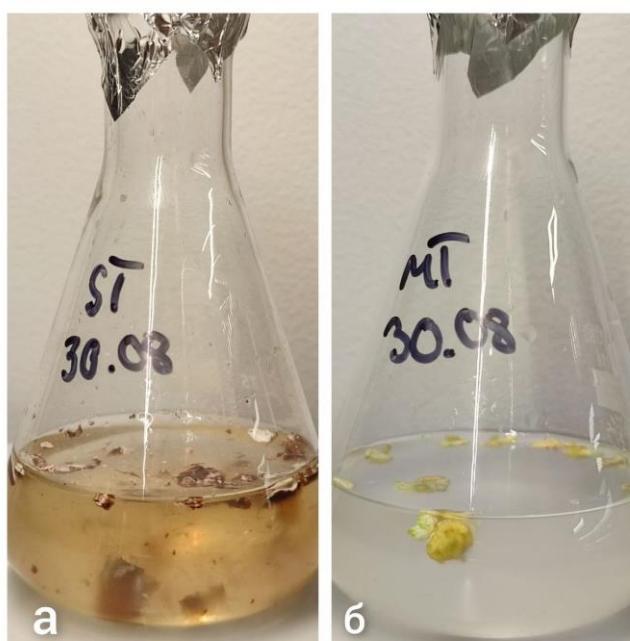
Для ініціації суспензійної культури фрагменти калюсу переносили у рідке живильне середовище C12(без додавання агару). Середовище містило той самий склад макро- та мікроелементів, регуляторів росту та вітамінів, що й на попередньому етапі, що забезпечувало стабільність росту клітин. Культивування здійснювали у колбах Ерленмейєра на лабораторному шейкері Edmur Buhler при швидкості 150 об/хв. Температурний режим підтримували на рівні 22 – 24 °С, за умов освітлення з фотоперіодом 16 год світло, 8 год темряви. Такий режим перемішування сприяв подрібненню калюсних агрегатів і рівномірному розподілу клітин у середовищі, що забезпечувало поступове формування однорідної суспензії.

Через кілька діб(2 – 4) після перенесення калюсу спостерігалось поступове освітлення середовища, поява дрібнодисперсних агрегатів і зв'язаних клітинних фракцій, що свідчило про формування суспензійної культури. На початковому етапі(після перенесення калюсу у колби), середовище залишалось світлим і прозорим, а часточки калюсу мали світло-зелений або жовтуватий відтінок, що свідчило про їх життєздатність. Протягом періоду культивування спостерігалось поступове збільшення кількості клітин у суспензії, що супроводжувалось помутнінням середовища.



**Рис 3.3.1** Зовнішній вигляд суспензійної культури (а - *Stevia rebaudiana bertonii*; б - *Mentha piperita*) на початку культивування

Наприкінці періоду культивування(30 доба) середовище набувало мутного, але світлого вигляду, без ознак потемніння чи некрозу, що свідчило про поділ клітин, і що культура залишалася живою.



**Рис 3.3.2** Зовнішній вигляд суспензійної культури (а -*Stevia rebaudiana bertonii*; б - *Mentha piperita*) на 30 добу культивування

Для оцінки росту суспензійної культури визначали приріст біомаси протягом 30 діб. Початковий інокулюм для обох культур становив приблизно 1,5 г. Для визначення приросту біомаси проводили процедуру відділення клітин: суспензію із колби переливали у воронку з фільтром(воронка зі змоченим фільтром зважувалась та відтарювалась на аналітичних вагах), давали стекти рідкому середовищу, після чого зважували фільтр із клітинною масою. Різниця між масою фільтру з біомасою та порожнього фільтру визначала свіжу масу суспензійної культури(фільтр не підсушувався).

Наприкінці періоду культивування біомаса стевії склала 8,4 г та 7,2 г для м'яти, що відповідно свідчить про 5,6-кратне та 4,8-кратне збільшення маси інокулюму(кратність збільшення розраховувалась як відношення кінцевої маси/початкову масу). Індекс приросту маси розраховували за формулою:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

де,  $W_t$  – кінцева маса біомаси;  $W_0$  – початкова маса біомаси

$$\Delta W_{st} = \frac{8,4 - 1,5}{1,5} = 4,6$$

$$\Delta W_{Mth} = \frac{7,2 - 1,5}{1,5} = 3,8$$

Індекс приросту біомаси стевії є вищим ніж у м'яти, що свідчить про виражену проліфератичну активність. Можливо це пов'язано з вищою здатністю стевії адаптуватись до умов культивування.

### 3.4 Отримання та характеристика культури «бородатих» коренів

*Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* L, індукованих

*Agrobacterium rhizogenes*

Для формування культури «бородатих коренів» використовували асептичні рослини *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*, трансформацію проводили бактерією *Agrobacterium rhizogenes* штам А4. Для порівняння ефективності трансформації у двох видах застосовано уніфіковану методику, що передбачала використання листкових пластинок і стеблових сегментів, як експлантів. Перед інкубацією на поверхні експлантів робили поперечні насічки для полегшення проникнення бактеріальних клітин. Зразки рослин занурювали у суспензію А.

*rhizogenes* з розведенням 1:4 та кокультивували протягом 30 хв. Після цього експланти переносили на тверде живильне середовище  $\frac{1}{2}$  МС без регуляторів росту та культивували у темряві при 28 °С. Через 48 год вибірку рослин продивлялись на наявність білого нальоту по контуру листка, що свідчить про успішне проникнення бактерії в тканини рослин.



**Рис 3.4.1.** Експланти рослин після кокультивування із суспензією бактерії  
Якщо спостерігали дане утворення, експланти переносили на свіже живильне середовище  $\frac{1}{2}$  МС доповнене 600 мг/л цефотаксиму, для елемінації бактерії з тканин.

Для м'яти перші ознаки утворення «бородатих» коренів спостерігали на 10 – 14 добу культивування. На стеблових експлантах вони з'являлись в середньому на 11 добу, тоді як на листкових на 15.



**Рис 3.4.2** Поява «бородати» коренів на листових пластинка(15 – 18 доба)

За вибірки 50 експлантів частота трансформації становила 28 % (14/50) для стеблових і 12% (6/50) для листових сегментів. Отримані корені мали характерний фенотип для такої культури: тонкі, сильно розгалужені, без кореневого чохла, з вираженим негативним геотропізмом, і здатністю росту на безгормональному живильному середовищі. Слід відзначити, що лінії «бородатих» коренів, індуковані із стеблових експлантів, характеризувались вищою морфологічною однорідністю та якістю росту порівняно з тими, що утворилися з листових сегментів. Така відмінність може бути пов'язана з підвищеною сприйнятливістю клітин стеблової тканини до агробактеріальної трансформації або з їх інтенсивнішою проліфераційною активністю.



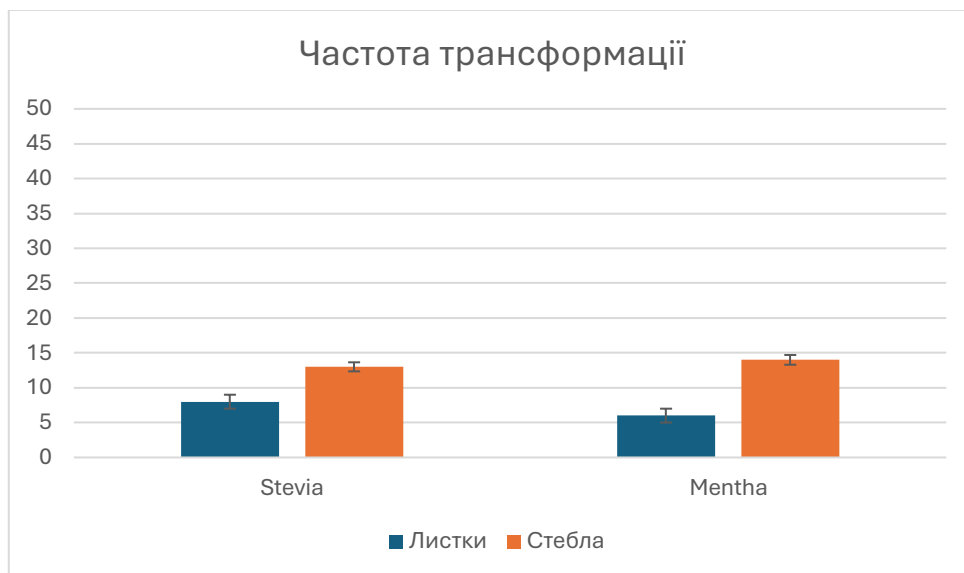
**Рис 3.4.3.** Зовнішній вигляд «бородати» коренів індукованих з стеблових сегментів

