

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1988 «С» 2023.11.01. 16 ПЗ

СИПЧЕНКО ОКСАНИ ЮРІЇВНИ

2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:57.085

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та
екології

_____ Коломієць Ю.В.
«__» _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувача кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.
«__» _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему Мікроклональне розмноження *Dracoscephalum moldavica* L. та дослідження вмісту біологічно активних речовин методом вискоефективної рідинної хроматографії

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

Д.с.-г.н., професор

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Лісовий М.М.

(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

к. б. н., доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Субін О. В.

(ПІБ)

Виконала

_____ (підпис)

Сипченко О. Ю.

(ПІБ студента)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
к.б.н., доцент Кваско О.Ю.
« » 2024 р.

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Сипченко Оксані Юріївні

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи Мікроклональне розмноження *Dracoscephalum moldavica* L. та дослідження вмісту біологічно активних речовин методом високоефективної рідинної хроматографії затверджена наказом ректора НУБіП України від “1” листопада 2023 р. № 1998С

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2024р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи рослина *Dracoscephalum moldavica* L., мікроклональне розмноження, біологічно активні речовини, живильне середовище, високоефективна рідинна хроматографія, фенольні сполуки.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Ботанічна та морфологічна характеристики *Dracoscephalum moldavica* L..
2. Підбір ефективного живильного середовища для мікроклонального

розмноження *Dracoscephalum moldavica* L..

3. Огляд літератури з використання високоефективної рідинної хроматографії для визначення якісного складу сполук.
4. Дослідження вмісту біологічно активних речовин за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.

Дата видачі завдання “1” вересня 2023р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

Субін О. В.

Завдання прийняла до виконання

(підпис)

Сипченко О. Ю.

РЕФЕРАТ

Робота виконана на 84 сторінках, містить 3 розділи, 14 рисунків, 7 таблиць, 89 використаних джерел.

Мета дослідження – мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського та дослідження вмісту біологічно активних речовин за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.

Змієголовник молдавський широко використовується у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості. У народній медицині екстракти та ефірна олія Змієголовника мають болезаспокійливі, протизубні, протизапальні, протисудомні та седативні властивості.

Мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського дозволяє забезпечити генетичну однорідність та стабільність рослин, що неможливо досягти при традиційному насінневому або вегетативному розмноженні, яке може призводити до генетичної варіабельності. Завдяки МКР вдається отримувати ідентичні рослини, які мають стабільний вміст таких цінних речовин, як флавоноїди, фенольні кислоти та ефірні олії. Це особливо важливо для забезпечення високої якості лікарської сировини.

Мікроклональне розмноження мінімізує вплив зовнішніх факторів, таких як зміни клімату, забруднення, шкідники та хвороби, що впливають на якість і кількість активних речовин у рослинах. Завдяки контрольованим умовам *in vitro* цей метод дозволяє отримувати стабільні врожаї високоякісної продукції.

Відповідно до проведених досліджень виявлено, що використання насіння в якості експлантатів для мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського є ефективним. Після 30 діб вирощені рослини були придатні для екстракції, що забезпечило отримання достатньої кількості біомаси для проведення подальших хімічних аналізів. Це свідчить про те, що мікроклональне розмноження є ефективним методом для отримання матеріалу, придатного для досліджень біологічно активних речовин.

Проведений метод ВЕРХ екстракту Змієголовника молдавського показав наявність низки важливих біологічно активних речовин, серед яких:

розмаринова кислота, діосметин-7-О-глюкуронід, апігенін-7-О-глюкозид, акацетин-7-О-глюкуронід, тіліанін, акацетин. У ході дослідження екстракту коріння Змієголовника молдавського методом ВЕРХ не було виявлено значних піків, що свідчить про низький вміст біологічно активних речовин у цій частині рослини.

Загалом виявлені біологічно активні речовини мають значний терапевтичний потенціал, зокрема антиоксидантні, протизапальні, кардіопротекторні та антиканцерогенні властивості. Це підтверджує доцільність використання Змієголовника молдавського в фармацевтичній промисловості для створення препаратів на основі натуральних компонентів.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1. Загальна характеристика родини	10
1.2. Ботанічна та морфологічна характеристики Змієголовника молдавського.	11
1.3. Хімічний склад насіння та надземних частин рослини	12
1.4. Біологічна, антиоксидантна та антимікробна властивості Змієголовника молдавського	16
1.5. Актуальність та переваги мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
2.1. Стерилізація, як один із основних факторів отримання асептичних рослин Змієголовника молдавського	25
2.2. Живильне середовище для отримання асептичних рослин Змієголовника молдавського	27
2.3. Високоєфективна рідинна хроматографія як метод кількісного визначення вмісту БАР в рослині.	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	44
3.1. Мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського	44
3.2. Дослідження вмісту БАР методом аналітичної високоєфективної хроматографії.	49
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	62
ДОДАТКИ.....	72

ВСТУП

В даний час у всьому світі спостерігається зростаюча тенденція до споживання лікарських і ароматичних рослин сільськогосподарських культур. Зростає попит на лікарські рослини для виробництва фітопрепаратів, товарів для здоров'я, дієтичних добавок або косметики. Рослинної сировини з лікарських рослин недостатньо для забезпечення потреб галузі, тому існує перевага культивованому рослинному матеріалу, тому що більшість фармацевтичних компаній віддають перевагу сировині, яка відповідає необхідним умовам якості. Отож важливою метою стає розширення культивування лікарських видів рослин.

Мікроклональне розмноження лікарських рослин має кілька вагомих переваг. Воно дозволяє швидко і ефективно отримувати велику кількість рослин, що особливо важливо для забезпечення стабільного постачання сировини для фармацевтичної промисловості. Завдяки цьому методу всі отримані рослини є генетично ідентичними, що гарантує однорідність їхніх лікувальних властивостей і хімічного складу. Це особливо важливо для стандартизації препаратів, оскільки вміст активних речовин у лікарських рослинах має бути стабільним.

Мікроклональне розмноження також забезпечує виробництво рослин, вільних від хвороб і патогенів, оскільки розмноження відбувається в стерильних умовах. Це значно підвищує якість та безпеку кінцевої продукції. Крім того, даний метод дозволяє зберігати та розмножувати рідкісні та зникаючі види лікарських рослин, що є важливим для збереження біорізноманіття і генетичних ресурсів.

Після отримання рослин методом мікроклонального розмноження важливим етапом є дослідження їх хімічного складу, зокрема вмісту біологічно активних речовин. Одним із найбільш точних і надійних методів кількісного аналізу є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), яка дозволяє визначати кількість і склад різноманітних сполук у рослинній сировині.

Мета дослідження – мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського та дослідження вмісту біологічно активних речовин за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.

Відповідно до мети вирішувались наступні завдання:

- Аналіз літератури щодо біологічних характеристик родини Глухокропивових (*Lamiaceae*) та Змієголовника молдавського (*Dracoscephalum moldavica L.*);
- Стерилізації насіння *Dracoscephalum moldavica L.*;
- Вибір оптимальних умов культивування *in vitro*;
- Мікроклональне розмноження *Dracoscephalum moldavica L.*;
- Отримання асептичних рослин *Dracoscephalum moldavica L.*;
- Дослідження вмісту біологічно активних речовин за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.

Об'єкт дослідження – Змієголовник молдавський (*Dracoscephalum moldavica L.*) – лікарська рослина родини Глухокропивових (*Lamiaceae*).

Предмет дослідження – процес вирощування Змієголовника молдавського в лабораторних умовах шляхом мікроклонального розмноження, а також використання методу високоефективної рідинної хроматографії для дослідження вмісту біологічно активних речовин.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика родини

Глухокропикові (*Lamiaceae*), або Губоцвіті (*Labiatae*), також відомі як родина м'яти або глухої кропиви, в порядку Губоцвіті (*Lamiales*), є родиною дводольних квіткових рослин, поширених у всьому світі, переважно в регіонах Середземномор'я та Південно-Західної Азії. Родина налічує близько 236 родів і, як було заявлено, містить від 6900 до 7200 видів, але світовий контрольний список містить 7534 [85].

Родина налічує такі, найбагатші підродини: Горлянкові (*Ajugoideae*), *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Teucrioideae*.

Рослини зазвичай є травами, напівчагарниками або кущами, що ростуть на відкритих сухих місцях. Стебла прямостоячі, але є рослини з пагонами, що вкорінюються, або сланкими. У перетині стебла чотиригранні або округлі.

Цільне чи розсічене листя, позбавлене прилистків, розташоване супротивно, рідше – кільцями, а пари листків – хрест-навхрест. Листки, стебла і генеративні органи зазвичай вкриті волосками та характерними ефіроолійними залозками. Продихи діацитного типу [68]. Квітки формуються у вузлах листя поодинокі, попарно або в нечисленних суцвіттях, які сукупно виглядають як складний колос. Також суцвіття може бути китицеподібне або головчасте.

Чашечка здебільшого двогуба, залишається і розростається при плодах. Віночок білий, жовтий, червоний, фіолетовий або синювато-фіолетовий, двогубий, трубчасто-лійкоподібний, зрідка – одногубий (у разі редукції верхньої губи) [71]. Андроцей із чотирьох двосильних тичинок, що часто прирастають до трубки віночка, іноді тичинки однакові (м'ята), іноді 2 тичинки фертильні, а 2 – видозмінені в стамінодії (шавлія). Верхня зав'язь із двома взаємно перпендикулярними перегородками, що поділяють порожнину на 4 частини, в кожній з яких розвивається по одному насінному зачатку. Біля основи зав'язі – нектароносний диск. Плід роздрібний – ценобій, який складається з 4 однонасінних горішків, захищених чашечкою [35].

1.2. Ботанічна та морфологічна характеристики Змієголовника молдавського

Змієголовник молдавський або маточник городній (*Dracosephalum moldavica* L.) – однорічна трав'яниста ароматична рослина родини Глухокропивових (*Lamiaceae*), яка досягає 80 см у висоту. Рід *Dracosephalum* містить 71 вид та широко поширений у регіонах Північної півкулі [53]. Змієголовник молдавський походить з помірного клімату Азії. Він представляє місцеві види в Ірані, в основному в західних частинах провінції Азербайджан і в горах Альбурз і через це велика кількість досліджень була проведена в цій країні [47]. Проте він натуралізований у Східній та Центральній Європі. Є дослідження щодо впровадження цієї рослини в сільське господарство у Фінляндії, Україні, Німеччині, Румунії, Чехії, Польщі, а також у Туреччині, Єгипті і Китаї. Він також був завезений на північний схід Сполучених Штатів [5].

Змієголовник молдавський широко використовується у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості. У народній медицині екстракти та ефірна олія Змієголовника мають болезаспокійливі, протизубні, протизапальні, протисудомні та седативні властивості [65].

Змієголовник молдавський має красиві сині або фіолетові квіти з цитрусовим смаком та нагадує мелісу лікарську (*Melissa officinalis* L.) і котячу м'яту (*Nepeta cataria* L.). Через це його культивують у садах як декоративну рослину, а в деяких країнах Змієголовник росте як медоносна рослина [23].

Змієголовник молдавський – однорічна рослина з численними стеблами (до 6), висотою 22-45 см, стебла прості або розгалужені, зазвичай прямостоячі або висхідні. Міжвузля 3-4,7 см завдовжки, рідко вкриті короткими дрібно загнутими назад фіолетовими волосками. Листки прикореневі, довгасто-яйцевидно-трикутні 1,7-2,4 см завдовжки, 0,8-1,2 см завширшки, по краю городчасто-зубчасті, черешок як лопатка, 1,2-1,8 см завдовжки, коротший догори [43]. Квітки зібрані в псевдозавитки, що ростуть у пазухах листків, чашечка і віночок чітко двогубі. Віночок може бути фіолетово-блакитним або

білим. У прикореневій частині він утворює відносно довгу трубку, доступну для комах з досить довгим язиком. Однак розширене горло квітки забезпечує бджолам доступ і до нектару. Біля основи зав'язі розташований дископодібний нектарник [23].

Ефірна олія накопичується в екзогенних масловмісних клітинах листків і в суцвітті. У кожному симподіумі суцвіття можна знайти по шість квіток, а стебло суцвіття містить 20-25 псевдозавитків. Цвіте рослина протягом 30 днів [25, 32, 66].

Насіння Змієголовника молдавського почине проростати через 44 год і поступово досягає найвищої схожості через 126 год. Стадія швидкого водопоглинання триває 7 год, після чого вміст води досягає 223%. Через 14 год насіння вкривається слизом [89]. Змієголовник висівають навесні, а цвітіння починається через 90 днів [25]. Він має вегетаційний період 190 днів, що вимагає 1877,9°C і 325,2 мм опадів. Рослини збирають для посіву (розвинених) через 137 днів, при цьому сума накопичених температур становить 2492,1°C, а кількість опадів – 355 мм [24].

1.3. Хімічний склад насіння та надземних частин рослини

Урожайність надземної частини Змієголовника молдавського коливається від 5,7 до 8,3 т/га [25]. Свіжа рослина містить 0,06-0,7% летючої олії. Накопичення летких олій збільшується в генеративний період, і воно є максимальним у період опадання цвіту [4, 51]. Оптимальний час для збирання з метою отримання ефірної олії – під час повного цвітіння, коли також є дозрівання насіння [32, 66]. Ефірна олія з надземних частин має блідо-жовтий колір [15].

Вміст ефірної олії в надземних частинах залежить від багатьох факторів, серед яких популяція та технологія вирощування (внесення добрив, час збирання). Дослідження в Ірані з 7 місцевими сортами *D. moldavica* показують, що вміст олії коливався від 0,03 до 0,12% [15]. Підвищення рівня плоідності спричинило значні зміни в деяких морфологічних і фізіологічних ознаках і діючих речовинах рослини [57]. Окрім цього, вміст ефірної олії значно

змінювався протягом фенологічних стадій, тобто під час збору врожаю [5, 46]. Добриво також має значний вплив на відсоток ефірної олії [39, 69]. Залежно від частини рослини кількість і склад ефірної олії також можуть змінюватися.

Хімічний склад ефірної олії з надземних частин *D. moldavica* також залежить від багатьох факторів, серед яких походження, система вирощування, удобрення, сольовий стрес, боротьба з бур'янами тощо [32]. Огляд хімічного складу ефірної олії Змієголовника наведено в таблиці 1.1. Однак основними сполуками майже всіх ефірних олій є геранілацетат і гераніол.

Геранілацетат – складний ефір гераніола і оцтової кислоти, представник терпеноїдів [55]. Геранілацетат міститься більш ніж у 80 ефірних оліях.

Гераніол – спирт, представник терпеноїдів, споріднений міоцену [55]. Гераніол відноситься до запашних речовин, застосовується для складання парфумерних композицій, ароматизації мила і миючих засобів.

Нерал – це енал, який є 3,7-диметилоктаналем з ненасиченістю в положеннях С-2 і С-6 [55]. Він був виділений з ефірних олій таких рослин, як лимон. Він відіграє роль індуктора апоптозу та рослинного метаболіту.

Цитраль – ациклічний монотерпеновий альдегід. Цитраль виглядає як прозора рідина жовтого кольору з лимонним запахом. Менш густий, ніж вода, і нерозчинний у воді [55].

Дослідження показують, що ці хімічні сполуки в ефірній олії досягають свого максимального рівня під час цвітіння, тоді як вміст нералю зменшується під час цвітіння. Ці спостереження вказують на те, що біосинтез геранілацетату є домінуючим на початку вегетаційного періоду, але витісняється біосинтезом гераніолу та цитралю з ранньої стадії цвітіння. Це показало, що оптимальний час збору врожаю виявився під час фази цвітіння, коли вміст олії найвищий, а отже, і кількість основних терпенів найвища [40]. Проте хімічний склад *D. moldavica* значно відрізняється в Китаї, де домінуючими сполуками були: 1,8-евкаліптол (31,25%) і 4-терпінеол (22,82%), за якими йшли спирт кмину (4,29%) і α -терпінеол (4,21%) [19].

Таблиця 1.1

Хімічний склад ефірної олії різних зразків Змієголовника молдавського

Країна	Джерело	Ліналоол	Нерал	Гераніол	Цитраль	Нерол	Нерил ацетат	Гераніл ацетат
Україна	Kotyuk and Rakhmetov, 2017.	-	10.25-43.49	3.35-28.14	11.52-42.45	2.76-15.76	1.17-1.25	0.37-14.65
Єгипт	Hussein et al., 2006.	16.8-37.5	-	2.2-9.9	11.6-24.2	0.2-6.5	0.2-1.0	0.2-2.5
Єгипт	El-Baky and El-Baroty, 2008.	1.38	11.99	14.96	23.67	3.16	5.0	24.93
Іран	Omidbaigi et al., 2010.	-	14.10-15.40	16.30-19.50	9.10-9.90	5.50-5.80	4.70-5.40	36.30-40.40
Іран	Maham et al., 2013.	1.54	31.05	17.08	31.14	-	4.03	0.48
Єгипт	Aziz et al., 2013.	2.28-2.72	17.82-18.83	0.50-9.33	19.13-35.19	1.65-2.91	1.47-2.49	18.97-30.36
Туреччина	Ehsan et al., 2014.	1.1-1.5	17.7-20.2	7.7-10.2	23.7-27.6	1.9-2.1	-	36.5-43.6
Єгипт	Ahl et al., 2015.	1.93-2.74	17.85-18.36	12.66-16.68	19.37-20.42	1.49-3.31	2.79-5.39	27.02-28.81
Єгипт	Hegazy et al., 2016.	1.97-2.03	19.93-20.56	15.69-17.91	22.57-24.56	1.49-2.31	-	28.85-29.60
Іран	Golparvar et al., 2016.	1.35	16.25	24.31	11.21	0.35	0.91	36.62
Іран	Ehsani et al., 2017.	0.82	21.21	19.60	28.52	1.86	1.76	16.72
Іран	Janmohammadi et al., 2017	0.36-1.47	13.38-21.26	16.86-22.05	21.81-29.32	-	0.37-2.52	22.51-24.72
Іран	Fallah et al., 2018.	0.14-0.5	21.90-28.57	1.47-4.85	29.08-39.44	0.02-0.14	0.50-1.99	24.68-34.80

Крім ефірної олії надземні частини *D. moldavica* містять флавоноїди, іридоїди, дубильні речовини, гідроксикоричну та карбонову кислоти) [64]. Загальний вміст фенолів, визначений за допомогою аналізу Folin-Ciocalteu,

становив 289,55 мг GAE/г сухого екстракту, а розмаринова кислота була основним поліфенолом екстракту (107,11 мг/г сухого екстракту) [7]. Крім того, з надземних частин *D. moldavica* були виділені нові тетрамерні сполуки кавової кислоти, названі (+) метилрабдозійном, разом із сімома відомими мультимерами кавової кислоти та одним мономером. Ці сполуки продемонстрували потужну захисну дію 12,5 мкг/мл проти апоптозу, викликаного перекисом водню [88]. Було ідентифіковано вісім сполук, таких як апігенін, лютеолін, кемпферол, ізорамнетин, тіліанін, агастахозид, акацетин-7-О-(6-О-малоніл-бета-D-глюкопіранозид) і сирінгорезинол [37].

Насіння Змієголовника молдавського коричневе, деревовидне, з характерними білими контурами навколо карункула. Маса 1000 насінин становить від 2,0 до 2,5 г, довжина 2,5-3,0 мм, діаметр 1,0-1,2 мм [25]. Урожайність насіння *D. moldavica* коливається від 1,5 до 3,4 т/га [32, 66]. Збирання насіння можна проводити, коли воно в середині суцвіття і в стані воскової стиглості. Хімічний склад насіння Змієголовника такий:

- вологість близько 6,0%,
- вміст сирої олії між 18-29%,
- сирий білок між 17-21,4%,
- сира клітковина близько 30,2%,
- крохмаль 25,6%
- вміст слизу між 10 і 16% [27].

Як згадувалося вище, насіння *D. moldavica* є хорошим джерелом жирної олії. Олія насіння жовта, пряна і має ароматний запах. Показник заломлення (при 25°C) становить 1,480, а щільність (при 25°C) – 0,932. Однак він багатий ненасиченими жирними кислотами (близько 90%), насамперед ліноленовою та лінолевою (близько 60 та 20% відповідно), які належать до незамінних жирних кислот [25, 27]. Окрім цього, слиз насіння Змієголовника також має високий біологічний потенціал як нова антиоксидантна їстівна плівка з цікавими специфікаціями, яку можна використовувати для упаковки різних харчових продуктів [11]. Крім того, загальний вміст фенолів коливався від 4,97 до 5,32 мг

GAЕ/г, тоді як антиоксидантна здатність насіння *D. moldavica* становила в середньому близько 40%, що відповідало значенням EC50 0,12 та 0,13 мг/мл. Ці цікаві властивості відносять насіння *D. moldavica* до групи сировини, придатної для нутрицевтиків, харчових добавок і функціональних харчових продуктів [27].

Зважаючи на використання насіння як компонента в харчуванні, його мікробіологічна якість є дуже важливою. Дослідження показують, що найбільш домінуючими грибами, які зустрічаються на насінні *D. moldavica*, є *Alternaria alternata* та *Fusarium sporotrichioides* [33]. Для стерилізації поверхні насіння зазвичай використовують розчин гіпохлориту натрію. Однак найкращий відсоток проростання досягається при стерилізації 4% розчином гіпохлориту натрію протягом 8 хвилин [78].

1.4. Біологічна, антиоксидантна та антимікробна властивості Змієголовника молдавського

Біологічна активність. Змієголовник молдавський використовується як ароматизатор харчових продуктів (рибні консерви, цукерки та сиропи), парфумерії, лікєро-горілчаній промисловості, мила та мийних засобів, паркового декору. Він також використовується в медицині у вигляді чайних сумішей/настоїв [54]. Висушене листя *D. moldavica* є перспективною функціональною добавкою для екструдованих чипсів з високою харчовою цінністю, особливо через вміст харчових волокон і розмаринової кислоти, потужний антиоксидантний потенціал і прийнятні сенсорні властивості [83]. Крім того, використання залишків *D. moldavica* як відходів жому (макухи), зібраних після пресування та доданих до кукурудзяних чипсів, може бути ефективним способом обмеження масляних відходів після пресування та підвищення стійкості управління відходами. На ринку може бути представлений новий асортимент цінних, з поживної точки зору, снєків [58].

Загальний екстракт флавоноїдів з *D. moldavica*, який погано розчиняється у воді та має низьку біодоступність при пероральному прийомі, був успішно інкапсульований у композиції фосфоліпідних ліпосом. Вони інкапсульують

загальний екстракт флавоноїдів із компонентів Змієголовника з високими значеннями ЕЕ. Згідно з фізико-хімічними властивостями та вивільненням лікарського засобу *in vitro* екстракту загальних флавоноїдів із композиційної фосфоліпідної ліпосоми *D. moldavica*, яка завдяки високій ефективності захоплення, малому розміру, добре підходящому індексу полімеї дисперсності та кінцевій композитній фосфоліпідній ліпосомі здатна потенційно сприяти вивільненню загального екстракту флавоноїдів з *D. Moldavica* [20]. Згідно з дослідженнями, ефект посилення проникнення, який спостерігається для композитних фосфоліпідних ліпосом, робить їх привабливими кандидатами, які можуть бути ефективними для покращення біодоступності загального екстракту флавоноїдів з *D. moldavica* після перорального прийому. Вони також були стабільними після 6 місяців зберігання при 4°C [87].

Антиоксидантна активність. Досліджено визначення загального вмісту фенолів та флавоноїдів у метанолі, етанолі та метанол/етанолових екстрактах листя Змієголовника молдавського, а також антиоксидантну активність. Метанольний екстракт мав найвищий вміст фенолів і флавоноїдів, антоціанів, DPPH і активність поглинання радикалів H_2O_2 . Екстракт метанолу/етанолу продемонстрував найбільшу кількість у двох оксидах, включаючи активність поглинання азотних і супероксидних радикалів; він також показав найвищу силу здатності до зменшення заліза. Етанольний екстракт показав найнижчий результат. Отримані хроматограми рослини за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії показали, що серед фенольних сполук найбільший вміст в рослині кавової кислоти, а найменший – ванілової кислоти. Результати показують, що ця рослина є відповідним природним антиоксидантом для зниження окислювального стресу у людей. Однак висока властивість до поглинання може бути пов'язана з наявністю гідроксильних груп у фенольних сполуках, які можуть поглинати вільні радикали. Ці екстракти можна використовувати як легкодоступне джерело природних антиоксидантів і можливу добавку до їжі або у фармацевтичних цілях. Їх також можна використовувати для стабілізації харчових продуктів від окисного псування [8].

Результати показали, що метанол був значно ефективнішим розчинником для вилучення антиоксидантних речовин із Змієголовника, ніж ацетон. Метанольний екстракт *D. moldavica* був ефективним як для уповільнення перекисного окислення кукурудзяної олії, так і для поглинання вільних радикалів DPPH. Ефективність ацетонового олеорезину Змієголовника, виділеного з цілої рослини, і ацетонового екстракту, виділеного з дезодорованої рослини, була значно нижчою. Їх діяльність була подібною щодо поглинання радикалів DPPH, тоді як дезодорований ацетоновий екстракт був більш ефективним у очищеній кукурудзяній олії, ніж ацетоновий олеорезин. Розмаринова кислота, вперше знайдена в Змієголовнику, була основним антиоксидантним компонентом. Також повідомлялося про наявність апігеніну, який може сприяти антиоксидантній активності рослини [87].

Дослідження антиоксидантів *in vitro* з метанольним екстрактом *D. moldavica* виявили чудовий ефект поглинання проти DPPH (EC₅₀=23,10 мкг/мл), ABTS (EC₅₀=8,0 мкг/мл) і супероксидних аніон-радикалів (EC₅₀=445,5 мкг/мл). Екстракт продемонстрував високу хелатну активність іонів двовалентного заліза (EC₅₀=35,70 мкг/мл), значну відновну здатність і хороші властивості поглинання радикалів дидроксила. Екстракт Змієголовника залежно від концентрації зменшує пошкодження ДНК, викликане блеоміцином у нормальних дермальних фібробластах людини, як виміряно кометним аналізом і мікроядерним тестом. Експозиція дермальних фібробластів екстракту *D. moldavica* (100 мкг/мл) після попередньої інкубації з блеоміцином (10 мкг/мл) призвела до найбільш значної антигенотоксичної активності. Захисний ефект може бути зумовлений активністю поглинання вільних радикалів, властивостями хелатування заліза та можливим втручанням у процеси відновлення ДНК [7].

Метанольні екстракти культури аналізували на загальний вміст фенолів за допомогою методу Фоліна-Чокальто та антиоксидантну активність за допомогою трьох тестів *in vitro*: поглинання радикалів ABTS, відновлення іонів заліза (FRAP) і перекисне окислення ліпідів (LPO). Вміст розмаринової кислоти

та антиоксидантний потенціал виявилися вищими в суспензійній культурі клітин, ніж у калюсі, отриманому з кореня. Культура клітинної суспензії також продемонструвала вищі концентрації активності поглинання радикалів RA і ABTS, ніж надземні частини шестимісячних рослин *D. moldavica*, вирощених у полі [81].

Використовуючи аналізи DPPH, ABST і BCBT для оцінки антиоксидантної активності ефірної олії Змієголовника молдавського, можна зробити висновок, що вона має чудовий потенціал для використання як природного консерванту у харчовій промисловості [28]. На антиоксидантну здатність ефірної олії *D. moldavica* значно впливає структура врожаю та джерело удобрення. Було встановлено, що значення IC50 коливаються від 1,45 до 5,28 мкг/мл [32].

Антимікробна активність. Відповідно до аналізу на дисковому дифузійному агарі та методу мікророзведення можна зробити висновок, що ефірна олія Змієголовника виявила значну антимікробну дію проти *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* і *Listeria monocytogenes* [28]. Ефірна олія *D. moldavica* демонструє високу антибактеріальну та протигрибкову активність у порівнянні з позитивним еталонним стандартом (хлорамфенікол). Значення MIC становлять приблизно 0,07 мг/мл для досліджуваних бактерій (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* і *Serratia marcescens*) і 0,08 мг/мл для досліджуваних грибів (*Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* і *Mucor hiemalis*). Існувала залежність між MIC і чіткими зонами інгібування щодо перевірених штамів бактерій. Зони пригнічення росту бактерій на біоавтограмах мали Rfs=0,1, 0,3, 0,42, 0,54 та 0,73. Ці активні компоненти ідентифікуються ГХ-МС після поділу за допомогою препаративної ТШХ як гераніол і нерол; гераніл-ацетат; цитраль; нерал; нерилацетат і метилнеролат відповідно. Таким чином, використання ефірної олії *D. moldavica* може стати потужним інструментом для боротьби з патогенними мікроорганізмами в харчовій і фармацевтичній промисловостях [29, 45].

Також повідомлялося про новий зелений підхід для синтезу наночастинок срібла (AgNP) з використанням водного екстракту насіння Змієголовника в умовах навколишнього середовища. Запропонований метод синтезу, опосередкований рослинами, є недорогим підходом, здатним виробляти AgNP при кімнатній температурі, що призводить до значного покращення виробництва AgNP завдяки його здатності контролювати наноструктури. За допомогою процесу визначення характеристик наночастинок дане дослідження продемонструвало, що AgNPs здатні надавати високі антибактеріальні результати і, отже, демонструють великий потенціал для приготування антибактеріальних препаратів. Результати підтвердили, що *D. moldavica* є екологічно чистішим і безпечнішим джерелом для синтезу AgNPs вищої якості, ніж звичайні хімічні або фізичні методи, і його корисність вимагає подальших досліджень. Синтезовані AgNP показали відмінну антимікробну активність проти *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* і *Bacillus subtilis* [60].

1.5. Актуальність та переваги мікроклонального розмноження

Змієголовника молдавського

Мікроклональне розмноження – це метод отримання генетично ідентичних проростків за допомогою культури тканин або методів культури клітин. Процес відбувається із використанням надзвичайно маленьких шматочків рослинної тканини, взятих із ретельно відібраної та підготовленої материнської рослини, та вирощування їх у лабораторних умовах для отримання нових рослин [12]. У цьому штучному процесі розмноження рослини відбувається *in vitro* шляхом безстатевого або вегетативного розмноження за високої інтенсивності освітлення, контрольованої температури та певного живильного середовища [82, 31].

Теоретично всі рослини можна мікророзмножувати, але на практиці не завжди існують визначені лабораторні протоколи (точні методи з точно визначеними хімічними та іншими умовами) для багатьох рослин. Часто

потрібні значні дослідження, щоб з'ясувати, як мікророзмножувати окремі рослини.

Актуальність мікроклонального розмноження *Dracocephalum moldavica* L. пов'язана з великим потенціалом цієї рослини в медицині, фармацевтиці та косметології. Основні причини, що роблять мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського важливим, такі:

1. Отримання біологічно активних речовин. Змієголовник молдавський містить ефірні олії, флавоноїди та антиоксиданти, які використовуються в якості лікарських засобів і харчових добавок. Культивування цієї рослини *in vitro* дозволяє підвищити концентрацію цих цінних сполук, що є критично важливим для виробництва біологічно активних сполук [3].
2. Швидке розмноження та збереження генетичної чистоти. Мікроклональне розмноження забезпечує можливість швидко створювати численні копії рослин з однаковими генетичними характеристиками. Це важливо для стабільності властивостей рослини та подальшого дослідження генетичних ресурсів [14].
3. Захист від шкідників і хвороб. Оскільки процес відбувається у стерильних умовах, мікроклональне розмноження знижує ризик зараження рослин грибками або бактеріями, що є проблемою при традиційному вирощуванні.
4. Створення нових сортів з поліпшеними властивостями. Мікроклонування відкриває можливості для генетичних маніпуляцій, що може привести до появи нових сортів з підвищеною стійкістю до стресів і вищим вмістом корисних речовин [13].

Лікарські рослини впливають на наше повсякденне існування, відіграючи життєво важливу роль у функціонуванні біохімічних процесів [9]. За останнє десятиліття ринок лікарських рослин у Європейському Союзі зазнав підвищеного інтересу до швидко вирощуваних лікарських і ароматичних рослин (ЛАР) [86]. Приблизно 80% населення світу залежить від вторинних метаболітів різних лікарських і ароматичних рослин [67]. Це пов'язано з тим,

що традиційна медицина дуже популярна і все ще широко використовується, і в цьому ЛАР відіграють центральну роль [36]. Види трав для посіву слід вибирати в першу чергу з огляду на їх можливе використання, а потім враховувати кліматичні вимоги рослин і різні особливості адаптації до певної місцевості.

Стадії мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського:

1. Відбір та підготовка експлантів

Відбір експлантів. Для розмноження використовуються різні частини рослини, такі як листові сегменти, стеблові вузли або верхівкові меристеми.

Стерилізація. Експланти ретельно стерилізуються, щоб уникнути контамінації патогенами. Це може включати обробку експлантатів у розчині гіпохлориту натрію або етанолу, а потім промивання дистильованою водою.