Для стевії перші «бородаті» корені з'явилися дещо пізніше, порівняно з м'ятою. Подібно до попереднього варіанта, найкращі результати індукції спостерігали на стеблових експлантах, де корені з'явилися вже на 13 добу культивування, тоді як на листових на 15 - 17 добу. За вибірки 50 експлантів частота трансформації становила 26 % (13/50) для стеблових та 16 % (8/50) для листових сегментів. Отримані лінії за морфологічними ознаками були подібні до тих, що сформувалися у *Mentha piperita*: тонкі ниткоподібні корені, без вираженого апікального чохла, з негативним геотропізмом. Водночас корені стевії відзначалися насиченим жовтуватим відтінком.



**Рис 3.4.4** Культура «бородатих» коренів стевії

Для узагальнення отриманих результатів проведено порівняльний аналіз частоти утворення «бородатих» коренів у стевії та м'яти залежно від типу експланта. На рисунку 3.11 наведено співвідношення частоти трансформації для листкових і стеблових сегментів обох видів.



**Рис 3.4.5.** Співвідношення частоти трансформації для листкових і стеблових сегментів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita*

### 3.5 Молекулярно-генетичне підтвердження трансформації культури «бородатих» коренів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita L*

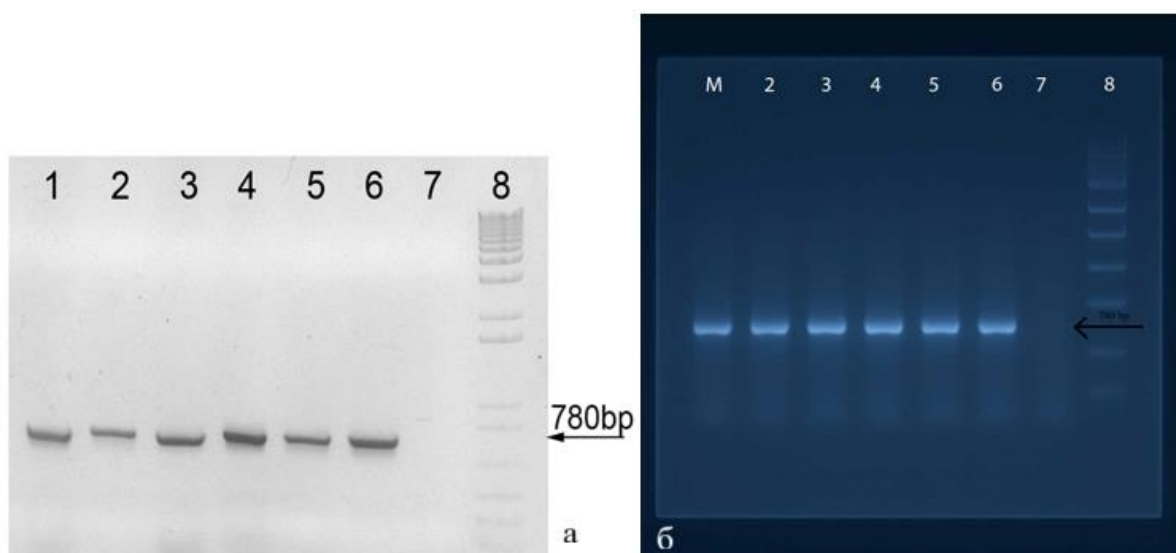
Після отримання культур «бородатих» коренів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* проведено молекулярно-генетичний аналіз для підтвердження факту трансформації. Хоча такі морфологічні риси, як інтенсивне галуження, відсутність кореневого чохла та негативний геотропізм, є типовими для трансформованих коренів, вони не можуть служити остаточним доказом успішно проведеної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Для точного підтвердження проведено полімеразну ланцюгову реакцію із праймерами до гена *rolB*, який є специфічним маркером «бородатих» коренів. Додатково застосовано праймери до гена *virG*, притаманного лише бактеріальній ДНК, щоб виключити наявність залишкових клітин *A. Rhizogenes* у культурах.

Геномну ДНК із трансформованих ліній «бородатих» коренів та нетрансформованих контрольних рослин виділяли за модифікованим ЦТАБ-методом. Для обох видів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* ізоляцію

ДНК проводили за ідентичним протоколом. Як позитивний контроль використовували тотальну ДНК *A.Rhizogenes*, а як негативний ДНК нетрансформованих коренів(рослин). Для уникнення хибнопозитивних результатів усі реакції проводили у стерильних умовах, із використанням окремих піпеток і наконечників для кожного етапу.

Ампліфікацію виконували у загальному об'ємі 20 мкл, що містив 100 нг геномної ДНК, реакційний буфер(10 мМ Tris-HCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl), суміш ДНТФ по 200 мкМ, 0,5 мкл кожного праймера(0,2 мкМ), 0,5 мкл Taq-полімерази та стерильну деіонізовану воду. Реакцію проводили на термоциклері Mastercycler personal у режимі: первинна денатурація 94 °С(3 хв), 30 циклів ампліфікації(94 °С – 30с, 55 °С – 30с, 72 °С – 30с) та фінальна елонгація 72 °С(5 хв). Очікуваний розмір амплікона для гена *rolV* становив приблизно 780 bp.

Продукти реакції розділяли методом електрофорезу в 1 % агарозному гелі в ТАЕ-буфері з використанням ДНК маркера O GeneRuler 1kb DNA Ladder(Thermo Scientific). Результати електрофоретичного аналізу наведено на рисунку 3.12.



**Рис 3.5.1** Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР(а - *Mentha piperita*, б - *Stevia rebaudiana bertonii*. 1(М)- позитивний контроль, сумарна ДНК *A.rhizogenes*; 2-6 - сумарна ДНК «бородатих коренів»; 7 – ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 8 –маркер O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

У лінії «бородати» коренів м'яти спостерігались виразні смуги розміром 780 bp, ідентичні за положенням позитивного контролю (*A. Rhizogenes*). У негативному контролі смуги були відсутні, що свідчить про специфічність реакції та відсутність контамінації бактеріальною ДНК. Подібну картинку також спостерігали для стевії, у перевірених лініях з'явилась смуга амплікона *rolB*, відсутня у контрольних зразках, що підтверджує інтеграцію гена *rolB* у геном рослини.

Додатково виконано ампліфікацію з використанням праймерів до гена *virG*, що локалізується лише в бактеріальній ДНК. У жодному зразку «бородатих» коренів для обох культур не виявлено продуктів ампліфікації *virG*, що свідчить про повну елімінацію клітин агробактерії після вирощення на живильному середовищі з антибіотиком.

Отримані лінії характеризуються стабільністю росту, відсутністю бактеріальних домішок та наявністю специфічного маркера трансформації – гена *rolB*.

### **3.6 Оцінка потенціалу різних типів культур рослинних тканин *in vitro* як біотехнологічної сировини**

У ході проведених досліджень були одержані три типи культур рослинних тканин *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* калюсна, суспензійна, та культура «бородатих» коренів, що представляють різні рівні морфологічної організації клітин і тканин *in vitro*. Кожен із цих типів відрізняється способом індукції, особливостями росту, стабільністю і потенціалом до біосинтезу вторинних метаболітів, тому етап їх порівняння є необхідним, для визначення перспективного типу біотехнологічної сировини. Аналіз проводився на основі отриманих експериментальних результатів у поєднанні з теоретичними даними щодо функціональної активності та технологічних особливостей цих культур.

На даному етапі було здійснено узагальнення експериментальних результатів та проведено комплексну оцінку потенціалу одержаних культур за низкою критеріїв: біотехнологічна доступність, стабільність росту, швидкість накопичення біомаси, продуктивність вторинних метаболітів, простота

культивування, масштабованість процесу та економічна доцільність. Даний підхід дозволив порівняти, зауважити переваги та недоліки цих трьох типів культур.

Калюсна культура є базовим етапом біотехнологічного процесу, який забезпечує формування первинної клітинної сировини для подальших маніпуляцій. Отримання здійснювали з листових та стеблових експлантів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* на різних модифікованих живильних середовищах, що містили різні співвідношення ауксинів та цитокінінів. Біотехнологічна доступність цього типу культури була високою. Для стевії перші ознаки калюсоутворення з'являлись вже на 10 – 14 добу, у м'яти на 14 – 18 добу. Найвищий відсоток індукції спостерігався на середовищі C12(МС + 2 мг/л НОК + 0,25 мг/л Кін), що свідчить про ефективну дію поєднання ауксину та цитокініну у стимулюванні проліферації клітин. Морфологічно калюсні тканини характеризувалися пухкою консистенцією, світло-зеленим або кремовим забарвленням, що є типовою ознакою активно ростучих клітин із високим рівнем меристематичної активності.

За показниками швидкості росту калюсна культура характеризувалась помірним, але сталим приростом біомаси протягом усього періоду культивування. Динаміка зростання маси була подібною для обох видів, проте стевія демонструвала значно вищі абсолютні показники порівняно з м'ятою. Початкова маса експлантів становила відповідно 100 мг і 37 мг, тоді як на 14 добу маса калюсу зросла до 304 мг у стевії та до 93 мг у м'яти. Період найбільшого накопичення біомаси припадав на 14 – 28 добу, коли маса зразків *Stevia rebaudiana bertonii* зростала до 778 мг, а *Mentha piperita* до 423 мг. Після 28 доби спостерігалось поступове уповільнення темпів росту, і на 35 добу маса стабілізувалась (792 мг і 449 мг відповідно). Обидві культури характеризувались приростом маси за S-подібною кривою.

Стабільність росту калюсних ліній у дослідженні залишалася відносно задовільною, проте з часом спостерігалася певна варіабельність структури клітин, у вигляді зміни кольору та структури клітин, що може бути наслідком

сомаклональної мінливості при довгостроковому культивуванні та пасужуванні культури (X пасаж та більше). Незважаючи на це, калюсні тканини зберігали здатність до подальшої проліферації та використовувались як вихідний матеріал створення суспензійної культури. Це підтверджує їхню біотехнологічну цінність як початкового джерела клітинної сировини.

Суспензійна культура є подальшим етапом розвитку клітинних систем *in vitro*, що забезпечує перехід від твердого до рідкого середовища та створює умови для рівномірного росту клітин у зваженому стані. Вона дозволяє отримати однорідну клітинну масу, підвищити швидкість проліферації та полегшити контроль фізико-хімічних параметрів живильного середовища. Ми отримували суспензійну культуру шляхом перенесення калюсних клітин, переносом у рідке живильне середовище з ідентичним складом регуляторів росту. Біотехнологічна доступність цієї системи дещо нижчою порівняно з калюсною, оскільки вимагає попереднього етапу формування калюсу, та оптимізації умов подрібнення і перенесення клітин у рідке середовище, однак після стабілізації вона забезпечує більш інтенсивний і керований ріст біомаси.

У процесі культивування суспензійна культура характеризувалася високими темпами росту клітинної маси, що підтверджувалось динамікою зміни біомаси протягом 30 діб. Початкова маса інокулюму становила 1,5 г для обох видів, тоді як наприкінці циклу маса клітин досягала 8,4 г у *Stevia rebaudiana bertonii* та 7,2 г у *Mentha piperita*. Індекс росту біомаси становив 5,6 для стевії та 4,8 для м'яти, що свідчить про інтенсивне накопичення клітин і помірний рівень проліфераційної активності. Період активного росту припадав на 14 – 28 добу, після чого спостерігалось поступове насичення середовища метаболітами та перехід у стаціонарну фазу. Візуально суспензія мала світло-зелене або жовтувате забарвлення, була дрібнодисперсною та гомогенною, без осаду, з наявністю подекуди крупних частин початкового калюсу, який не розбився. Потемніння середовища чи поява некротичних клітин не спостерігалися, що підтвердило оптимальні умови для росту клітинної маси.

Помірна швидкість росту суспензійної культури поєднувалася з відносною стабільністю морфологічних характеристик, протягом періоду культивування. Утворенні агрегати були дрібні (діаметром 0,3 – 1 мм), не злипались чи осідали. Це свідчить про морфологічну однорідність системи, що є важливим при довготривалому культивуванні. У технологічному аспекті суспензійна культура вимагала постійного підтримання умов аерації (150 об/хв) та контролю стерильності середовища, однак через те що культивування проводиться в рідкому живильному середовищі та гомогенності клітинної маси, суспензійна культура є технологічно сумісною з біореакторами, що забезпечує потенціал в питанні масштабування процесу. Помірна або висока швидкість росту біомаси, можливість регулювання концентрації поживних речовин та клітин роблять суспензійну культуру найбільш придатною для виробничого нарощування сировини. За поєднання показників росту, гомогенності клітинної маси та технологічності культивування вона перевершує калюсну, однак потребує точного контролю умов середовища.

Культура «бородатих» коренів є одним з найбільш перспективних типів біотехнологічної сировини завдяки поєднанню стабільності генетичних і морфофізіологічних характеристик із високою здатністю до біосинтезу вторинних метаболітів, що локалізовані у коренях. Утворення трансформованих коренів було досягнуто шляхом індукції за допомогою *A.Rhizogenes*(A4). У результаті трансформації експлантів рослин спостерігалось формування тонких, сильно розгалужених коренів, характерних для цього типу культури. Для *Mentha piperita* частота утворення трансформованих коренів становила 28 % серед стеблових експлантів та 12% серед листових, тоді як для *Stevia rebaudiana bertonii* 26 % та 16% відповідно. У стевії перші ознаки утворення «бородатих» коренів з'являлися дещо пізніше ніж у м'яти, 13 доба для стеблових і 15 – 17 доба для листових експлантів. Такі показники можна вважати задовільними для систем агробактеріальної трансформації, оскільки отримані лінії були морфологічно стабільними та не проявляли ознак некрозів.

Біотехнологічна доступність культури «бородатих» коренів є нижчою порівняно з калюсною або суспензійною, оскільки потребує попереднього етапу агробактеріальної трансформації, ретельного добору штаму *A.Rhizogenes* і контролю параметрів кокультивування, таких як час кокультивування і умови елімінації бактерії. Також дана культура потребує ретельно відпрацьованих методик по роботі з *in vitro* рослинами. Виникають проблеми під час елімінації бактерії. Головна проблематика це збереження життєздатності рослинного експланта, який вже ослаблений бактерією, тому вибір антибіотика має бути спрямований на ефективну елімінацію бактерії без негативного впливу на фізіологічний стан тканин. Однак після успішного отримання трансформованої лінії ця система є надзвичайно стабільною, не потребує додавання регуляторів росту, зберігає морфологічну структуру протягом пасажів.

Морфологічно трансформовані корені стевії та м'яти мали світло-кремове(біле) або жовтувате забарвлення, рівномірну структуру та розвинену систему бічних відгалужень. Їхній ріст був помірний, але стабільний, без ознак деградації. Тому можна розглянути цей тип культури як модель для довготривалих досліджень.

Хоча основний синтез вторинних метаболітів *Stevia rebaudiana bertonii* та *Mentha piperita* відбувається у надземній частині, культура «бородатих» коренів має практичну цінність як стабільна система для отримання біомаси з відтворюваним фізіологоні-біохімічними властивостями. Завдяки своїй стабільності, можна використати дані культури для подальших експериментів із регуляції біосинтезу або створення трансформованих ліній з підвищеною продуктивністю.