2. Ініціація культури

Культивування в культурі *in vitro*. Стерильні експлантати переносяться на живильне середовище, яке містить необхідні поживні речовини та регулятори росту рослин (наприклад, цитокініни та ауксини). На цьому етапі експлантати починають утворювати калюс або безпосередньо розвиваються у нові рослини.

3. Індукція калюсу та регенерація

Індукція калюсу. Експлантати стимулюються до утворення калюсу шляхом зміни концентрацій гормонів у живильному середовищі. Калюс – це недиференційована тканина, яка може регенерувати в цілі рослини.

Регенерація рослин. З калюсу формуються нові пагони та корені шляхом додаткової стимуляції гормонами росту. Після утворення достатньої кількості пагонів їх переносять на інше живильне середовище, яке сприяє утворенню коренів.

4. Проростання та розвиток

Нові рослини продовжують рости і розвиватися в умовах *in vitro*. На цьому етапі важливо забезпечити оптимальні умови для росту, включаючи освітлення, температуру та вологість.

5. Акліматизація

Після досягнення достатнього розвитку, рослини поступово адаптують до умов зовнішнього середовища. Це може включати перенесення рослин з культури *in vitro* на ґрунтові суміші під контрольованими умовами (наприклад, у теплиці). Спочатку рослини утримують у високій вологості і поступово знижують її до рівня нормального середовища.

6. Перенесення у відкритий ґрунт

Після успішної акліматизації, рослини висаджують у відкритий ґрунт або в місця постійного вирощування. На цьому етапі продовжується моніторинг і догляд за рослинами, щоб забезпечити їхнє успішне приживання та подальший розвиток.

Протягом усього процесу рослини зберігаються в контрольованому лабораторному середовищі, щоб забезпечити оптимальні умови росту та запобігти зараженню або хворобам. Проте, як і будь-який інший метод, мікроклональне розмноження має свої переваги та недоліки.

Переваги мікроклонального розмноження:

1. Це альтернативний спосіб вегетативного розмноження з підвищеною швидкістю.
2. З однієї рослинної тканини можна отримати велику кількість ідентичних рослин за дуже короткий період часу.
3. Розмноження пагонів має дуже короткий цикл, і кожен цикл призводить до логарифмічного збільшення кількості пагонів.
4. Паростки невеликого розміру можна легко зберігати та транспортувати.
5. За допомогою цієї методики запаси зародкової плазми можна зберігати протягом кількох років.
6. Це допомагає у виробництві та підтримці вільних від патогенів сортів рослин.
7. У дводомної рослини вихід насінневого потомства становить 50% чоловічого і 50% жіночого. Цей спосіб допомагає в отриманні бажаної статі рослини.
8. У культуральних флаконах можна зберігати мільйони проростків.

9. За допомогою цієї методики можна підтримувати генетичну однорідність пропагул.
10. Це економічно ефективний процес.
11. Можна розмножувати нові сорти видів.
12. Потрібна менша площа та людські ресурси.
13. Цей спосіб не залежить від пори року і може використовуватися в будь-який час.
14. Сприяє регенерації генетично модифікованих клітин після злиття протопластів.
15. Часто дає здоровіші рослини, що сприяє швидшому росту порівняно з рослинами, вирощеними звичайним методом.

Нижче наведено недоліки мікророзмноження:

1. Отримані рослини не є автотрофними.
2. Мікророзмноження не можна застосовувати на всіх культурах.
3. Рослини важко переносять акліматизацію до природного середовища.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Стерилізація, як один із основних факторів отримання асептичних рослин Змієголовника молдавського

Одним із найважливіших етапів культури тканин є отримання асептичного матеріалу. Мікробне забруднення (включаючи гриби, бактерії, віруси та дріжджі) є серйозною проблемою культури тканин, що спричиняє значну кількість втрат рослин під час мікророзмноження [16]. Таким чином, стерилізація вважається найважливішим етапом культури тканин *in vitro*, включаючи стерилізацію інструментів, обладнання та поживного середовища, а також поверхневу стерилізацію експлантатів. У культурі *in vivo* важлива стерилізація інших факторів, у тому числі ґрунту, теплиць, садів [76]. Як правило, забруднення спричиняє повільний ріст експлантатів, некроз тканин, зниження швидкості регенерації різних тканин, що призводить до руйнування культури та, зрештою, загибелі експлантатів [50].

Хімічна стерилізація у мікроклональному розмноженні є важливою частиною технологічного процесу, яка дозволяє забезпечити ефективне та чисте вирощування рослинного матеріалу для подальшого використання у фармацевтиці, косметології та агротехнологіях.

Особливо важливою хімічна стерилізація є для рослин із чутливими насінням чи живцями, які швидко втрачають схожість через зараження мікроорганізмами. Одним з ефективних методів є обробка гіпохлоритом натрію у певних концентраціях (наприклад, 4% розчин протягом 8 хвилин), що ефективно стерилізує поверхню без пошкодження самого насіння або живця. Такий підхід дозволяє не тільки знизити рівень зараження, але й підвищити швидкість і якість росту культур, що є надзвичайно важливим для забезпечення стабільного і швидкого виробництва клонів рослин з бажаними характеристиками [2].

Гіпохлорит натрію (NaOCl). Один з найбільш поширених стерилізуючих агентів. Експланти занурюють у розчин гіпохлориту натрію (0,5-2,5%) на 5-20 хвилин в залежності від типу тканини та рівня забруднення. Після цього

експланти ретельно промивають стерильною дистильованою водою кілька разів для видалення залишків хімікату.

Етанол (70%). Короткочасне занурення (10-30 секунд) у 70% етанолі часто використовується перед обробкою гіпохлоритом натрію. Це допомагає видалити поверхневі мікроорганізми. Після обробки етанолом експланти також промивають стерильною водою.

Хлоргексидин. Використовується як додатковий або альтернативний дезінфікуючий агент. Зазвичай застосовується у концентрації 0,05-0,2% на кілька хвилин. Після обробки експланти також промивають стерильною водою.

Розчини пероксиду водню (H_2O_2). Використовуються у концентраціях 3-6% на 5-15 хвилин. Пероксид водню ефективно видаляє мікроорганізми, але може бути агресивним до тканин, тому необхідно ретельно контролювати час обробки.

Спершу необхідно визначити відповідний метод поверхневої стерилізації, який залежить від рослини і виду. Такі фактори, як концентрація хімічних агентів і тривалість застосування хімічного стерилізатора, впливають на успіх поверхневої стерилізації навіть у сортах одного виду. Різні хімічні речовини, включаючи гіпохлорит натрію ($NaClO$), гіпохлорит кальцію ($Ca(ClO)_2$) та етанол (C_2H_6O), активно використовуються для стерилізації експлантатів у культурі *in vitro* [59]. Крім того, такі хімічні агенти, як хлорид ртуті ($HgCl_2$), перекис водню (H_2O_2) і нітрат срібла ($AgNO_3$), використовуються як дезінфікуючі засоби [70] (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Хімічні речовини, що використовуються для поверхневої стерилізації експлантатів

Стерилізаційний агент	Концентрація (%)	Тривалість
Бензалконію хлорид	0,01-0,1	5-20 хв
Гіпохлорит натрію	0,5-5	5-30 хв
Нітрат срібла	1	5-30 хв
Хлорид ртуті	0,1-1,0	2-10 хв

Таблиця 2.1

Хімічні речовини, що використовуються для поверхневої стерилізації експлантатів

Пероксид водню	3-12	5-15 хв
Спирт етиловий	75-95	30-60 с
Гіпохлорит кальцію	9-10	3-30 хв
Бромна вода	1-2	2- 10 хв

2.2. Живильне середовище для отримання асептичних рослин Змієголовника молдавського

Культивування мікроорганізмів на простому агаризованому середовищі або багатьох інших складних або визначених середовищах є звичайною практикою, яка існує з дуже ранніх часів. Після вивчення регенерації, диференціювання або тотипотентного потенціалу рослинних клітин техніка розмноження *in vitro* запровадила ту саму концепцію в рослинництві, яка є основою для подальших досліджень культур тканин рослин. У природі ґрунт живить рослини та забезпечує основні поживні речовини для їх подальшого росту та розвитку. Окрім вуглецю, водню та кисню, рослинам потрібна велика кількість інших елементів, які позначаються як основні елементи: азот (N), калій (K), кальцій (Ca), фосфор (P), магній (Mg) і сірка (S); з невеликими кількостями другорядних елементів: залізо (Fe), нікель (Ni), хлор (Cl), марганець (Mn), цинк (Zn), бор (B), мідь (Cu) і молібден (Mo). Відомо, що ці 17 елементів є основою для здорового та енергійного росту неушкоджених рослин, тому вони є важливою частиною більшості культуральних середовищ для рослин. Однак деякі інші, такі як кобальт (Co), алюміній (Al), натрій (Na) і йод (I), також важливі для деяких видів [12].

Таким чином, мінеральний аналіз ґрунту та рослин (елементарний склад) може дати краще уявлення про основні потреби рослин. Інакше розробка та оптимізація нових живильних середовищ стане втомливою [17].

Кожна рослина має свої вимоги. Деякі сорти рослин легко ростуть на простих середовищах (неорганічні поживні речовини, джерела вуглецю, регулятори росту та гелеутворювачі), а деякі, по суті, потребують добавки вітамінів та певних селективних речовин. Під час процесу культивування *in vitro* рослинна тканина поглинає неорганічні поживні речовини (іони) із середовищ так само, як і з ґрунту. У живильному середовищі (слабкий водний розчин) ці неорганічні солі дисоціюють і згодом поглинаються клітинами рослин у вигляді катіонів і аніонів [62].

Поглинання кожного іона, як правило, пропорційне його відповідній концентрації солі в середовищі. Але це не так, оскільки концентрація інших солей також може впливати на поглинання іонів, наприклад, за умов високих концентрацій K^+ або Ca^{2+} може виникнути дефіцит Mg , і навпаки [12]. Тому в рослинах поживні речовини або поглинаються пасивно, або через активні механізми, які, як правило, менш залежать від концентрації іонів, ніж пасивне поглинання. Таблиця 2.2 описує ролі елементів, необхідних для росту і розвитку рослин.

Зростання рослин *in vitro* також вимагає поєднання макро- та мікроелементів, як і для росту *in vivo*. Їх концентрація представлена у вигляді мілімолярних величин.

Таблиця 2.2

Деякі з елементів, важливих для живлення рослин, та їх фізіологічна функція

Елементи	Функція	Дефіцит	Вихідні солі
Нітроген	Компонент білків, нуклеїнових кислот і деяких коферментів. Цей елемент потрібен в найбільшій кількості	Пригнічення синтезу білка	KNO_3 , NH_4NO_3 , $Ca(NO_3)_2$
Калій	Регулює осмотичний потенціал, основний неорганічний катіон	Інактивація ферментів і дисбаланс осмотичного тиску	KNO_3

Таблиця 2.2

Деякі з елементів, важливих для живлення рослин, та їх фізіологічна функція

Кальцій	Синтез клітинної стінки, функція мембрани, клітинна сигналізація	Некроз оболонки та верхівки пагона	CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Магній	Ферментний кофактор, компонент хлорофілу	Порушується ферментативна реакція та синтез АТФ	MgSO_4
Фосфор	Компонент нуклеїнових кислот, перенесення енергії, компонент проміжних продуктів дихання та фотосинтезу	Затримка росту і темно-зелене забарвлення листя	KH_2PO_4
Сульфур	Компонент деяких амінокислот (метіонін, цистеїн) і деяких кофакторів	Пригнічує синтез білка та знижує вміст хлорофілу в листі	MgSO_4 , K_2SO_4
Хлор	Необхідний для фотосинтезу	Зниження фотосинтезу	COCl_2
Ферум	Перенесення електронів як компонент цитохромів	Негативний вплив на ріст і розвиток	$\text{Na}_2\text{Fe EDTA}$
Манган	Ферментний кофактор	Різні ферментативні дії будуть порушені	MnSO_4
Кобальт	Компонент деяких вітамінів	Знижується синтез вітамінів	COCl_2
Купрум	Ферментний кофактор, реакції переносу електронів	Зниження фотосинтезу	Cu_2SO_4
Цинк	Ферментний кофактор, біосинтез хлорофілу	Зниження синтезу триптофану	ZnSO_4
Молібден	Фермент кофактор, компонент нітратредуктази (бере участь при перетворенні нітрату в амоній)	Інгібування перетворення нітратів в амоній	Na_2MoO_4

Макронутрієнти потрібні в концентрації понад 0,5 мк/л. До них відносяться солі азоту, калію, фосфору, кальцію, магнію, сірки. Усі вони відіграють різні ролі в розвитку, наприклад, синтез білка (N, S), синтез нуклеотидів (S, N, P), цілісність мембрани (Mg), синтез клітинної стінки (Ca) і кофактор ферменту (Mg). Азот поповнюється в органічній (амінокислоти, гідролізат казеїну та інші органічні кислоти) і неорганічній формі [26]. Неорганічний азот зазвичай поставляється у формі іонів амонію (NH_4^+) і нітрату (NO_3^-). Нітрат перевершує амоній як єдине джерело азоту, але використання NH_4^+ стримує підвищення рН середовища у бік лужності [12]. Кількість нітратів та сульфатів повинна бути зменшена, перш ніж вони зможуть брати участь у синтезі амінокислот, білка та ферментів. Культуральне середовище має містити 25 мк/л азоту та калію. Інші основні елементи достатні в діапазоні концентрацій 1-3 мк/л.

Мікроелементи потрібні в концентрації менше 0,05 мк/л. До них відносяться залізо, марганець, цинк, бор, мідь і молібден. Хоча ці неорганічні елементи використовуються в невеликих кількостях, вони необхідні для гарного росту рослин, найбільш критичним з них є залізо, яке недоступне при низькому рН. Вільного заліза в рослинах дуже мало. Залізо в основному зв'язується з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA), яка сприяє доступності заліза в культурі. Тому він представлений у вигляді комплексу заліза EDTA, щоб зробити його доступним у широкому діапазоні рН [12].

Джерело вуглецю. Під час росту культури рослинної тканини сахароза діє як джерело палива для підтримки фотоміксотрофного метаболізму (організми можуть використовувати різні джерела енергії та вуглецю), забезпечуючи оптимальний розвиток, хоча нещодавно було виділено інші важливі ролі, такі як попередник вуглецю або сигнальний метаболіт. Сахароза є дуже важливою частиною живильного середовища як джерело енергії, оскільки більшість рослинних культур не здатні ефективно фотосинтезувати внаслідок слабкого розвитку клітин і тканин, нестачі хлорофілу, недостатнього газообміну та

вуглекислого газу в судинах культури тканин тощо [74]. Рослинам не вистачає ауксотрофної здатності, і для отримання енергії їм потрібен зовнішній вуглець.