З технологічної точки зору, для лабораторного етапу, культивування «бородатих» коренів не потребує складного обладнання, проте вимагає підтримання стерильності й ретельного контролю умов на всіх етапах індукції. Масштабування є більш складним ніж у суспензійних культур. При переході до більших масштабів культивування «бородатих» коренів ключовим є забезпечення постачання кисню, та зменшення зсувних пошкоджень. Через ниткоподібну

структуру корені легко переплітаються, формують «килим», який обмежує дифузію, тому використання біореактора з мішалковим режимом часто травмують тканину. Тому для таких систем використовуються газофазні біореактори, де культуру утримують у стерильному повітрі, та періодично обприскують середовищем. Така конфігурація дозволяє забезпечити культуру киснем та поживними речовинами, та знижує пошкодження[66].

У межах проведеного дослідження три типи рослинних тканин – калюсна, суспензійна та «бородатих» коренів продемонстрували різні профілі придатності, як біотехнологічної сировини. З позиції біотехнологічної доступності найпростішою для ініціації виявилась калюсна культура: вона індукується з листових і стеблових експлантів за відповідних комбінацій регуляторів росту, що забезпечує швидкий старт процесу. Суспензійна культура потребує попереднього одержання якісного калюсу та адаптації до рідкого середовища, тому її доступність є помірною. Культура «бородатих» коренів вимагає етапу агробактеріальної трансформації, ретельного добору штаму та режимів кокультивування, елімінації бактерії, тому на старті, серед трьох культур, вона найскладніша, проте після успішної індукції відзначається високою відтворюваністю.

За стабільністю росту та морфологічною однорідністю спостерігалась градація. Калюсна культура, яка добре індукувалась на старті, з часом може демонструвати варіабельність забарвлення і консистенції, а також є ризик соматональної мінливості й утворення некрозів. Суспензія на відрізках коротких термінів(30 діб) є морфологічно рівномірною(дрібні агрегати, гомогенний стан суспензії), але також потребує регулярного контролю, оскільки тривале культивування може супроводжуватись переходом у стаціонарну фазу через виснаження живильного середовища. Найвищий рівень стабільності продемонстрували «бородаті» корені, вони підтримують усталену форму та ріст без ознак деградації протягом пасажів, що важливо для довготривалих процесів.

Порівняння за швидкості приросту біомаси свідчить про вищу інтенсивність накопичення маси у калюсних культур. Індекс росту для калюсу

стевії становив 6,9, а для м'яти 11,1 протягом 35 діб. Для суспензії 5,6 для стевії та 4,8 для м'яти. Ці дві системи характеризувались приростом за S-подібною кривою. Культура «бородатих» коренів характеризувалась повільнішим приростом, проте її ріст залишався стабільним, без потреб у регуляторах росту.

Щодо потенціалу до синтезу вторинних метаболітів, варто враховувати, що для обох видів рослин, основна біосинтетична активність у природних умовах зосереджена у надземних органах. Проте одержані культури *in vitro* зберігають клітинний потенціал до утворення цих сполук, оскільки процеси сторинного метаболізму визначаються не лише локалізацією органів, а й генетично закладеною активністю ферментативних систем. Калюсні та суспензійні культури потенційно зручні для скринінгу факторів середовища або зміни у регуляторах росту на метаболічну активність, тоді як «бородаті» корені для довготривалих експериментів, з підбору та посиленню шляхів синтезу.

За простотою в культивуванні та обслуговуванні калюсна культура відносно нескладна(за умови належної асептики та регулярних пасажів), суспензійна вимагає шейкера, контролю аерації, складу середовища, а «бородаті» корені найбільш вимогливі на етапі індукції(вибір штаму агробактерії, кокультивування, елімінація бактерії, підбір антибіотика з мінімальною фітотоксичністю), проте зручні у подальшій підтримці(ріст без гормонів, на збіднених середовищах). Звідси складність «бородатих» коренів зосереджена на старті, а у суспензії протягом усього циклу.

Критерій масштабованості демонструє відмінності між типами культур. Калюсні тканини масштабувати складно через щільну структуру та обмежену дифузію поживних речовин, що знижує ефективність масообміну й унеможлиблює рівномірний ріст у великих об'ємах. Суспензійна культура добре пристосована до масштабування завдяки вирощенню в рідкому стані, що забезпечує ефективну аерацію, контрольоване перемішування та можливість регулювання живлення у біореакторних системах. У лабораторних умовах їх культивують у колбах зі струшуванням або роторним перемішуванням, тоді як для більших об'ємів використовують біореактори з мішалковим або

пневматичним перемішуванням(повітряний підйом)[66]. Такі системи забезпечують достатнє постачання кисню та рівномірне перемішування без утворення зон застою. Водночас важливо контролювати швидкість аерації або перемішування, щоб уникнути механічних пошкоджень, а також підтримувати стабільну температуру та рН. Оптимізація цих процесів дозволяє переходити від лабораторних до пілотних масштабів, а в подальшому до промислових. Культура «бородатих» коренів також придатна до масштабування, однак потребує специфічних технічних рішень через щільну структуру та ниткоподібну морфологію. Звичайні системи з мішалковим типом перемішування можуть призводити до механічного травмування коренів, тому застосовують газофазні або спреї- біореактори, з фіксацією біомаси на сітках чи касетах. У цих конфігураціях культура отримує достатню кількість кисню та поживних речовин без надмірного руху середовища.

Економічна доцільність використання різних типів культур залежить від масштабів виробництва(лабораторного, пілотного, промислового), цільових завдань і тривалості експлуатації культури. На лабораторному рівні калюсна культура є відносно маловитратною, оскільки не потребує складного обладнання чи систем аерації, але її утримання вимагає регулярного пасажування, постійного використання регуляторів росту та значної кількості витратного матеріалу(середовища, тара), що зумовлює накопичувальні витрати при тривалому культивування. Лабораторний рівень для суспензійних культур – це підтримання їх у колбах на шейкерах. На пілотному та промисловому рівні вона потребує суттєвіших технічних інвестицій у біореактори, датчики контролю процесу культивування. Основні витрати пов'язані з ними, та з більшими об'ємами середовища в порівнянні з лабораторним етапом. Проте ці витрати компенсуються високою швидкістю росту клітин, коротким циклом культивування. При відпрацьованих технологічних параметрах суспензійні культури забезпечують високу продуктивність біомаси на одиницю витрат. Для культури «бородатих» коренів економічна модель має інший характер. На лабораторному етапі вона потребує значних первинних ресурсів – часу,

кваліфікації персоналу, витратних матеріалів, антибіотиків. Після цього система стає маловитратною в експлуатації: не потребує регуляторів росту, здатна рости на збіднених середовищах ( $1/2$  МС). На пілотному рівні та промисловому рівні доцільно використовувати модульні біореактори середнього об'єму.

У таблиці 3.4 наведено узагальнену характеристику цих трьох культур щодо їх придатності як сировини для біотехнологічного виробництва біологічно активних речовин.

**Таблиця 3.4 Порівняльна оцінка типів культур рослинних тканин in vitro як біотехнологічної сировини**

Критерії оцінки	Калюсна культура	Суспензійна культура	Культура «бородатих» коренів
Біотехнологічна доступність	Найпростіша для індукції – формується з листових і стеблових експлантів при відповідному співвідношенні ауксинів і цитокінінів	Помірна – потребує попереднього утворення калюсу й адаптації до рідкого середовища	Найскладніша на старті – потребує агробактеріальної трансформації, добору штаму, оптимізації кокультивування.
Стабільність росту і морфологічна однорідність	Задовільна, проте можлива варіабельність кольору, консистенції та соматональної мінливості при тривалому культивуванні	Висока протягом коротких циклів(30-35 діб), клітини дрібнодисперсні, гомогенні, тривале культивування призводить до виснаження середовища	Найвища стабільність – зберігають морфологію протягом пасажів
Швидкість приросту біомаси	Найвища(індекс росту 6,9 для стевії та 11,1 для м'яти)	Помірна(індекс росту 5,6 у стевії та 4,8 у м'яти)	Повільніша в порівнянні, проте стабільна у часі
Потенціал до синтезу вторинних метаболітів	Потенційно здатна до утворення фенольних сполук і флаванолідів(стевія – поліфеноли, м'ята – фенольні кислоти)	Висока чутливість до умов середовища, перспектива у накопиченні фенольних сполук та терпеноїдів(стевія – глікозиди, м'ята – ефірноолійні терпенові компоненти)	Стабільна система для вивчення регуляції біосинтезу фенольних і терпенових сполук( у стевії можливе утворення глікозидів, м'яти – терпенів)
Простота культивування і обслуговування	Відносно проста, потребує асептики та регулярного пасажування	Вимагає контролю за параметрами культивування, потребує шейкера/біореактора	Найскладніша на етапі індукції, але в подальшому більш простіша в утриманні
Масштабованість процесу	Обмежена через щільну структуру та дифузні бактерії	Найвища – технологічно сумісна з біореакторами	Придатна до масштабування за умови використання спеціалізованих біореакторів
Економічна доцільність	Маловитратна на лабораторному рівні, але накопичує витрати через умови культивування	Витратна на етапі технологічного забезпечення	Витратна на етапі технологічного забезпечення, але економічніше через можливість вирощення на середовищах без гормонів

Отримані експериментальні результати засвідчили, що всі три типи досліджуваних культур – калюсна, суспензійна та «бородатих» коренів можуть розглядатись як перспективні джерела біотехнологічної сировини, з різним функціональним призначенням. Їх оцінка за комплексом критеріїв дозволила визначити ключові переваги, та обмеження кожної системи з точки зору практичного використання.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено ефективну схему поверхневої стерилізації експлантів, що включала послідовне занурення у 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (5с) та 0,1 % розчин хлориду ртуті HgCl<sub>2</sub> (4 хв). Ефективність стерилізації становила 63,3 % для *Stevia rebaudiana bertonii* та 70% для *Mentha piperita*, що створило оптимальні умови для подальших етапів дослідження.

2. Встановлено, що для індукції калюсоутворення найдоцільніше використовувати листову пластину як первинний експлант. Частота утворення калюсу становила 86,7 % для листових і 50% для стеблових експлантів стевії, тоді як для м'яти – 76,7 % і 40% відповідно. Найвищу проліферативну активність і найкращі морфологічні характеристики калюсу спостерігали на живильному середовищі C12 (МС + 2 мг/л НОК + 0,25 мг/л Кін).

3. Отримано суспензійну культуру шляхом перенесення калюсної тканини на рідке живильне середовище C12. Культивування здійснювали при перемішуванні зі швидкістю 150 об/хв, що забезпечувало рівномірну аерацію і запобігало агрегації клітин. Індекс приросту біомаси становив 4,6 для *S. rebaudiana* та 3,8 для *M. piperita*.

4. Проведено агробактеріальну трансформацію експлантів *Agrobacterium rhizogenes* штам А4, у результаті чого отримано «бородаті» корені *S. rebaudiana* та *M. piperita*. Тривалість кокульттивування становила 30 хв, а застосування цефатоксиму(600мг/л) забезпечило елімінацію бактерії без проявів фітотоксичності. Частота трансформації склала 26 % для стеблових і 16 % для листових експлантів стевії, а для м'яти 28% і 12 % відповідно.

5. Трансгенну природу отриманих культур підтверджено за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з праймерами до гена *rolB*, який є специфічним маркером агробактеріальної трансформації. У зразках «бородатих» коренів обох видів виявлено ампліфікацію фрагмента довжиною 780 бп, ідентичного позитивному контролю *A. rhizogenes*, за відсутності амплікона *virG*, що свідчить про інтеграцію гена *rolB* у геном рослин і відсутність бактеріальної контамінації.

6. Проведено порівняльну оцінку біотехнологічного потенціалу калюсної, суспензійної та культури «бородатих» коренів *S. rebaudiana* та *M. piperita*. Установлено, що всі три типи культур є перспективними джерелами біотехнологічної сировини з різними функціональними призначеннями. Калюсна культура характеризується високою регенераційною здатністю, суспензійна придатністю до масштабування, а культура «бородатих» коренів генетичною стабільністю.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: A Review / S. Madan, S. Ahmad, S.N. Singh et al. // I. Ind. J. Natural Products and Resources. — 2010. — Vol. 1(3). — P. 267— 286
2. Morphological and anatomical study of stevia leaves (Stevia rebaudiana (Bertoni) Hemsley) / N. A. Hudz et al. *Ukrains'kij biofarmaceutičnij žurnal*. 2017. No. 4(51). P. 40–45. URL: <https://doi.org/10.24959/ubphj.17.119>
3. Рахметов Д. Інтродукція рослин stevia rebaudiana (bert.) Bertoni в національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка на н Україні. *Теорія, методи і практики інтродукції рослин*. 2016. № 1..
4. Shahverdi M. A. Foliar fertilization with micronutrients improves Stevia rebaudiana tolerance to salinity stress by improving root characteristics. *Brazilian Journal of Botany*. 2020. P. 4–10.
5. Ceunen S., Geuns J.M.C. Steviol glycosides: Chemical diversity, metabolism, and function // *J. Nat. Prod.* – 2013. – V. 76, No 6. – P. 1201–1228. – doi: 10.1021/np400203b.
6. РОСЛИННИЦТВО : навч. посіб. / В. А. Мазур та ін. 3-тє вид. Вінниця : ТОВ "Друк", 2020. 284 с.
7. М Н С. М'ЯТА. *Фармацевтична енциклопедія*. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1525/m-yata>.
8. Yadav A., Singh S., et al. A Review on the Improvement of Stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)]. *Can. J. of Plant Sci.* 91 (2011), 1–27.
9. Rajasekaran T., Giridhar P., Ravishankar G.A. Production of Steviosides in ex vitro and in vitro Grown Stevia rebaudiana Bertoni. *J. Sci. Food Agric.* 87 (2007), 420–424. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2713>
10. Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Poulsen, C.R., and Hermansen, K. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic  $\beta$ -cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive  $K^{+}$ - channel activity. *Metabolism* 49: 208–214.

11. Neuwirth ET. Why you should sweeten with Reb M. Bayn Europe. 2020. [March 27, 2020]. Available from: <https://www.bayneurope.com/en/why-you-should-sweeten-with-reb-m/182897>.
12. Prakash I, Markosyan A, Bunders C. Development of next generation Stevia sweetener: Rebaudioside M. *Foods*. 2014;3(1):162–75. doi: 10.3390/foods3010162.
13. Perera WH, Ghiviriga I, Rodenburg DL, Alves K, Bowling JJ, Avula B, et al. Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Phytochemistry*. 2017;135:106–14. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.12.001.
14. Purkayastha S, Kwok D. Metabolic fate in adult and pediatric population of steviol glycosides produced from *Stevia* leaf extract by different production technologies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;116:104727. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104727.
15. Atteh J, Onagbesan O, Tona K, Buyse J, Decuypere E, Geuns J. Potential use of *Stevia rebaudiana* in animal feeds. *Arch de Zootec*. 2011;60(229):133–6.
16. Korobko NV, Turko YA, Shokun VV, Chernyak EN, Pokrovskii LM, Smetankina ON, et al. GC-MS investigations. II. Lipid composition of *Stevia rebaudiana*. *Chem Nat Compd*. 2008;44:359–60
17. Ruiz del Castillo ML, Santa-Maria G, Herraiz M, Blanch GP. 2003. A comparative study of the ability of different techniques to extract menthol from *Mentha piperita*. *J Chromatogr Sci* 41: 385–389.
18. Antiviral effects of medicinal plants and their active phytochemical constituents against respiratory diseases and associated biological functions. *ScienceDirect*. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/mentha-piperita>.
19. Medicinal plants: bioactive compounds, biological activities, combating multidrug-resistant microorganisms, and human health benefits - a comprehensive review - PMC. *PMC Home*. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12079674/>.