Вітаміни - це органічні речовини, необхідні для метаболічних процесів як кофактори або частини ферментів. Тому для оптимального росту середовище слід доповнювати вітамінами. Тіамін (B1), нікотинова кислота (B3), піридоксин (B6), пантотенова кислота (B5) і міоїнозитол є широко використовуваними вітамінами, з яких тіамін (0,1-5 мг/л) переважно додається до середовища, оскільки він бере участь у метаболізмі вуглеводів [6]. Чотири вітаміни (міоїнозитол, тіамін, нікотинова кислота та піридоксин) є інгредієнтами середовища MS. Вони використовують в різних співвідношеннях для культивування тканин, і їх потреба може змінюватися залежно від природи рослини та типу культури. Різні ролі вітамінів у рості та розвитку рослинних клітин наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Роль вітамінів у рості та розвитку рослинної клітини

Назва	Роль вітамінів у розвитку рослинної клітини
Міоїнозитол	<ul style="list-style-type: none"> • Це рослинний вітамін, але його іноді відносять до додаткових вуглеводів, оскільки він не виконує таких дій, як вуглевод (джерело енергії або як осмотик). Наявність шести гідроксильних груп робить його більш реактивним проти різних кислот з утворенням складних ефірів; • Вплив міоїнозиту вперше був показаний Жакіо при формуванні бутонів [42]. • Поллард та ін. повідомили, що властивість кокосового молока стимулювати ріст пояснюється вмістом міоїнозиту. Він також встановив, що воно містить додатковий вітамін під назвою сцилоїнозит [63]; • У середовищі, доповненому інозитолом, він може сприяти росту тканин [79]. • Він діє, беручи участь у біосинтетичних шляхах для утворення пектину, а геміцелюлоза в основному необхідна для клітинних стінок і, отже, сприяє росту [49]; • Відіграє важливу роль у поглинанні та утилізації іонів [84]. Він має здатність сприяти поділу клітин

	самостійно, а іноді і з іншими гормонами [52].
Тіамін	<ul style="list-style-type: none"> • Це один з найбільш часто використовуваних вітамінів, які доповнюють середовища у вигляді пірофосфату тіаміну; • Він є важливим кофактором вуглеводного обміну і бере безпосередню участь у біосинтезі деяких амінокислот; • Середовище MS містить низьку концентрацію 0,3 мк/л тіаміну. Ця концентрація може бути недостатньою для отримання бажаних результатів [10]; • Можлива взаємодія між регуляторами росту тіаміну та цитокініну, що може вплинути на ріст рослини; • Частіше його доповнення (пост-, пре- або під час різних стадій розвитку) остаточно визначає його дію проти росту рослинної клітини [41].
Вітамін С	<ul style="list-style-type: none"> • Вітамін використовується під час ізоляції експлантату та для запобігання почорнінню; • Потужний антиоксидант; • Індукує поділ і подовження клітин [44]; • Посилює утворення пагонів і скасовує інгібування утворення пагонів гібереліновою кислотою в молодому калюсі (менш ефективний у старому калюсі).
Вітамін Е	<ul style="list-style-type: none"> • α-Токоферол має сильний антиоксидантний потенціал і відіграє життєво важливу роль у рості та розвитку клітин рослин.
Аденін	<ul style="list-style-type: none"> • Аденіну сульфат широко використовується в культуральних середовищах тканин, але його ефекти досить подібні до ефектів цитокінінів, що перешкоджає його використанню.
Рибофлавін	<ul style="list-style-type: none"> • Пригнічує утворення калюсу, але може покращити ріст і якість пагонів [26].
Пантотенова кислота	<ul style="list-style-type: none"> • Було помічено різкі зміни її потенціалу впливу на ріст рослин. У деяких рослин вона демонструє ріст, тоді як у інших не викликає жодного ефекту.

Регулятори росту рослин стимулюють поділ клітин і, отже, регулюють ріст і диференціацію пагонів і коренів на експлантатах і ембріонах у напівтвердих або рідких середовищах. Додавання РРР в різні культури призводить до експресії різних генів (факторів транскрипції), які додатково регулюють різні фази розвитку (регенерація пагонів, коренів або калюсів з корневих експлантатів) у рослин (Таблиця 2.4).

Чотири основні РРР, що використовуються, це ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизова кислота, і їх додавання є важливим для культурального середовища. До них відноситься і етилен.

Ауксини індукують поділ та подовження клітин, апікальне домінування, утворення адвентивного кореня та соматичний ембріогенез. Фрітс Вент відкрив ауксин більше 70 років тому [80]. При застосуванні в низьких концентраціях ауксини викликають укорінення, а у високій концентрації діють як селективний гербіцид/знищувач бур'янів, а в деяких випадках також може виникнути калюс. Зазвичай використовуються синтетичні ауксини: нафталін оцтова кислота (NAA), 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-D), індол-3-оцтова кислота (IAA), індол-3-масляна кислота (IBA) тощо. І IBA, і IAA є світлочутливими, тому вихідні розчини слід зберігати в темряві. 2,4-D використовується для індукування та регулювання соматичного ембріогенезу, а також для калюсоутворення [72]. Також 2-метокси-3,6-дихлорбензойна кислота (Dicamba), 2,4,5-трихлорфеноксіоцтова кислота (2,4,5-T), 2-метил-4-хлорфеноксіоцтова кислота (MCPA), 2-нафтилоксиоцтова кислота (NOA) і 4-аміно-2,5,6-трихлорпіколінова кислота (Piclogam) використовують як ауксини. Ауксини легко розчиняються або в абсолютному спирті, або в етанолі, а також у розбавленому NaOH або KOH [48]. Як природні, так і синтетичні ауксини термостабільні.

Цитокініни є похідними аденіну, сприяють поділу клітин і стимулюють початок і ріст пагонів *in vitro*. Це 4-гідрокси-3-метил-транс-2-бутеніламінопурин (зеатин), 6-фурфуриламинопурин (кінетин), 6-бензиламинопурин (BAP), N⁶-(2-ізопентеніл) аденін (2iP(IPA)) та 1-феніл-3-(1,2,3-тіадіазол-5-іл) сечовина (тідіазурон), часто використовувані цитокініни. Вони змінюють верхівкове домінування, сприяючи формуванню пазушних пагонів [38]. Вища концентрація цитокініну спричиняє пригнічення коренеутворення та сприяє формуванню додаткових пагонів. Співвідношення ауксин/цитокінін відіграє важливу роль у морфогенезі. Високий коефіцієнт призводить до ембріогенезу та зародження кореня, тоді як низький коефіцієнт

призводить до проліферації пазушної бруньки та пагона, хоча для утворення калюсу необхідний проміжний коефіцієнт. Цитокиніни поділяються на два основні класи: природні (транс-зеатин, цис-зеатин, іР, дигідрозеатин і зеатинрібозид) і синтетичні цитокиніни [48]. Органічні добавки, такі як дріжджовий екстракт або кокосове молоко, є багатим джерелом природного цитокиніну. Кінетин не визнається природним цитокиніном, оскільки він присутній у природі шляхом структурної перебудови, тому було ідентифіковано багато природних цитокинінів, які структурно пов'язані з кінетином [38, 30]. Синтетичні цитокиніни знову поділяються на два класи: пурини (N⁶-заміщені похідні аденіну та деякі інші менш структурно споріднені сполуки, такі як 4-алкіламіноптеридини та 6-бензилоксипурини) та аналоги фенілсечовини (1,3-дифенілсечовина та тидіазурон). Деякі з цих аналогів пурину є більш активними, ніж кінетин або бензиладенін (ВА), і особливо ефективні у сприянні морфогенезу [12].

Гібереліни – це численні природні структурно споріднені сполуки, які зазвичай використовуються для регенерації рослин. Лише кілька гіберелінів використовуються в культуральних середовищах рослинних тканин. Водорозчинна і термонестабільна гіберелова кислота (GA₃) в основному використовується для подовження міжвузлів і росту меристеми, і зазвичай пригнічує утворення додаткових пагонів [22]. Їх інгібіторна дія виявляється в процесі органогенезу та дедиференціації тканин.

Абсцизову кислоту (АБК) використовують лише для соматичного ембріогенезу та для культивування деревних порід. Вона пригнічує поділ клітин і сприятливо впливає на опадання. АБК розчинна у воді і термостабільна за своєю природою, але чутливість до світла часто обмежує її застосування.

Етилен – це природний РРР, який зустрічається в газоподібному стані та найчастіше пов'язаний із контролем дозрівання плодів у клімактеричних плодах. Його виробництво в деяких культурах клітин рослин часто пригнічує ріст і розвиток культури. Для його утилізації в газоподібному стані в

середовище додають порошок 2-хлоретану фосфорної кислоти для виділення етилену.

Таблиця 2.4

Список гормонів росту рослин та їх функції

РРР	Назва продукту	Функція в культурі тканин рослин
Ауксини	Індол-3-оцтова кислота Індол-3-масляна кислота Індол-3-масляна кислота, калієва сіль α -Нафталіноцтова кислота 2,4-Дихлорфеноксіоцтова кислота р-хлорфеноксіоцтова кислота <ul style="list-style-type: none"> • Picloram • Dicamba 	<ul style="list-style-type: none"> • Формування придаткових коренів (висока концентрація); • Формування придаткових пагонів (низька концентрація) ; • Індукція соматичних ембріонів; • Поділ клітини; • Формування і зростання калюсу; • Пригнічення пазушних бруньок; • Гальмування подовження коренів.
Цитокініни	6-Бензиламінопурин 6- γ , γ -диметилаліламінопурин (2iP) Кінетин Тідіазурон (TDZ) N-(2-хлор-4-піридил)-N`фенілсечовина <ul style="list-style-type: none"> • Зеатин • Зеатин рибозид 	<ul style="list-style-type: none"> • Формування придаткового пагона; • Гальмування коренеутворення; • Поділ клітин; • Модулює утворення та ріст калюсу; • Стимуляція розпускання і росту пазушних бруньок; • Пригнічення розтягування пагонів; • Пригнічення старіння листя.
ГК	<ul style="list-style-type: none"> • Гіберелова кислота 	<ul style="list-style-type: none"> • Стимуляція розтягування пагонів; • Звільнення насіння, зародків, верхівкових бруньок зі стану спокою; • Пригнічення утворення придаткових коренів; • Паклобутразол і анцимідол пригнічують синтез гібереліну, що призводить до коротших пагонів і сприяє формуванню бульб, бульбоцибулин і цибулин.
АБК	<ul style="list-style-type: none"> • Абсцизова кислота 	<ul style="list-style-type: none"> • Стимуляція утворення цибулин і

		бульб; • Стимуляція дозрівання ембріонів; • Сприяння початку періоду спокою.
Поліаміни	• Путресцин • Спермідин • Спермін	• Сприяння утворенню придаткових коренів; • Сприяння соматичному ембріогенезу; • Сприяння формуванню пагонів.
Етилен	• Етилен	• Зниження процесу старіння; • Утворення придаткових коренів і кореневих волосків;
Етилен	• Етилен	• Порушення спокою насіння та бруньок у деяких видів; • Стимулювання або пригнічення довільної регенерації.
ЖК	• Жасмонова кислота	• Сприяння утворенню бульб і цибулин; • Посилення формування меристеми (диференціювання тканин); • Стимуляція коренеутворення; • Стимуляція утворення пігменту; • Стимуляція диференціювання тканин.
СК	• Саліцилова кислота	• Пригнічення проростання насіння; • Індукція цвітіння; • Сприяння утворенню бутонів; • Блокування реакції на пошкодження.
БС	• Брасиностероїди	• Стимулювання проростання; • Пригнічення росту і розвитку коренів; • Сприяння видовженню пагонів; • Пригнічення росту і розвитку коренів; • Посилення диференціювання ксилеми.

Оптимальний рН для культурального середовища становить 5,6–5,8 перед стерилізацією. Значення рН нижче 4,5 або вище 7,0 сильно пригнічують ріст і розвиток тканин *in vitro*. Рівень рН культурального середовища зазвичай падає на 0,3–0,5 одиниці після автоклавування та продовжує змінюватися під час інкубації культури внаслідок окислення, а також диференціального поглинання та секреції речовин культивованою тканиною [18]. Якщо рН помітно падає під час культивування рослинної тканини (рН нижче 5,0 не дозволяє агару гелеутворюватися і середовище стає рідким), то слід приготувати свіже середовище, тоді як рН більше 6,0 дає жорстке середовище (перешкоджає поглинанню поживних речовин). Встановлено, що рН середовища впливає на ефективність згущення агару, поглинання інгредієнтів, розчинність різних солей і проходження хімічних реакцій (особливо ті, що каталізуються ферментами) у середовищі [34].

2.3. Високоєфективна рідинна хроматографія як метод кількісного визначення вмісту БАР в рослині.

Хроматографія – найпоширеніший і досконалий метод розділення сумішей речовин, всіх типів ізомерних сполук, макромолекул (синтетичних полімерів і біополімерів), іонів, стійких вільних радикалів, комплексів та асоціатів.

Розділення компонентів суміші на хроматографічній колонці зумовлене їх різним утримуванням у нерухомій фазі. Якщо як нерухому фазу взяти подрібнений сорбент – речовину, яка поглинає компоненти суміші, і наповнити ним скляну чи металічну трубку, а просування рухомої фази (рідини чи газу) здійснювати за рахунок різниці тиску на кінцях цієї трубки, то ця трубка буде представляти собою хроматографічну колонку [56].

Нерухома фаза – це твердий адсорбент із розвиненою поверхнею або плівка рідини, адсорбційно закріплена на твердому носії; рухома фаза – потік газу або рідини, який проходить (фільтрується) крізь шар сорбенту.

Функція нерухомої фази – сорбувати, утримувати речовини, функція рухомої фази – розчиняти в собі речовини і переміщувати їх. Неоднаковий

розподіл компонентів суміші між фазами створює умови, необхідні для їх розділення та подальшого визначення [77].

Суміш для розділення разом з потоком рухомої фази потрапляє в хроматографічну колонку. При контакті з поверхнею нерухомої фази кожен із компонентів розподіляється між нерухомою і рухомою фазами в залежності від своїх властивостей, наприклад, здатності до адсорбції. Через неперервність просування рухомої фази лише частина компонента вступає у взаємодію з нерухомою фазою, інша ж частина рухається далі і вступає у взаємодію вже з іншою ділянкою поверхні нерухомої фази. Поглинені поверхнею нерухомої фази компоненти суміші не просуватимуться далі з рухомою фазою доти, поки не десорбуються. Тому кожному з них для проходження всієї довжини колонки необхідно більше часу, ніж для молекул рухомої фази [75]. Середня швидкість просування молекул різних компонентів суміші вздовж колонки різна, і ця різниця при достатній довжині колонки може привести до повного розділення суміші на складові компоненти.

Отже, розділення речовин при промиванні колонки рухомою фазою відбувається внаслідок неоднакової швидкості їх руху вздовж шару твердого чи рідкого сорбенту. Неоднакова швидкість руху окремих речовин зумовлена різними величинами їхніх коефіцієнтів розподілу. Специфічність процесу хроматографічного розділення суміші полягає в багаторазовому повторенні актів сорбції і десорбції, розчинення і виділення компонентів рухомої фази при її русі вздовж нерухомої.

У подальшому для розділення сумішей стали використовувати також відмінності в іоннообмінних властивостях, в розчинності осадів, різницю в міграційних властивостях компонентів [1].

Суть хроматографічного методу можна сформулювати так: хроматографія – це метод розділення та аналізу рідких або газуватих сумішей речовин, який ґрунтується на відмінності розподілу компонентів між двома фазами, що не змішуються і рухаються одна відносно одної.

За допомогою хроматографічного методу можна провести:

- якісний і кількісний аналіз досліджуваної речовини;
- концентрування речовин з дуже розбавлених розчинів;
- розділення складних сумішей органічних і неорганічних речовин на окремі компоненти;
- розділення і виділення рослинних і тваринних пігментів, ізотопів, рідкоземельних елементів та інших речовин; – очищення речовин від домішок;
- визначення молекулярної структури деяких сполук шляхом встановлення зв'язку між здатністю до сорбції і будовою даної речовини.

Існує багато варіантів здійснення хроматографічного аналізу, які класифікуються за такими основними характеристиками.

За агрегатним станом нерухомої та рухомої фаз: сорбент (нерухома фаза) може бути твердою речовиною або рідиною, що сорбована на твердому носії; рухома фаза може бути рідиною або газом; сорбати можуть перебувати у рідкому, газуватому або пароподібному стані [21] (Таблиця 2.7)

Таблиця 2.7

Види хроматографії за агрегатним станом нерухомої та рухомої фаз

Рухома фаза	Нерухома фаза	Назва хроматографії
Газ	Тверда	Газоадсорбційна
Газ	Рідка (рідина розподілена тонким шаром по поверхні твердого носія)	Газоабсорбційна, газорідиннорозподільна
Рідина	Тверда	Рідинна адсорбційна
рідина	Рідка	Рідинно-розподільна

За апаратним оформленням або способом проведення хроматографічного процесу: колонкова (в колонці або капілярі) і площинна (на папері або в тонкому шарі сорбенту) хроматографія.

За природою сил міжфазової взаємодії сорбенту та сорбованих речовин (сорбатів), що зумовлює розподіл молекул або іонів між фазами, хроматографію поділяють на два основні види – молекулярну та іонообмінну [61].

За методикою проведення аналізу:

- Проявна (елюентна) хроматографія – в безперервний потік рухомої фази, яка практично не сорбується (елюента), вноситься порція об'єкту аналізу.
- Фронтальна – крізь колонку безперервно пропускають об'єкт аналізу, який сам є рухомою фазою, і вимірюють концентрацію кожного компонента на виході з колонки.
- Витіснювальна – в нерухому фазу вноситься порція об'єкту аналізу. Ця порція витискається через шар нерухомої фази потоком речовини-витіснювача, який сорбується сильніше, ніж компоненти об'єкту аналізу.

Залежно від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють аналітичну і препаративну хроматографію.

- Аналітичну хроматографію використовують для визначення якісного та кількісного складу зразка.
- Препаративна хроматографія – це процес виділення речовин із суміші у чистому вигляді в лабораторних умовах або у виробничих процесах з метою їх подальшого використання.

За ефективністю хроматографічного розділення, розрізняють класичну та високоефективну (під тиском) хроматографію. У випадку класичної хроматографії пробу вводять у колонку вручну, далі пропускають рухому фазу, яка проходить крізь сорбент під дією сили тяжіння та капілярних сил [73].

У разі високоефективної хроматографії колонку малого внутрішнього діаметру заповнюють дрібнодисперсним сорбентом щільно, так що рухома фаза не може рухатись вздовж колонки за атмосферного тиску. Тому для протікання як проби, так і рухомої фази потрібно прикласти тиск, тобто підключити насос.

Прилади ВЕРХ (Рис. 2.1):

Рухома фаза. Рухома фаза служить для транспортування зразка до системи. Основними критеріями рухомої фази є інертність до компонентів зразка. Зазвичай використовуються чисті розчинники або буферні комбінації. Рухома фаза повинна бути вільна від твердих домішок і дегазована перед використанням.

Резервуари рухомої фази. Це інертні контейнери для зберігання та транспортування рухомої фази. Зазвичай використовуються прозорі скляні пляшки, щоб полегшити візуальний контроль рівня рухомої фази всередині контейнера. Фільтри з нержавіючої сталі встановлені всередині для видалення твердих домішок у рухомій фазі, якщо такі є.

Насоси. Варіації швидкості потоку рухомої фази впливають на час елюції компонентів зразка та призводять до помилок. Насоси забезпечують постійний потік рухомої фази в колонку під постійним тиском.

Інжектор. Інжектор використовується для забезпечення постійного об'ємного введення зразка в потік рухомої фази. Для підтримки високого рівня точності необхідні інертність і відтворюваність впорскування.

Хроматографічна колонка. Колонки мають форму довгого циліндру, корпус якого виготовляють з нержавіючої сталі, скла або полімеру. Набивають колонку силікагелем, суспендованим у воді, ізопропанолі або іншому полярному розчиннику під тиском понад 200 бар [77].

Детектор. Детектор дає специфічну реакцію для компонентів, розділених колонкою, а також забезпечує необхідну чутливість. Він повинен бути незалежним від будь-яких змін у складі рухомої фази. На сьогодні запропоновано понад 20 типів детекторів. Їх можна поділити на такі групи: спектрофотометричні (УФ-видимий детектор (УФВ) з матрицею діодів, флуориметричний (ФД), рефрактометричний (РД), атомно-абсорбційний (ААД), електрохімічні (полярографічний (ПД), кондуктометричний (КД), детектор електропровідності (ДЕ)), іонізаційні (транспортний полуменевоіонізаційний (ТПІД), мас-селективний (МС)). Найчутливішим

детектором, за допомогою якого можна проводити ідентифікацію невідомої речовини, є маселктивний [1].



Рис. 2.1. Система аналітичної вискоефективної хроматографії

Схема проведення ВЕРХ:

1. Підготовка системи

- Налаштування обладнання, перевірка системи;
- Вибір нерухомої фази. Вибір нерухомої фази залежить від природи зразків та характеристик взаємодії з аналітами;
- Вибір рухомої фази. Рухома фаза (елюент) може бути органічним розчинником або водним розчином з додаванням органічних розчинників для оптимального розділення аналітів.

2. Введення зразка

- Зразок вводиться в систему ВЕРХ за допомогою автосамплера в рухому фазу.

3. Розділення

- Необхідною умовою хроматографічного розділення речовин є відмінність їх сорбційних властивостей, яка при постійності умов хроматографування приводить до відмінності параметрів утримування компонентів. Роздільна здатність хроматографічної колонки залежить від селективності та ефективності колонки.

4. Детекція

- Детектор реагує на зміну хімічного складу розчину, який виходить із колонки, і передає відповідний сигнал на реєструвальний прилад.

5. Аналіз даних

- Отримані дані обробляються за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення для побудови хроматограм, визначення пікових площ та інтеграції піків.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Мікроклональне розмноження Змієголовника молдавського

Як експлантат, для мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського було обрано насіння.

Насіння стерилізували 70 % розчином етанолу протягом 1 хв, потім поміщали в 25 % розчин білизни на 10 хв. Після цього насіння промивали стерильною дистильованою водою 3 рази по 10 хв для видалення NaClO.

Експлантати культивували на середовищі $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog (MS) що включає: агар – 6,8 г; сахароза – 15 г/л; інозитол – 0,05 г/л; Fe-хелат – 2,5 мл/л; вітаміни MS – 0,5 мл/л; мікро солі MS – 0,5 мл/л; CaCl₂ · 2H₂O – 50 мл/л; макро солі MS – 50 мл/л. Рівень рН культурального середовища становив 5,7, середовище автоклаували при 121°C протягом 20 хв.

Умови культуральної кімнати для вирощування становили 16 годин світла при 25°C і 8 годин темряви при 23°C, тобто зберігаються всі умови які необхідні для оптимального розвитку асептичних рослин.

Протягом 30 діб розвитку можна було спостерігати такі етапи:

1-5 доба:

Проростання насіння (Рис. 3.1). Після початкового етапу набухання насіння протягом 24-48 годин відбувалося проростання перших корінців. Корінець розвивався поступово, формуючи первинну кореневу систему.

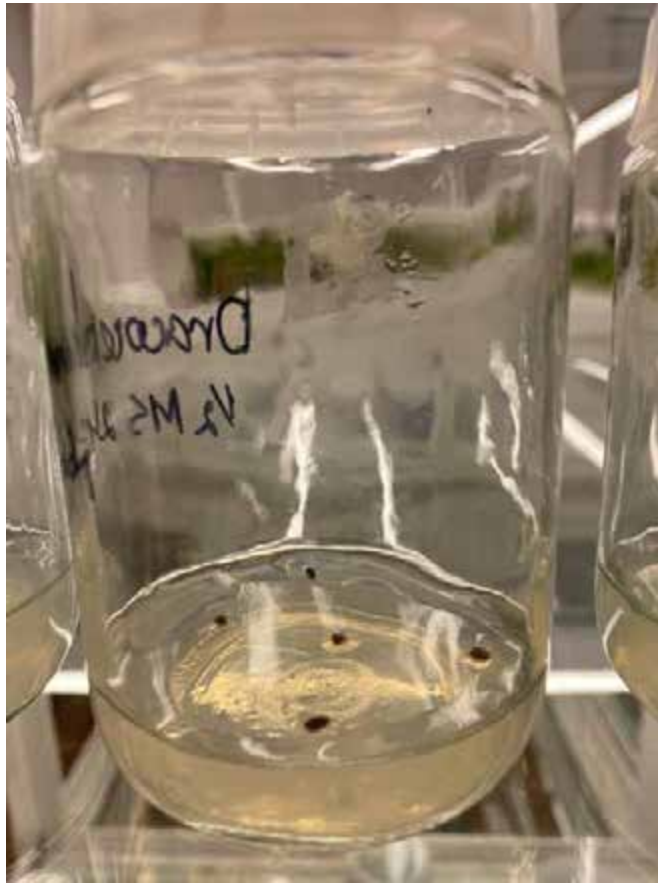


Рис. 3.1. Проростання насіння

6-10 доба:

Формування сім'ядоль (Рис. 3.2). На 6-8 добу після проростання можна було помітити повністю розгорнуті сім'ядолі, які виконували перші фотосинтетичні функції. Продовжував розвиватися первинний корінь і формуватися перші кореневі волоски.

Поява перших справжніх листків. До кінця 10-ї доби спостерігалася поява перших справжніх листків, які мали типову ланцетну форму для *Dracoscephalum moldavica* L.

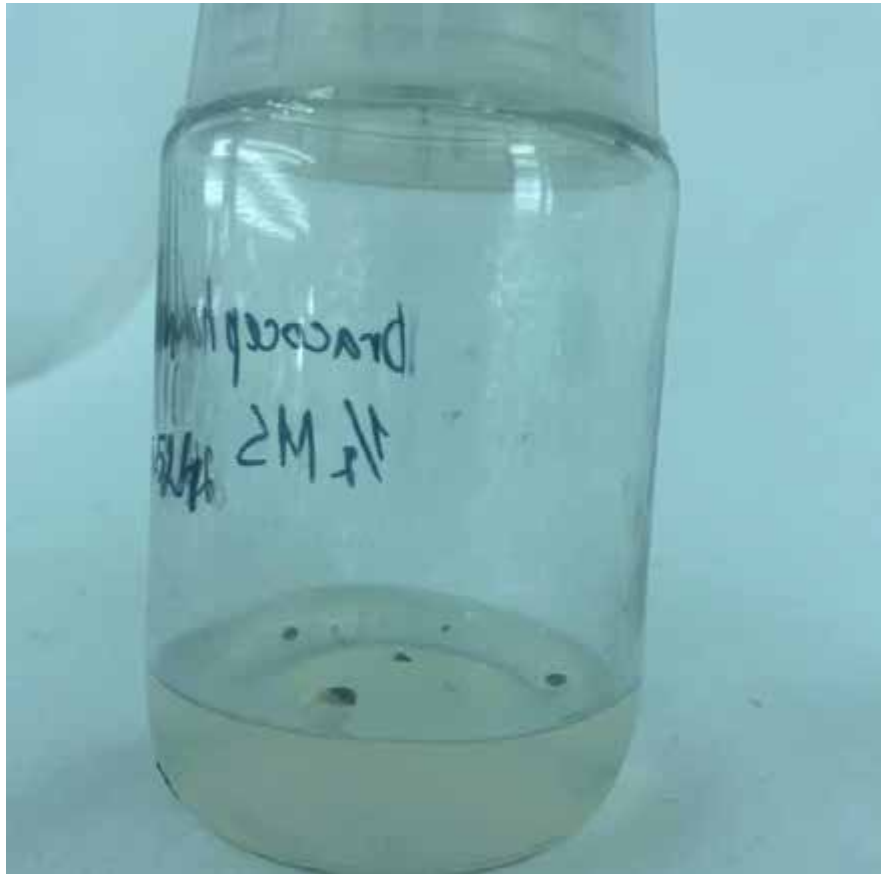


Рис. 3.2. Формування сім'ядоль

11-20 доба:

Активне листкове розростання (Рис. 3.3). Протягом цього періоду відбувалося активне зростання рослини. Перші справжні листки збільшувалися в розмірах, з'являлися нові пари листків. Листя набуло насиченого зеленого кольору, що свідчило про активну фотосинтетичну діяльність.



Рис. 3.3. Активне листкове розростання

Розвиток кореневої системи (Рис. 3.4). Коренева система розвивалася значно швидше, формуючи густу мережу вторинних коренів. До 20-ї доби коріння вже глибоко проникло у живильне середовище і займало значну площу.



Рис. 3.4. Розвиток кореневої системи

21-30 доба:

Подальше зростання (Рис. 3.5). Рослини активно розвивали нові пагони і листки. На 25-30 добу кожна рослина мала 3-4 пари справжніх листків, які повністю сформувалися і досягли функціональної зрілості.



Рис. 3.5. Подальше зростання

Зміцнення кореневої системи (Рис. 3.6). Вторинні корені продовжували розвиватися, формуючи щільну кореневу мережу, що забезпечувала достатнє живлення рослин.



Рис. 3.6. Зміцнення кореневої системи

На живильному середовищі 1/2 MS протягом 30 діб насіння *Dracosephalum moldavica* L. успішно проросло та пройшло всі основні етапи раннього розвитку. Рослини мали добре розвинену кореневу систему, міцне стебло і декілька пар справжніх листків, що свідчить про сприятливі умови середовища для росту та розвитку.

3.2. Дослідження вмісту БАР методом аналітичної високоефективної хроматографії.

Першим етапом дослідження була екстракція біологічно активних речовин зі Змієголовника молдавського (*Dracosephalum moldavica* L.) з використанням етанолу як розчинника (у співвідношенні 1:3).

1. Отриманий рослинний матеріал подрібнюється до однорідного розміру для підвищення ефективності екстракції, що дозволить максимізувати контакт з розчинником.
2. Екстракт готується у співвідношенні 1:3, де 10 г подрібненого рослинного матеріалу та 30 мл 70%-го розчину етанолу. Така

концентрація ефективно виділяє різні типи біологічно активних речовин, включаючи фенольні сполуки, флавоноїди та ефірні олії (Рис. 3.7).



Рис. 3.7. Суміш рослинного матеріалу *Dracoscephalum moldavica* L. з етанолом

3. Отримана суміш ретельно перемішується для рівномірного контакту етанолу з усією поверхнею рослинного матеріалу.
4. Для оптимальної екстракції суміш залишають на 48 годин при кімнатній температурі в темному місці для уникнення впливу світла на біологічно активні сполуки. В цей час етанол витягує компоненти з клітин рослини.
5. Після завершення екстракції суміш пропускають через фільтр *дані*, відділяючи тверді залишки від рідкого екстракту.
6. Отриманий екстракт розлили у віали ємністю 1500 мкл (Рис 3.9).

Додатково була проведена екстракція коренів *Dracoscephalum moldavica* L. для дослідження вмісту БАР. Екстракт готували за схемою описаною вище зі співвідношенням 1:5, де коріння 1,4 г та 7 мл 70%-го розчину етанолу (Рис. 3.8).



Рис. 3.8. Суміш коріння *Dracoscephalum moldavica* L. з етанолом



Рис. 3.9. Екстракти з рослинного матеріалу та коріння *Dracoscephalum moldavica* L.

Другим етапом було проведення хроматографічного розділення готових екстрактів. Дослідження проводилося на базі ТОВ «НВП «Єнамін» у відділі високоефективної аналітичної хроматографії.

Аналіз ВЕРХ *D. moldavica* проводили на приладі HPLC серії Agilent Technologies 1260 (Agilent Technologies, Каліфорнія, США), оснащеному градієнтним насосом, автоматичним пробовідбірником, колонкою та УФ-детектором. Зразки розділяли на колонці Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) у режимі градієнтного елюювання з рухомою фазою, що містить ацетонітрил (А) і 0,05% мурашиної кислоти (що містить 20 мМоль/л ацетату

амонію) (В) зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Об'єм введеного зразка становив 10 мкл.

Програма градієнтного елюювання для *D. moldavica* була така: 0–20 хв, 12–16% (А); 20–30 хв, 16–28% (А); 30–40 хв, 28% (А); 40–45 хв, 28–56% (А); 45–55 хв, 56–58% (А). Аналіти були виявлені на довжині хвилі 330 нм. Дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies 2.0 ChemStation (Рис. 3.10).

Для якісного аналізу було використано мас-спектрометр Agilent G6125B MS (Agilent Technologies, Каліфорнія, США) з діодним детектором та способом іонізації електростатичне розпилення. Дані збирали як у режимі негативної, так і в позитивній іонізації з мас-спектром повного сканування в діапазоні від 100 до 1700 m/z . Типові параметри джерела були такими: швидкість потоку сухого газу (N_2) 8,0 л/хв, температура сухого газу 325°C, тиск розпилювача 40 psi, напруга капіляра 3500 В, напруга фрагментатора 120 В, скімер 65 В. Енергія зіткнення зразка була встановлена на рівні 35 В. Перевірку та аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Agilent Mass Hunter Acquisition Software Ver.A.01.00 (Agilent Technologies, Каліфорнія, США).

Для кожної сполуки, що імовірно може входити до складу екстракту, були виписані значення маси до заряду (m/z) на основі попередніх досліджень і наукових публікацій, де досліджувалися хімічний склад і характеристики Змієголовника молдавського (Табл. 3.1). Зокрема, ці значення m/z були використані для налаштування мас-спектрометра і подальшого аналізу хроматограм (Рис. 3.11).