20. Hamada V. R. Biotechnological aspects of obtaining biologically active substances of *Adonis vernalis*. *Chemistry, Technology and Application of Substances*. 2021. Vol. 4, no. 1. P. 126–130. URL: <https://doi.org/10.23939/ctas2021.01.126>.
21. Akhil S. Nai. Overview on Common Active Compounds Present in Medicinal Plants. 2021. P. 70–73.
22. Natural products in drug discovery: advances and opportunities / A. G. Atanasov et al. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021. Vol. 20, no. 3. P. 200–216. URL: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
23. Мацай Н.Ю. Основи біотехнології. Луганськ: ДЗ "ЛНУ ім Тараса Шевченка", 2011. 154 с.
24. Callus Culture: Definition and Applications - Plant Cell Technology. *Plant Cell Technology*. URL: <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/callus-culture-definition-and-application>.
25. Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Субін О.В. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: НУБІП України, 2023
26. What is Suspension Culture? - Plant Cell Technology. *Plant Cell Technology*. URL: <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blog-what-is-suspension-culture>.
27. Hairy Root Culture: Definition, Process, and Applications - Plant Cell Technology. *Plant Cell Technology*. URL: <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/bloghairy-root-culture-definition-process-and-applications>.
28. Korde, V.V., Dhas, S.S., Gurave, N.A., Plant, A.J. & Res, S. (2016). Hairy Root Culture: A Promising Approach in Biotransformation, 6, No. 4, pp. 6-11.
29. Frontiers | Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications / N. Gutierrez-Valdes et al. *Frontiers*. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/plantscience/articles/10.3389/fpls.2020.00033/full>.

30. Gantait S., Mukherjee E. Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 105, no. 1. P. 35–53. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11017-9>
31. Mauro ML, Costantino P, Bettini PP. 2017. The never-ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131, 201–212
32. Dilshad E, Zafar S, Ismail H, Waheed MT, Cusido RM, Palazón J, Mirza B. 2016. Effect of rol genes on polyphenols biosynthesis in *Artemisia annua* and their effect on antioxidant and cytotoxic potential of the plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179, 1456–1468.
33. Savita S.M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A.G., Ramakrishna P. *Journal of Human Ecology*, 2004, vol. 15(4), pp. 261–264. DOI:10.1080/09709274.2004.11905703
34. Prakash Ch.V.S., Upreti M., Prakash I. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* // *Molecules*. 2011. Vol. 16(5). Pp. 3552–3562. DOI: 10.3390/molecules16053552
35. Zahn S., Forker A., Krügel L., Rohm H. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, vol. 50(2), pp. 695–701. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.07.026.
36. Дослідження коригуючого впливу рослинного екстракту з цукрознижуючими властивостями на гістоструктуру підшлункової залози щурів зі змодельованим діабетом 2-го типу / С. М. Марчишин, Н. А. Гудзь, Г. А. Крицька [та ін.]. *Світ медицини та біології*. 2018. № 2 (64). С. 160-165
37. Chen T, Chen S, Chan P, Chu Y. Mechanism of the hypoglycemic effect of Stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Plant Medicine*. 2005; 71:108-213
38. Hong, J., Chen, L., Jeppesen, P.B., Nordentoft, I., and Hermansen, K. (2006). Stevioside counteracts the  $\alpha$ -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E416–E422
39. Ghanta S, Banerjee A, Poddar A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni: A natural sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 26:10962-1096

40. de Oliveira, K.A.R., Berger, L.R.R., Araujo, S.A., Camara, M.P.S., Souza, E.L., 2017. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiol.* 66, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>
41. Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Santos, M.M.F., Lucio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., de Souza, E.L., 2016. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innov. Food Sci. Emerging Technologies* 34, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.008>.
42. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis / J. S. Dambolena et al. *Toxicon*. 2008. Vol. 51, no. 1. P. 37–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.005>
43. Smaoui, S., Hsouna, A.B., Lahmar, A., Ennouri, K., Mtibaa-Chakchouk, A., Sellem, I., Najah, S., Bouaziz, M., Mellouli, L., 2016. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacT635 in stored minced beef meat. *Meat Sci.* 117, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.006>.
44. Ostonova Gulnoza Rashidovna. Medicinal Properties of Mint (*Mentha*) Plants. *Modern medicine and practice*. 2025. Vol. 4, no. 5. P. 2–3.
45. *Mentha*: Nutritional and Health Attributes to Treat Various Ailments Including Cardiovascular Diseases / S. Saqib et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 19. P. 6728. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules27196728>
46. Figueroa-Pérez MG, Pérez-Ramírez IF, Enciso-Moreno JA, Gallegos-Corona MA, Salgado LM, Reynoso-Camacho R. Diabetic nephropathy is ameliorated with peppermint (*Mentha piperita*) infusions prepared from salicylic acid-elicited plants. *Journal of Functional Foods*. 2018;43:55-61

47. Badal RM, Badal D, Badal P, Khare A, Shrivastava J, Kumar V. Pharmacological action of *Mentha piperita* on lipid profile in fructose-fed rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10:843-848
48. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts - PMC. PMC Home. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3218439/>.
49. Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
50. Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review / H. López-Salazar et al. *BioResources*. 2023. Vol. 18, no. 3. URL: <https://doi.org/10.15376/biores.18.3.lopez-salazar>
51. Solid Phase Extraction Guide | Thermo Fisher Scientific - DE. *Thermo Fisher Scientific* - DE. URL: <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/sample-preparation-consumables/solid-phase-extraction-consumables/spe-guide.html>
52. Advances in analytical techniques for bioactive compound quantification in medicinal Plants: Innovations, Challenges, and pharmaceutical applications / Q. Zhang et al. *Microchemical Journal*. 2025. Vol. 214. P. 114119. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.114119>
53. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts - PMC. PMC Home. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3218439/>
54. Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities - PMC. PMC Home. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4364778/>.

55. Secondary Metabolite Production in Transgenic Hairy Root Cultures of Cucurbits. *Europe PMC*.  
URL: <https://europepmc.org/article/PMC/PMC7123301>.
56. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. 15. 473 – 497.
57. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression - PMC. *PMC Home*.  
URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3809525/>.
58. Ahmad N., Rab A., Ahmad N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016. Vol. 154. P. 51–56.  
URL: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015>
59. Khaldari I., Afshoon E., Nik S. H. Phytohormonal elicitation triggers oxidative stress and enhances menthol biosynthesis through modulation of key pathway genes in *Mentha piperita* L. *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15, no. 1.  
URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16667-1>
60. Wilson S. A., Roberts S. C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*. 2011. Vol. 10, no. 3. P. 249–268.  
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>
61. Amini S., Fattahi M., Nazemiyeh H. Optimization of induction and hairy root culture establishment in two mullein species, *Verbascum erianthum* and *Verbascum stachydiforme*. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14, no. 1.  
URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56331-8>
62. Shirin Yousefian. Production of phenolic acids in hairy root cultures of medicinal plant *Mentha spicata* L. in response to elicitors. *MBRC*. 2020. Vol. 9, no. 1. P. 23–24.
63. An efficient genetic transformation system mediated by *Rhizobium rhizogenes* in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion /

- L. Liu et al. *Plant Biotechnology Journal*. 2024.  
URL: <https://doi.org/10.1111/pbi.14328>
64. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини / В. А. Кунах // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 28-39. — Бібліографія
65. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
66. Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects / H. N. Murthy et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14.  
URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588>