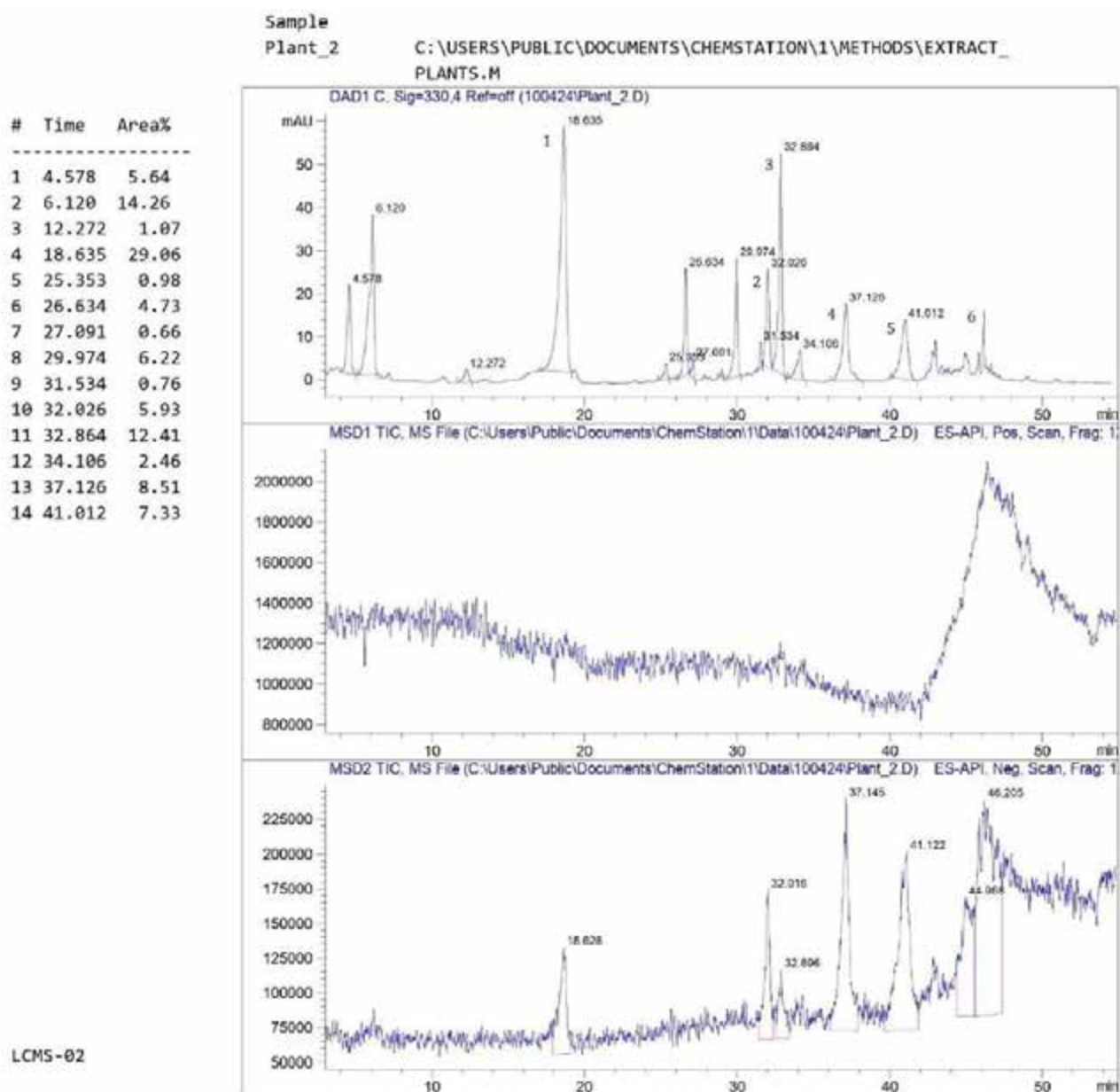


Рис. 3.10. Хроматограма рослинного екстракту Змієголовника молдавського

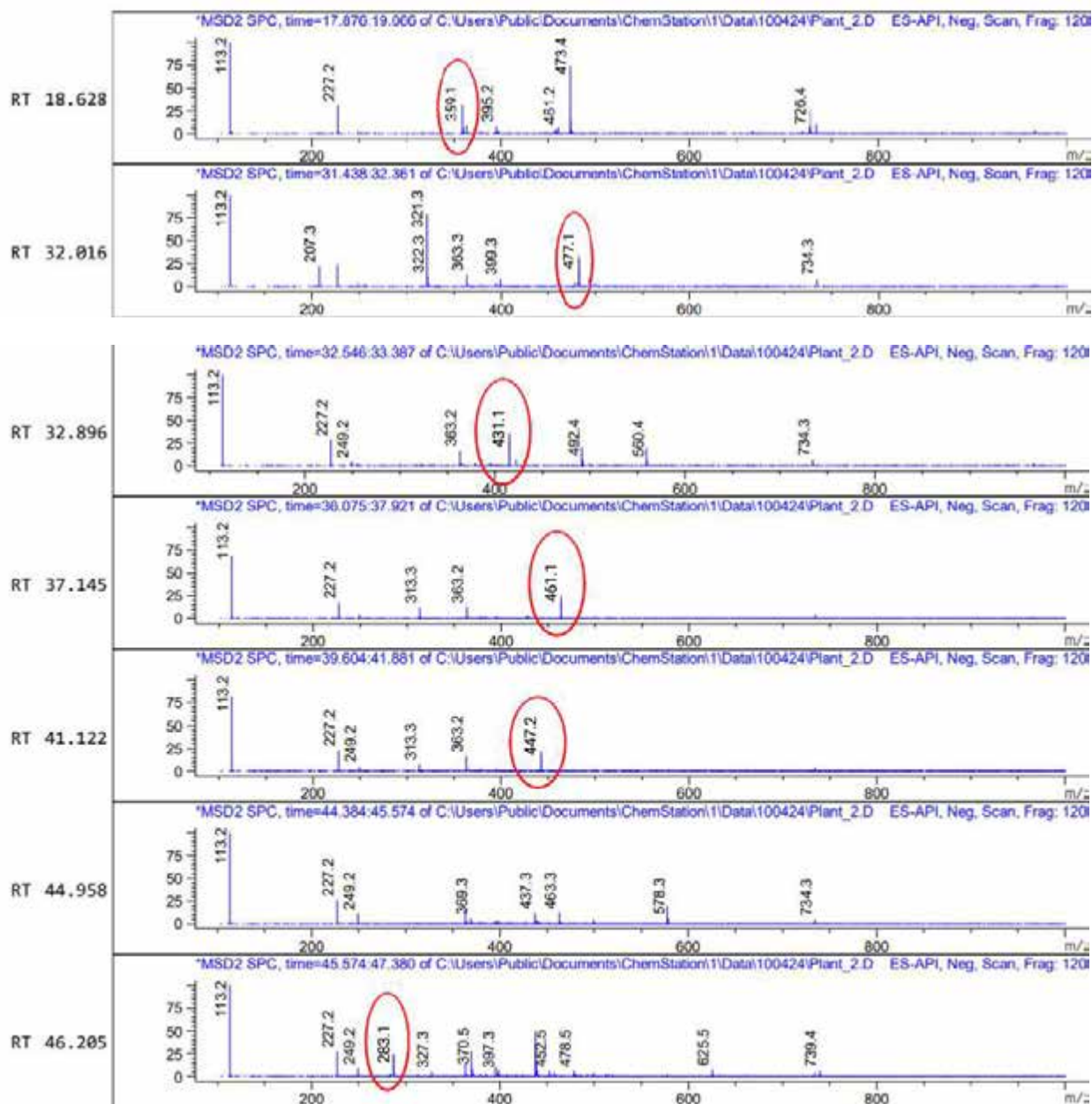


Рис. 3.11. Мас-спектри піків рослинного екстракту Змієголовника молдавського

Таблиця 3.1

Ідентифіковані сполуки з рослинного екстракту Змієголовника молдавського

№	Час виходу (хв)	m/z	Формула	Сполука
1	18.635	359 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Розмаринова кислота
2	32.026	477 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	Діосметин-7-О-глюкуронід
3	32.864	431 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Апігенін-7-О-глюкозид
4	37.126	461 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	Акацетин-7-О-глюкуронід

Таблиця 3.1

Ідентифіковані сполуки з рослинного екстракту Змієголовника молдавського

5	41.012	447 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	Тіліанін
6	46.205	283 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Акацетин

Виявлені сполуки відомі своєю значною фармакологічною активністю. Зокрема:

Розмаринова кислота є потужним природним антиоксидантом з вираженими протизапальними, противірусними та антибактеріальними властивостями. Вона також проявляє нейропротекторний ефект, що робить її перспективною для використання в лікуванні неврологічних захворювань, а також для профілактики та лікування захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом. Вона широко застосовується у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості, де використовується як компонент протизапальних засобів, препаратів для шкіри та антиоксидантних добавок.

Діосметин відомий своїми протизапальними, антиоксидантними та антиканцерогенними властивостями. Глюкуронідна форма цієї речовини є водорозчинною та легше засвоюваною організмом, що підвищує її фармакологічну ефективність. Діосметин може бути використаний у розробці засобів для лікування судинних захворювань, таких як варикоз та хронічна венозна недостатність.

Апігенін-7-О-глюкозид володіє антиоксидантними, протизапальними та антиканцерогенними властивостями. Його використання є перспективним для профілактики та лікування онкологічних захворювань, а також для підтримки здоров'я серцево-судинної системи. Завдяки протизапальній дії, апігенін може бути використаний в косметичних засобах для зменшення подразнень шкіри.

Акацетин та його глюкуронідна форма проявляють кардіопротекторні, антиаритмічні та протизапальні властивості. Вони можуть бути використані у фармацевтичних препаратах для лікування серцево-судинних захворювань,

зокрема аритмій. Крім того, акацетин має виражену антиканцерогенну активність, що робить його перспективним для досліджень в онкології.

Тіліанін є флавоноїдом з потужними антиоксидантними, протизапальними та спазмолітичними властивостями. Він використовується для лікування серцево-судинних захворювань, оскільки сприяє зниженню артеріального тиску та покращує роботу серця. Тіліанін також виявляє нейропротекторну активність, що робить його перспективним для застосування у препаратах, які запобігають неврологічним захворюванням.

Поряд з дослідженням екстракту надземної частини рослини, був також приготований екстракт із коріння Змієголовника для порівняння складу біологічно активних речовин. Однак, після проведення високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) і подальшого мас-спектрометричного аналізу, значних піків на хроматограмі виявлено не було, а мас-спектрометр не виявив значної кількості сполук (Рис. 3.12).

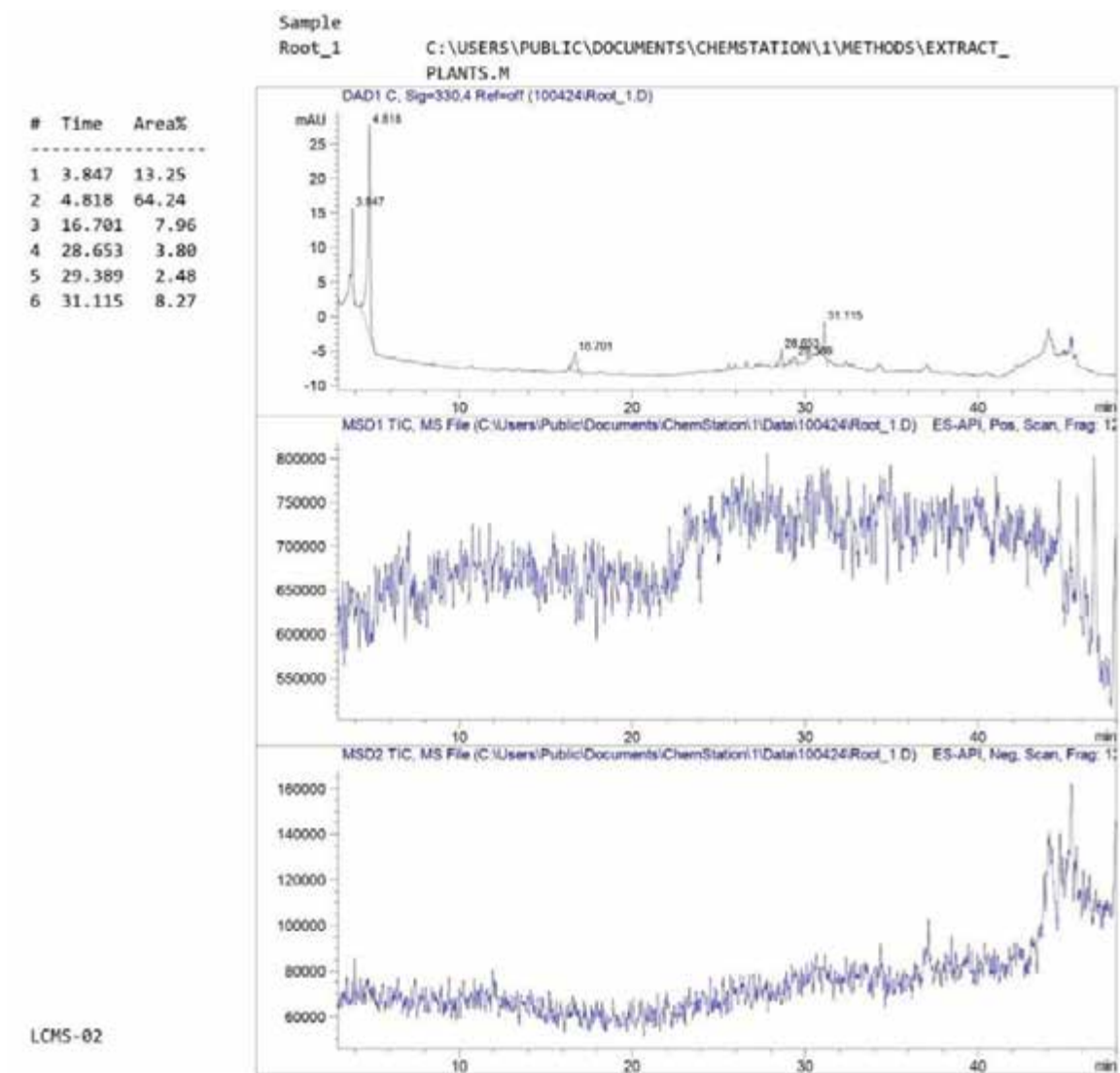


Рис. 3.12. Хроматограма екстракту з коріння Змієголовника молдавського

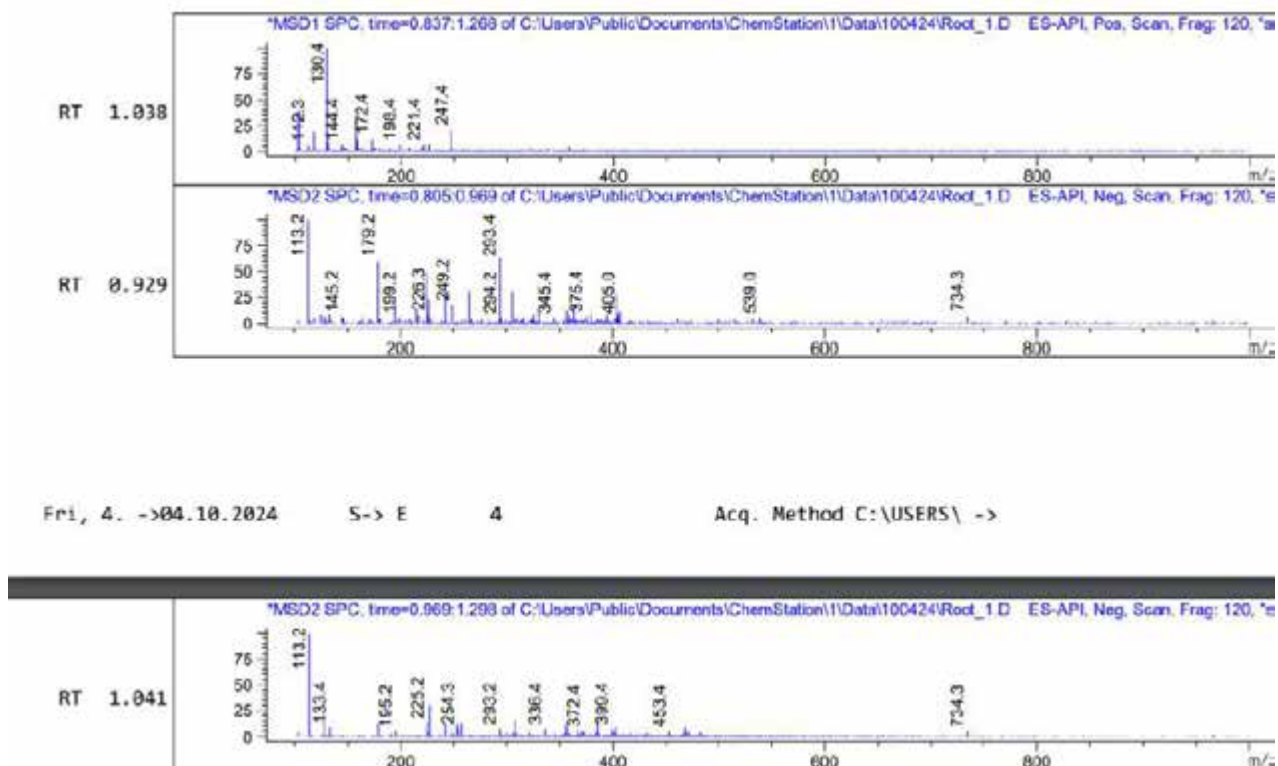


Рис. 3.12. Мас-спектри піків екстракту з коріння Змієголовника молдавського

Отримані результати можна пояснити кількома факторами:

У багатьох рослинах основна кількість біологічно активних речовин зосереджена у надземних частинах, таких як листя, стебла та квіти. Коріння часто виконує здебільшого допоміжні функції, такі як накопичення поживних речовин, але може містити менше БАР. У випадку Змієголовника молдавського більшість біологічно активних речовин, таких як флавоноїди та фенольні кислоти, зосереджені у надземній частині рослини, що пояснює відсутність значних піків на хроматограмі кореневого екстракту.

У корінні концентрація біологічно активних сполук може бути настільки низькою, що вони не виявляються при застосованих методах екстракції або під час мас-спектрометричного аналізу. Навіть якщо деякі сполуки присутні в коренях, їх концентрація може бути нижчою за межу чутливості приладу, що також призвело до відсутності відчутних результатів на хроматограмі.

Хімічний склад коренів відрізняється від складу надземної частини рослин. У багатьох випадках коріння містить більше полісахаридів, органічних кислот або інших речовин, які можуть бути не настільки легко виявлені

методом ВЕРХ або мас-спектрометрії. Ці сполуки можуть мати меншу полярність або не містити характерних для флавоноїдів і фенольних кислот структур, що знижує їх здатність до іонізації у джерелі мас-спектрометра.

Таким чином, результати цього дослідження підтверджують значний фармакологічний потенціал Змієголовника молдавського завдяки вмісту в ньому біологічно активних речовин. Ідентифіковані сполуки мають широкий спектр терапевтичної дії та можуть бути використані у фармацевтичній, косметичній і харчовій промисловостях. Отримані дані підкреслюють актуальність подальших досліджень цієї рослини, що сприятиме розробці нових природних препаратів для профілактики та лікування різних захворювань.

ВИСНОВКИ

Мікроклональне розмноження є ефективним методом для масового виробництва Змієголовника молдавського, забезпечуючи генетичну однорідність, високу якість посадкового матеріалу і незалежність від сезонних умов. Цей метод сприяє збереженню цінних лікарських рослин і задовольняє потреби фармацевтичної промисловості у високоякісній сировині.

1. Відповідно до проведених досліджень виявлено, що використання насіння в якості експлантатів для мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського є ефективним.
2. Встановлено, що використання етанолу (70%) протягом 1 хв та гіпохлориту натрію (25%) протягом 10 хв є ефективним методом стерилізації насіння Змієголовника молдавського.
3. Після 30 діб вирощені рослини були придатні для екстракції, що забезпечило отримання достатньої кількості біомаси для проведення подальших хімічних аналізів. Це свідчить про те, що мікроклональне розмноження є ефективним методом для отримання матеріалу, придатного для досліджень біологічно активних речовин.
4. Виявлено, що використання ацетонітрилу (А) і 0,05% мурашиної кислоти (що містить 20 мМоль/л ацетату амонію) (В) як рухомої фази для ВЕРХ є ефективним для якісного визначення вмісту БАР в Змієголовнику молдавському.
5. Встановлено, що програма градієнтного елюювання 0-58% (А) протягом 55 хв дієво розділяє піки.
6. Проведений метод ВЕРХ екстракту Змієголовника молдавського показав наявність низки важливих біологічно активних речовин, серед яких: розмаринова кислота, діосметин-7-О-глюкуронід, апігенін-7-О-глюкозид, акацетин-7-О-глюкуронід, тіліанін, акацетин.
7. У ході дослідження екстракту коріння Змієголовника молдавського методом ВЕРХ не було виявлено значних піків, що свідчить про низький вміст біологічно активних речовин у цій частині рослини.

8. Виявлені біологічно активні речовини мають значний терапевтичний потенціал, зокрема антиоксидантні, протизапальні, кардіопротекторні та антиканцерогенні властивості. Це підтверджує доцільність використання Змієголовника молдавського в фармацевтичній промисловості для створення препаратів на основі натуральних компонентів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ackworth, I.N. Coulametric Electrode Array Detectors for HPLC (Progress in HPLC-HPCE, Vol. 6). Brill Academic: Boston, 1997.
2. Adu-Gyamfi R, Wetten A, Marcelino Rodríguez López C (2016) Effect of cryopreservation and post-cryopreservation somatic embryogenesis on the epigenetic fidelity of cocoa (*Theobroma cacao* L.).
3. Aghaye, Rahim Nazary Moghaddam, and Abbas Yadollahi. "Micropropagation of GF 677 Rootstock." *Journal of Agricultural Science* 4, no. 5 (March 31, 2012).
4. Ahl, H.A.H.S.A., Sabra, A.S., Gendy, A.N.G.E., Aziz, E.E. and Tkachenko, K.G. (2015) Changes in content and chemical composition of *Dracocephalum moldovica* L. essential oil at different harvest dates. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3: 61-64.
5. Amirnia, R., Manesh, M.F., Danesh, Y.R., Najafi, S., Seyyedi, N. and Ghiyasi, M. (2017) Karyological study on Teheran ecotype of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1: 29-31.
6. Antonopoulou. C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C. & Tsirakoglou, V. (2005). Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF-677. *Sci Hortic.*, 106, 268–272.
7. Aprotosoai, A.C., Mihai, C.T., Vochita, G., Rotinberg, P., Trifan, A., Luca, S.V., Petreus, T., Gille, E. and Miron, A. (2016) Antigentoxic and antioxidant activities of polyphenolic extract from European *Dracocephalum moldavica* L. *Industrial Crops and Products*, 79: 248-257.
8. Aslanipour B., Heidari R., Farnad N. (2017) Phenolic combination and comparison of antioxidant activity in three different alcoholic extracts of *Dracocephalum moldavica* L. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5:199-206.

9. Baricevic, D.; Bernáth, J.; Maggioni, L.; Lipman, E. Report of a working group on medicinal and aromatic plants. In Proceedings of the European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks, First Meeting, Gozd Martuljek, Slovenia, 12–14 September 2002.
10. Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 1986;167:473–81.
11. Beigomi, M., Mohsenzadeh, M. and Salari, A. (2018) Characterization of a novel biodegradable edible film obtained from *Dracocephalum moldavica* seed mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108: 874-883.
12. Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, 31-107.
13. Blasco M, Badenes ML, del Mar Naval M (2016) Induced parthenogenesis by gamma irradiated pollen in loquat for haploid production. *Breed Sci* 66:606–612.
14. Bonner J, Addicott F. Cultivation in vitro of excised pea roots. *Bot Gaz* 1937;99:144–70.
15. Borghei, S.F., Azizi, A., Hadian, J. and Abdosi, V. (2015) Broad variation in herbage yield and essential oil content among Iranian landraces of *Dracocephalum moldavica*. *Biological Forum – an International Journal*, 7: 1568-1574.
16. Cardoso, J.C.; de Oliveira, M.E.B.; Cardoso, F.D.C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Hortic. Bras.* 2019, 37, 124–132.
17. Channuntapipat, C., Margaret Sedgley, and Graham P. Collins. “Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan×Nemaguard.” *Scientia Horticulturae* 98, no. 4 (September 29, 2003): 473–84.
18. Chee R, Pool RM (1987) Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Sci Hortic* 32:85–95.

19. Chu, S.S., Liu, S.L., Liu, Q.Z., Liu, Z.L. and Du, S.S. (2011) Composition and toxicity of Chinese *Dracocephalum moldavica* (Labiatae) essential oil against two grain storage insects. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 4621-4626.
20. Datta K, Sahoo G, Krishnan S et al (2014) Genetic stability developed for β -carotene synthesis in BR29 rice line using dihaploid homozygosity.
21. Dionex Corporation. Determination of Galactosamine Containing Organic Impurities in Heparin by HPAE-PAD Using the CarboPac PA20 Column, Application Note 233, LPN 2286, Sunnyvale, CA, 2009.
22. Dix L, Van Staden J. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1982;1:239–45.
23. Dmitruk, M., Weryszko-Chmielewska, E. and Sulborska, A. (2018) Flowering and nectar secretion in two forms of the Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) – a plant with extraordinary apicultural potential. *Journal of Apicultural Science*, 62: 97-109.
24. Dobrea, D.I., Trotus, E., Naie, M., Mirzan, O., Lupu, C. and Buburuz, A.A. (2017) The influence of the nutrition space on the herb and seed yields at Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in A.R.D.S. Secuieni pedoclimatic conditions. *Lucrari Stiintifice – Seria Agronomie*, 60: 91-96.
25. Domokos, J., Peredi, J. and Halasz-Zelnik, K. (1994) Characterization of seed oil of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) and catnip (*Nepeta cataria* var. *citrodora* Balb.). *Industrial Crops and Products*, 3: 91-94.
26. Drew RA, Smith NG. Growth of apical and lateral buds of pawpaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *J Horticult Sci* 1986;61:535–43.
27. Dziki, D., Mis, A., Gladyszewska, B., Laskowski, J., Kwiatkowski, S. and Gawlik-Dziki, U. (2013) Physicochemical and grinding characteristics of dragonhead seeds. *International Agrophysics*, 27: 403-408.
28. Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A. and Aminzare, M. (2017) Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis*

- and *Dracocephalum moldavica* essential oil. *Veterinary Research Forum*, 8: 223-229.
- 29.El-Baky, H.H. and El-Bsroty, G.S. (2008) Chemical and biological evaluation of the essential oil of Egyptian moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). *International Journal of Integrative Biology*, 3: 202-208.
- 30.Entsch B, Letham DS, Parker CW, Summons RE, Gollnow BI. Metabolites of cytokinins. In: Skoog F, editor. *Plant Growth Substances 1979. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances*. Berlin: Springer; 1980. p. 109–18.
- 31.Eshghi Khas M, Abbasifar A, Valizadeh Kaji B (2020) Optimization of in vitro propagation of purple passion fruit (*Passiflora edulis*), an important medicinal and ornamental plant. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 7, 305-314.
- 32.Fallah, S., Rosttaei, M., Lorigooini, Z. and Surki, A.A. (2018) Chemical compositions of essential oil and antioxidant activity of dragonhead (*Dracocephalum moldavica*) in sole crop and dragonheadsoybean (*Glycine max*) intercropping system under organic manure and chemical fertilizers. *Industrial Crops and Products*, 115: 158-165.
- 33.Frac, M., Oszust, K., Kocira, A. and Kocira, S. (2015) Molecular identification of fungi isolated from *Dracocephalum moldavica* L. seeds. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 7: 74-79.
- 34.George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Plant propagation by tissue culture*, vol 1, 3rd edn. Springer, Dordrecht, Netherlands, p 340.
- 35.Gonçalves, S.; Moreira, E.; Grosso, C.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Romano, A. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *J. Food Sci. Technol.* 2017, 54, 219–227.
- 36.Grigore, A.; Pirvu, L.; Bubueanu, C.; Colceru-Mihul, S.; Ionita, C.; Ionita, L. Medicinal Plant Crops-Important Source of High Value-Added Products. *Sci. Pap. Ser. A Agron.* LIX 2016, 59, 298–307.

37. Gu, H.F., Chen, R.Y., Sun, Y.H. and Liu, F. (2004) Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 29: 232-234.
38. Hecht SM. Probing the cytokinin receptor site(s). In: Skoog F, editor. *Plant Growth Substances 1979. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances*. Berlin: Springer; 1980. p. 144–60.
39. Hegazy, M.H., Alzuaibr, F.M.A., Mahmoud, A.A., Mohamed, H.F.Y. and Ahl, H.A.S.A. (2016) The effects of zinc application and cutting on growth, herb, essential oil and flavonoids in three medicinal Lamiaceae plants. *European Journal of Medicinal Plants*, 12: 1-12.
40. Holm, Y., Galambosi, B. and Hiltunen, R. (1988) Variation of the main terpenes in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) during growth. *Flavour and Fragrance Journal*, 3: 113-115.
41. Inoue M, Maeda E. Control of organ formation in rice callus using two-step culture method. In: Fujiwara A, editor. 1982. p. 183–184 (q.v.).
42. Jacquiot C. Action of meso-inositol and of adenine on bud formation in the cambium tissue of *Ulmus campestris* cultivated in vitro. *C R Acad Sci Paris* 1951;233:815–7.
43. Jeong, K.S., Jang, C.S., Park, S.H., Lee, J.S., Yoon, S.M., Kim, T.H., Shin, C.H. and Choi, K. (2016) Two unrecorded naturalized plants in Korea: *Stachys agraria* and *Dracocephalum moldavica* (Lamiaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 46: 413-419.
44. Joy IV RW, Patel KR, Thorpe TA. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1988;13:219–28.
45. Keikhaie, K.R., Jahantigh, H.R., Bagheri, R. and Kehkhaie, A.R. (2018) The effects of the ethanol extract of *Dracocephalum moldavica* (Badrashbu) against strains of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. *International Journal of Infection*, 5: e65295.
46. Khalili, P. and Amirnia R. (2014) Effect of harvesting time and iron application on Moldavian balm. *Notulae Scientia Biologicae*, 6: 505-508.

47. Khoulenjani, M.B. and Salamati, M.S. (2014) The study of seed yield and yield components in different populations of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). Proceedings of International Conference on Agriculture, Food and Environmental Engineering, Kuala Lumpur.
48. Kitto S (2016) Micropropagation of mint. In: Beyl CA, Trigiano RN (eds) Plant propagation, concepts and laboratory exercises, second edn. CRC Press, Boca Raton, FL. Chapter 32, pp 385–393.
49. Loewus F.A., Loewus M.W. Myo-inositol: biosynthesis and metabolism. In: Stumpf, Conn, editors. The Biochemistry of Plants 3. New York: Academic Press; 1980. p. 43–76.
50. Mihaljevic I, Dugalic K, Tomas V, Viljevac M, Pranjic A, Cmelik Z, Puskar B, Jurkovic Z (2013) In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'OBLAČINSKA' Sour Cherry. *Agricultural Sciences*. 58, 117-126.
51. Mosa, M.N.G. and Fateh, M. (2015) Check sowing date and seed priming on the essential oil *Dracocephalum moldavica* L. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 6: 54-58.
52. Murashige T, Serpa M, Jones JB. Clonal multiplication of *Gerbera* through tissue culture. *HortScience* 1974;9: 175–80.
53. Naderifar, M., Sonboli, A. and Gholipour, A. (2015) Pollen morphology of Iranian *Dracocephalum* L. (Lamiaceae) and its taxonomic significance. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 22: 99-110.
54. Naie, M., Trotus, E., Lupu, C. and Popa, D. (2016) Data and knowledge on the importance of *Dracocephalum moldavica* L. species (dragon's head) to introduce and develop the cultivation technology. *Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza din Iasi. Sectiunea II A, Biologie Vegetala*, 62: 124- 125.
55. National Center for Biotechnology Information [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

56. Niessen, W.M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Chromatographic Science Series Vol. 97), 3rd ed., Taylor and Francis: London, 2006.
57. Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M.E. and Yavari, S. (2010) Introduction of autopolyploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicines treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18: 23-35.
58. Oniszczyk, T., Wójtowicz, A., Kocira, S., Żelizko, K., Oniszczyk, A. and Dib, A. (2017) The use of Moldavian dragonhead bagasse waste in extruded products. *Proceedings of 9th International Scientific Symposium "Farm Machinery and Processes Management in Sustainable Agriculture"*, Lublin.
59. Ördög V, Stirk WA, Van Staden J, Novák O, Strnad M. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *J Phycol* 2004;40:88–95.
60. Pak, Z.H., Abbaspour, H., Karimi, N. and Fattahi, A. (2016) Eco-friendly synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using *Dracocephalum moldavica* seed extract. *Applied Sciences*, 6: 69.
61. Parriott, D. *A Practical; Guide to HPLC Detection*, Academic Press: San Diego, CA, 1993.
62. Passinho-Soares HC, David JP, de Santana JRF, David JM, Rodrigues FM, Mesquita PRR, de Oliveria FS, Bellintani MC (2017) Influence of growth regulators on distribution of trichomes and the production of volatiles in micropropagated plants of *Plectranthus ornatus*. *Rev Bras* 27:679–690.
63. Pollard JK, Shantz EM, Steward FC. Hexitols in coconut milk: their role in the nurture of dividing cells. *Plant Physiol* 1961;36:492–501.
64. Popova, O.I., Nikitina, A.S. and Markova, O.M. (2008) Studies of iridoids from *Dracocephalum moldavica* cultivated in the Stavropol Region, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42: 351-353.
65. Rahbarian, P. (2014) Effects of manure on growth medicinal plant in dragonhead (*Dracocephalum moldavica*). *European Journal of Experimental Biology*, 4: 357-360.