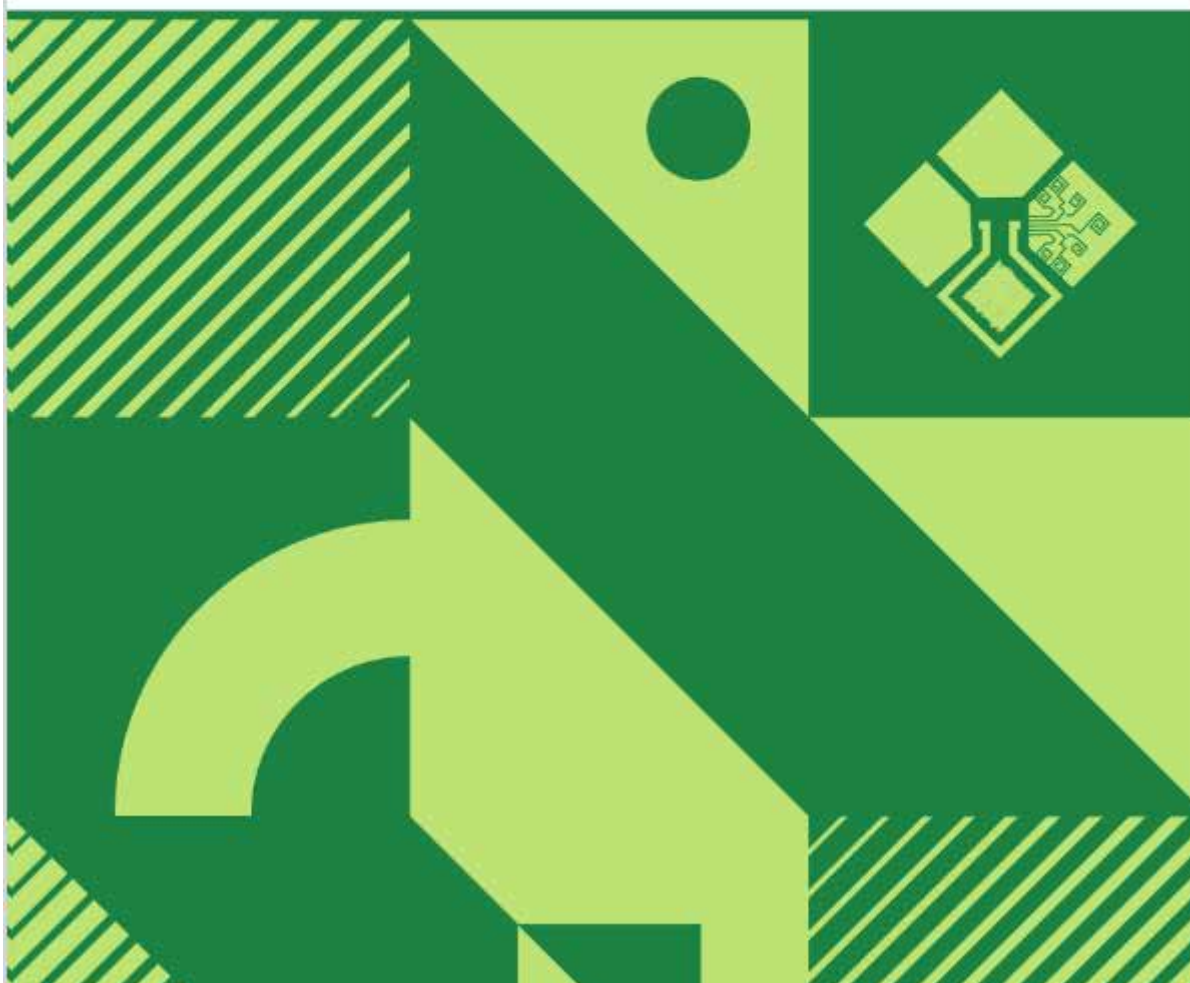
## ДОДАТОК 1

**ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ**

З МАТЕРІАЛАМИ VII МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ

**24 ЖОВТНЯ 2025 РІК**

М. ЖИТОМИР, УКРАЇНА

**«НАУКОВІ ВІДКРИТТЯ ТА ФУНДАМЕНТАЛЬНІ  
НАУКОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ: СВІТОВИЙ ДОСВІД»**

## МОРФОГЕНЕЗ ТА РОЗМНОЖЕННЯ *MENTHA PIPERITA*

**Моргун Євген Євгенович**

Здобувач вищої освіти факультету захисту рослин, біотехнології та екології  
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна

**Науковий керівник: Кваско Олена Юріївна**

канд. біол. наук., доцент, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття  
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна

М'ята перцева — багаторічна трав'яниста рослина до 30–55 см заввишки. Кореневище горизонтальне, зі слабкомичкуватою кореневою системою, що проникає в ґрунт на глибину 60–80 см[1]. З листя м'яти добувають цінну ментолову олію, яку використовують у фармацевтичній, миловарній, харчовій, кондитерській та інших промисловостях. Вихід олії становить 2–3 % маси сухого листя, а в окремих сортів при вирощуванні їх у південних районах – до 4 %. Олія м'яти містить 50–60 % ментолу[2]. Біотехнологічні методи отримання рослин через культуру *in vitro* є альтернативним традиційному, оскільки уможлиблює звільнення від екзогенної та ендогенної інфекції тканини рослин та одержати елітний безвірусний рослинний матеріал.

Метою нашої роботи є введення в культуру *in vitro* рослин м'яти та опис її морфогенезу залежно від складу живильного середовища та вмісту регуляторів росту.

Вихідним матеріалом були пагони з вегетативними бруньками м'яти. В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень [3]. Нами було застосовано дану схему стерилізації:

1. Промивання під проточною водою на 10 хв.
2. Наступні етапи проводили у ламінар-боксі, занурення на 5 с у 70% спирт.
3. Занурення у 0,1 % розчин  $HgCl_2$  на 3,5 хв.
4. Трикратне відмивання у стерильній дистильованій воді по 10 хв кожне.

Експлантати поміщали на середовище Мурасіге-Скуга (МС) [4]. Отримані проростки та розвинуті бічні пагони перепасировували на середовище МС з додаванням 0,5мг/л БАП та кінетину у концентрації 1 мг/л. Параметри росту фіксували на 30 добу культивування. Загальна кількість висаджених експлантів складала 30 шт.

В результаті проведених нами досліджень встановлено, що через 7 днів культивування. У рослинному матеріалі виявилась грибова контамінація та некрози. З загальної кількості висадженого рослинного матеріалу у кількості 30 шт, контамінація була присутня у 4. Некрозу зазнало 5 експлантів через занадто велику експозицію стериліанту, та розміри експлантів. Ефективність стерилізації склала 70 %. На рослинному матеріалі який пройшов стерилізацію і не зазнав контамінації спостерігався позитивний ріст дочірніх рослин з бічних бруньок, з яких потім проводилась відсадка новоутвореного рослинного матеріалу. Через 21 день культивування дочірні рослини досягнули розміру 2-3,5 см та мали по 2-3 міжвузля, що дозволило пересадити їх на свіже безгормональне середовище МС для подальшого культивування та продовжити розвиток шляхом прямого морфогенезу. Для подальшого вивчення морфогенезу експлантати пересаджували на середовища: МС+0,5мг/л БАП (B0,5), МС+1мг/л кінетину (K1).

На середовищі B0,5 висота експлантатів варіювала від 2 до 6 см. Рослини були переважно одного розміру, без сильно вираженого апікального домінування. Листя середньо-дрібного розміру, скручені зелено-салатового забарвлення. Бічні бруньки з 3-4 міжвузля добре розвивались. Також спостерігали калюсоутворення та відсутність ризогенезу. При цьому калюс мав зелено-буре забарвлення та невеликі розміри. Коефіцієнт розмноження становив 1:6,5.

На середовищі K1 мінімальна висота експлантатів склала 3см, максимальна 7см. Рослини вирости нерівномірно, але середня висота склала 5 см. Апікальне домінування сильно виражене. Бічні бруньки розвивались тільки при основі експланта. Листя було зеленого забарвлення, листові пластини середнього розміру(0,3мм-0,7мм). Коефіцієнт розмноження 1:5,6.

Таким чином, нами було виявлено, що проведення введення в культуру *Mentha piperita* найкраще проводити з пагонів з бічними бруньками. З вибірки середовищ найефективнішим виявилось B0,5 (МС+0,5мг/л БАП). На даному середовищі культура давала найбільший та найшвидший приріст біомаси за термін у 30 днів, та найвищий коефіцієнт розмноження, що становило 1:6,5, але культура мала ознаки вітрифікації, яка зникала при пересадці на базове безгормональне середовище МС. Даний склад живильного середовища можна рекомендувати для клонування м'яти в умовах *in vitro*.

## ДОДАТОК 2

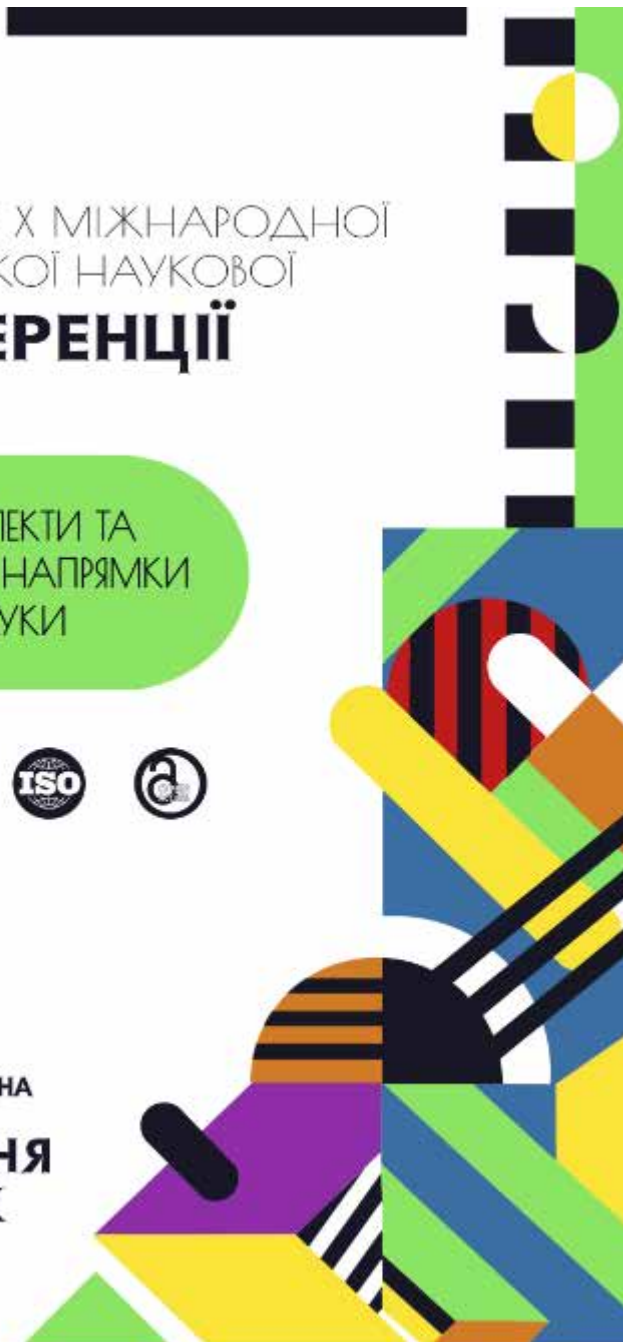
МАТЕРІАЛИ Х МІЖНАРОДНОЇ  
СТУДЕНТСЬКОЇ НАУКОВОЇ  
**КОНФЕРЕНЦІЇ**

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ТА  
ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ  
РОЗВИТКУ НАУКИ



М. ЛУЦЬК, УКРАЇНА

**24 ЖОВТНЯ  
2025 РІК**



## СЕКЦІЯ 12.

# БІОЛОГІЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

**Моргун Євген Євгенович**, здобувач вищої освіти факультету захисту рослин, біотехнології та екології

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна*

**Науковий керівник: Кваско Олена Юрївна**, канд. біол. наук., доцент, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна*

## КАЛЮСОГЕНЕЗ *STEVIA REBAUDIANA BERTONI* В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Стевія медоносна (*Stevia rebaudiana bertonii*) – багаторічна трав'яниста рослина у вигляді куща з високими опушеними стеблами (від 60 до 120 см), листя якої містить унікальні речовини – ребаудіозид і стевіозиди – дитерпенові глікозиди, що складаються з глюкози, гомодисахариду софорози і стевіолу. Завдяки цим речовинам листки у 300 разів солодші за цукор [1]. Біотехнологічні методи отримання рослин через культуру *in vitro* є альтернативним традиційному, оскільки уможливило звільнення від екзогенної та ендогенної інфекції тканини рослин та одержати елітний безвірусний рослинний матеріал. Калюсогенез є важливий етапом біотехнологічних досліджень, оскільки отримані калюсні культури можуть використовуватись як продуктивна система для синтезу вторинних метаболітів, зокрема стевіолглікозидів, що визначають цінність *Stevia rebaudiana bertonii* як лікарської та промислової рослини.

Метою нашої роботи є отримання калюсу в культурі *in vitro* рослин стевії та його опис залежно від складу живильного середовища та вмісту регуляторів росту.

Вихідним матеріалом слугували *in vitro* рослини стевії, а саме частини пагона та листки. В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень [2]. Нами було розроблено живильних середовищ для культивування калюсів даної культури:

1. MS + 1 мг/мл 2,4-Д + 0,05 мг/мл БАП(C11)
2. MS + 0,25 мг/мл Кін + 2 мг/мл НОК(C12)
3. MS + 1 мг/мл НОК(C13)
4. MS + 1 мг/мл 2,4-Д + 0,05 мг/мл БАП + 20 мг/мл Аскорбінової кислоти(C11.1)

Культивування проводили у термостаті при температурі 23 °С та вологості 60-70% в абсолютній темряві, термін культивування 30 діб. Вибірка рослин(пагонів та листків) на кожне середовище становила 20 експлантів.

В результаті проведених нами досліджень було встановлено, що для отримання калюсних тканин ефективно використовувати листкові сегменти рослин. На пагонах калюс утворився на 7 експлантах, за загальної вибірки у 20 шт, що склало 35%. При використанні листкової пластини частота утворення калюсної тканини склала 90% (18 експлантів з 20).

На середовищі C11 на 7 добу культивування спостерігали перші ознаки калюсоутворення. Утворений калюс характеризувався жовтим забарвленням і щільною консистенцією. Протягом подальших 7 діб відзначалося уповільнення ростових процесів та потемніння тканини, що ймовірно, було зумовлено інтенсивним фенольним окисненням. Для запобігання цим процесам і стабілізації росту калюсних культур до складу живильного середовища було введено антиоксидант – аскорбінову кислоту у концентрації 20 мг/мл[2]. При такому складі новоутворений калюс мав більш світло-жовтий колір, на 14 добу культивування ріст не припинявся, а тканини не темніли.

На живильному середовищі C12, перші ознаки калюсоутворення з'являлись на 10 добу культивування. Отриманий калюс мав світло-зелене забарвлення та відзначався пухкою консистенцією. Наприкінці терміну культивування на окремих експлантах спостерігалось спонтанне коренеутворення, що свідчить про участь ауксину у процесах ризогенезу[3]. На середовищі C13, яке містило лише ауксин без додавання цитокініну, калюсоутворення не відбувалося, натомість із зон пошкодження на листовій пластині формувалися корені.

Таким чином, нами встановлено, що для індукції калюсоутворення *Stevia rebaudiana bertonii* найбільш доцільним є використання листових сегментів, оскільки вони характеризуються вищою морфогенетичною активністю порівняно з пагонами. Співвідношення ауксинів та цитокінінів визначає напрям морфогенезу і є ключовим чинником у формуванні калюсних структур. Найефективнішим середовищами для ініціації калюсоутворення виявилися варіанти C11.1 та C12, на яких спостерігали утворення щільного жовтого та світло-зеленого калюсу з ознаками активного росту.

#### Список використаних джерел:

1. Abdelkarim Khiraoui, Aziz Hasib1 Chaouki Al Faiz, Fatimazahra Amchra, Mohamed Bakha, Abdelali Boulli. *Stevia Rebaudiana Bertoni (Honey Leaf): A Magnificent Natural Bio-sweetener, Biochemical Composition, Nutritional and Therapeutic Values. Journal of Natural Sciences Research, 2017.7(14). 75-85.*
2. Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Субін О.В. *Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: НУБІП України, 2023. – 350 с.*
3. Kanungo S. Role of auxins in the in vitro rooting and micropropagation of *Holarthena antidysenterica* Wall., a woody aromatic medicinal plant, through nodal explants from mature trees. *Journal of Medicinal Plants Research. 2012. Vol. 6, no. 31. URL: <https://doi.org/10.5897/jmpr12.171>*