66. Rahimzadeh, S., Sohrabi, Y., Pirzad, A. and Sheykhbaglou, R. (2017) Effect of biological and chemical fertilization on the yield and nutrients of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) seeds. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 10: 323-332.
67. Roychoudhury, A.; Bhowmik, R. State-of-the-Art Technologies for Improving the Quality of Medicinal and Aromatic Plants. In *Medicinal and Aromatic Plants*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; pp. 593–627.
68. Saad, N.Y.; Muller, C.D.; Lobstein, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* 2013, 28, 269–279.
69. Samadimatin, A. and Hani, A. (2017) Effect of ethanol and humic acid foliar spraying on morphological traits, photosynthetic pigments and quality and quantity of essential oil content of *Dracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 8: 2299-2306.
70. Santoro, M.V.; Nievas, F.; Zygadlo, J.; Giordano, W.; Banchio, E. Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) Micropropagated in Vitro. *Am. J. Plant Sci.* 2013, 4, 49–55.
71. Satyal, P.; Jones, T.H.; Lopez, E.M.; McFeeters, R.L.; Ali, N.A.; Mansi, I.; Al-Kaf, A.G.; Setzer, W.N. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods* 2017, 6, 20.
72. Scoggins, H., Bridgen, M., Timber Press (2013). *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*, 4th Edition.
73. Scott, R.P.W. *Handbook of HPLC*, Chapter 15; (Chromatographic Science Series, Vol. 78), Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., Miller, N. Eds.; Dekker: New York, 1998.
74. Sharifmoghaddam N, Safarnejad A & Tabatabaei SM, The effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Amygdalus communis*. *Not Sci Biol*, 3 (2011) 97.

75. Snyder, L.R.; Glajch, J.L.; Kirkland, J.J. *Practical HPLC Method Development*, John Wiley and Sons: New York, 1988.
76. Stehsela ML, Caplina SM. Sugars: autoclaving sterile filtration on the growth of carrot root tissue in culture. *Life Sci* 1969;8(24):1255–9.
77. Swartz, M. (2010). HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130–1150.
78. Varasteh, K.N., Babaei, A. and Abdoli, M. (2015) The effect of different sodium hypochlorite concentrations on seed germination of *Dracocephalum moldavica* L. *Austin Journal of Plant Biology*, 1: 1007.
79. Watanabe K, Tanaka K, Asada K, Kasal Z. The growth promoting effect of phytic acid on callus tissues of rice seed. *Plant Cell Physiol* 1971;12:161–4.
80. Went F. Auxin: the plant growth hormone. *Bot Rev* 1935;1:162–82. (2.2) [80]
81. Weremczuk-Jeżyna, I., Grzegorzczuk-Karolak, I., Frydrych, B., Hnatuszko-Konka, K., Gerszberg, A. and Wysokińska, H. (2017) Rosmarinic acid accumulation and antioxidant potential of *Dracocephalum moldavica* L. cell suspension culture. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45: 215-219.
82. What Is Micropropagation - An Overview of Its Techniques. *BYJUS*, June 18, 2021.
83. Wojtowicz, A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Kocira, S., Wojtunik, K., Mitrus M., Kocira A., Widelski, J. and Skalicka-Wozniak, K. (2017) Application of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) leaves addition as a functional component of nutritionally valuable corn snacks. *Journal of Food Science and Technology*, 54: 3218-3229.
84. Wood HN, Braun AC. Studies on the regulation of certain essential biosynthetic systems in normal and crown gall tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1907–13.
85. Xu, Z., & Chang, L. (2017). *Lamiaceae. Identification and Control of Common Weeds: Volume 3*, 181–265.

86. Yousefzadeh, S.; Modarres-Sanavy, S.A.M.; Sefidkon, F.; Asgarzadeh, A.; Ghalavand, A.; Sadat-Asilan, K. Effects of Azocompost and Urea on the Herbage Yield and Contents and Compositions of Essential Oils from Two Genotypes of Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in Two Regions of Iran. *Food Chem.* 2013, *138*, 1407–1413.
87. Zeng, C., Jiang, W., Wang, X.C., Tan, M.E. and Xing, J.G. (2016) Total flavonoids extract from *Dracocephalum moldavica* composite phospholipid liposomes: Preparation, in vitro drug release and permeability of Caco-2 cell. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *5*: 30-35.
88. Zhang, J.L., Yan, R.J., Yu, N., Zhang, X., Chen, D.J., Wu, T. and Xin, J.G. (2017) A new caffeic acid tetramer from the *Dracocephalum moldavica* L. *Natural Product Research*, *32*: 370-373.
89. Zhao, M., Zhang, H., Yan, H., Qiu, L. And Baskin, C.C. (2018) Mobilization and role of starch, protein and fat reserves during seed germination of six wild grassland spices. *Frontiers in Plant Science*, *9*: 234.

ДОДАТКИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ



ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ РОСЛИН

*Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції
здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБіП України
(23 квітня 2024 р.)*



Київ-2024

Фітопаразитичні нематоди трьох енергетичних культур для виробництва біопалива. Луцюк А. С., Стефановська Т. Р.	230
Особливості стерилізації вихідного матеріалу <i>Salvia officinalis</i> для введення в культуру in vitro. Майданович Н.Р., Лобова О.В.	232
Особливості методів стерилізації тюльпану для введення в умови in vitro. Матвієнко А.О., Лобова О.В.	235
Особливості дії біологічних препаратів при вирощуванні <i>Glycine max</i> L. Маценко Я. С., Бородай В. В.	237
Морфогенез та розмноження in vitro <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Моргун С.С., Кляченко О.Л.	239
Застосування регуляторів росту стиму та регоплант у вирощуванні рослин міскантусу. Остапенко К.В., Медков А.І., Бородай В.В., Стефановська Т.Р.	241
Постасептична адаптація рослин регенерантів in vitro туї західної. Павленко Ю.С., Коломіць Ю.В.	242
Біологічно активні компоненти та мінеральні солі як ключові фактори в рості та використанні грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm. Пигичко Р.О., Бойко О.А.	244
Підбір живильногосередовища для одержання калюсу непентесу чудового (<i>Nepenthes mirabilis</i>) в умовах in vitro. Пула В.С., Коломіць Ю.В.	246
Стратегії застосування культивування <i>Daucus carota</i> in vitro для підвищення біорезистентності та виробництва корисних біопродуктів. Самолук А. А., Коломіць Ю. В.	248
Вплив вуглецевих наноматеріалів на фізіологічні показники та структуру коренів сільськогосподарських рослин. Северін С.М., Ткаченко Т.А.	250
Мікроклональне розмноження зміголовника молдавського (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.). Сипченко О. Ю., Лобова О. В.	252
Вплив біологічних активних речовин грибів роду <i>Daedaleopsis</i> J.Schröt. на ріст і розвиток овочевих культур. Сірик А.С., Бойко О. А.	254
Ефективність комплексного застосування біопрепаратів в технології вирощування сої. Словінський В.В., Бородай В.В.	255
Оцінка препарату на основі с6-hsl (п-гексаноїл-гомосеринлактон) для адаптації живців картоплі in vitro. Царуліца О., Лісовий М.М.	257
Введення <i>Pulsatilla alba</i> в культуру in vitro. Швець В. В., Лобова О.В.	259
Ксилотрофні базидієві гриби та їх використання в моніторингу екосистем. Швець Д.О., Бойко О.А.	261
Оптимізація біотехнології виробництва вакцин для птахівництва. Шевченко А.В., Бородай В.В.	262
Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях. Шкарбан П.О., Таран О.П.	264
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур Шмиголь П.А., Бойко О.А.	266
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур. Шмиголь П.А., Бойко О.А.	267

УДК 58.085

**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗМІГОЛОВНИКА
МОЛДАВСЬКОГО (*DRACOCERPHALUM MOLDAVICA* L.)**

Сипченко О. Ю., магістр 1-го року навчання,

Науковий керівник: *Лобова О. В.*, доцент, к.б.н.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

e-mail: oksana.sypchenko@gmail.com

Зміголовник молдавський (*Dracocephalum moldavica* L.) – це однорічна трав'яниста рослина, що належить до родини Глухоцвітих (Lamiaceae). Вона має прямостоячі стебла, які можуть досягати висоти до 30-60 см. Листки Зміголовника молдавського зубчасті, сидячі, зелені з фіолетовим відтінком. Квітки зібрані в колосоподібні суцвіття, які мають яскраво-фіолетовий колір та приємний аромат. Рослина відома своїми цілющими властивостями, присмним ароматом та використанням у кулінарії та фармації.

Мікроклональне розмноження стало важливим методом для забезпечення постійного посівного матеріалу цієї рослини та підтримання генетичної стабільності в культурних популяціях.

Мікроклональне розмноження – це процес вирощування клітин, тканин або органів рослин в штучних умовах. Для Змієголовника молдавського мікроклональне розмноження використовується для отримання великої кількості рослин однакового генетичного складу.

Для дослідження брали насіння Змієголовника молдавського та вивчали найоптимальніший варіант отримання стерильних рослин. Насіння стерилізували 70% розчином етанолу, потім поміщали в розчин білизни 1/3. Після цього насіння промивали стерильною дистильованою водою 3 рази по 10 хв.

Експлантати культивували на середовищі Murashige & Skoog (MS), збагаченому різними комбінаціями та концентраціями регуляторів росту рослин (6-бензиламінопурин (БАП), альфа-нафтилоцтова кислота (НОК) та індол-3-оцтова кислота (IAA)). Найбільшу середню кількість ($5,70 \pm 0,36$) та довжину ($4,90 \pm 0,34$) мікропаростків було досягнуто на середовищі MS з 2,0 мг/л БАП та 0,5 мг/л IAA. Експерименти з укоріненням проводили на $\frac{1}{2}$ MS з використанням різних концентрацій ІМК (індоліл-3-масляна кислота), IAA та НОК (0,5 - 1,5 мг/л). Максимальне коренеутворення ($5,0 \pm 0,60$) з найбільшим розтягуванням коренів ($5,39 \pm 0,23$) було досягнуто на середовищі з вмістом IAA 1,5 мг/л.

Переваги мікроклонального розмноження Змієголовника молдавського включають:

1. Ефективність. Цей метод дозволяє отримати значну кількість рослин за відносно короткий період часу.
2. Генетична стабільність. Оскільки всі отримані рослини є клонами вихідного матеріалу, гарантується збереження генетичної стабільності та властивостей сорту.
3. Відсутність захворювань. Процес мікроклонального розмноження здійснюється в стерильних умовах, що мінімізує ризик зараження рослин шкідливими мікроорганізмами.

Мікроклональне розмноження є ефективним методом для отримання великої кількості генетично ідентичних рослин Змієголовника молдавського для збереження його генетичної стабільності та використання у різноманітних дослідженнях та промислових процесах. Використання комбінації поверхневої дезинфекції та термічної обробки є найефективнішим методом стерилізації для цієї рослини, а методи введення в культуру *in vitro*, такі як культура мірогамет та соматичний ембріогенез, дозволяють отримувати стерильні рослини з високою ефективністю.

Список використаної літератури:

1. Sharma, M., & Sharma, N. (2017). Micropropagation: A tool for the conservation of rare and endangered plant species. In *Micropropagation: Uses and Conservation of Plant Genetic Resources* (pp. 213-233). Springer, Singapore.
2. Faisal, M., Anis, M., & Alatar, A. A. (2015). Micropropagation of aromatic and medicinal plants. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 185-204). Springer, Cham.
3. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Springer Science & Business Media.



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

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



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

24-25 квітня 2024 р.

Київ – 2024

<i>Самолук А.А., Коломієць Ю.В.</i> ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ DAUCUS CAROTA IN VITRO: СПОСОБИ ОТРИМАННЯ ПРИРОДНИХ ПІГМЕНТІВ І ФІТОНЦИДІВ У КОНТЕКСТІ ФІЛОСОФІЇ СТАЛОГО РОЗВИТКУ ЛЮДСТВА.....	252
<i>Северін С.М., Ткаченко Т.А.</i> ЕКОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ ВИКОРИСТАННЯ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ В СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ.....	253
<i>Сербенюк Г.А.</i> ВИКОРИСТАННЯ ПРИРОДНО-ЗАПОВІДНИХ ОБ'ЄКТІВ ПІД ЧАС ВИВЧЕННЯ ДИСЦИПЛІНИ ЗАПОВІДНА СПРАВА.....	256
<i>Смірнова К.Р., Сербенюк А.А.</i> ШЛЯХИ ФОРМУВАННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ МЕРЕЖІ КІЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	258
<i>Синенко Д.І., Дем'янюк О.С., Симочко Л.Ю.</i> ФІТОПАТОГЕННИЙ МІКОБІОМ ҐРУНТУ ЯБЛУНЕВОГО САДУ.....	260
<i>Сипченко О.Ю., Лобова О.В.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗМІГОЛОВНИКА МОЛДАВСЬКОГО (<i>DRACOCERHALUM MOLDAVICA L.</i>) В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>...	262
<i>Стрик А.Є., Бойко О.А.</i> ВПЛИВ БІОЛОГІЧНИХ АКТИВНИХ РЕЧОВИН ГРИБІВ РОДУ <i>DAEDALEOPSIS J.SCHRÖT.</i> НА РІСТ І РОЗВИТОК ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР.....	265
<i>Скороходова Д.А., Паламарчук С.П.</i> ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ДІЯЛЬНОСТІ ПІДПРИЄМСТВА ПО ПЕРЕРОБЦІ ПОЛІМЕРНИХ ВІДХОДІВ МІСТА ФАСТОВА.....	266
<i>Скрит С.І., Ладика М.М.</i> ЕКОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ ЗАТОПЛЕННЯ ДОЛІНИ РІЧКИ ІРПІНЬ.....	267
<i>Словінський В.В., Бородай В.В.</i> ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ В ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОЩУВАННЯ СОЇ.....	270
<i>Ставецький Н.С., Павлюк С.Д.</i> ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВІЙСЬКОВИХ ДІЙ.....	271
<i>Сушков А.А., Сербенюк Г.А.</i> ОЦІНКА ЕКОЛОГІЧНИХ АСПЕКТІВ ІННОВАЦІЙНИХ МЕТОДІВ ВИРОЩУВАННЯ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ.....	273
<i>Тхорик Л.О., Бережнюк Є.М.</i> ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТІВ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ВНАСЛІДОК ВОЄННИХ ДІЙ В УКРАЇНІ ТА МОЖЛИВІ ЗАХОДИ З ЇХ ВІДНОВЛЕННЯ.....	275
<i>Усня В.Д., Вагалик Л.В.</i> ВПЛИВ ПРЯМИХ ТА ОПОСЕРЕДКОВАНИХ ЗАГРОЗ ВЕДЕННЯ ВІЙСЬКОВИХ ДІЙ НА СТАН БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ.....	278
<i>Фірова А.В., Бондар Ю.О.</i> ЕКОЛОГІЧНА ОСВІТА ЯК ФОРМУВАННЯ ЕКОЛОГІЧНО СПРЯМОВАНОЇ ЖИТТЄВОЇ ПОЗИЦІЇ.....	281

УДК 58.085

ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗМІЄГОЛОВНИКА
МОЛДАВСЬКОГО (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICA L.*) В УМОВАХ *IN VITRO*

Сипченко О.Ю., студентка 1 курсу ОС «Магістр», факультету захисту рослин, біотехнологій
та екології

Лобова О.В., доцент, кандидат біологічних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Змієголовник молдавський (*Dracocephalum moldavica L.*) є рослиною, що відома своїми корисними властивостями в традиційній медицині та народній терапії. Ця трав'яниста рослина відноситься до родини Глухоцвітих (*Lamiaceae*), широко відомої своїми ароматичними властивостями, і має довгу історію використання в лікувальних цілях. Змієголовник походить зі східної частини Європи, а також з Азії, де він є природним компонентом флори. Рослина також росте в південних регіонах Китаю та Японії [1].

Дослідження лікарських властивостей Змієголовника молдавського зосереджуються на вивченні його фармакологічних властивостей, механізмів дії та потенційних медичних застосуваннях.

Надземні частини Змієголовника молдавського традиційно використовують для лікування патологій шлунка та печінки, головних болів, укусів змій, стоматитів, грибкових інфекцій [2]. Ефірні олії, що містяться в рослинному лікарському засобі, мають цитрусовий смак і багаті кисневими ациклічними монотерпенами, такими як гераніал, нерал і геранілацетат; однак вид також відомий своїм поліфенольним складом, серед якого головними сполуками є фенольні кислоти (розмаринова та кавова кислоти) і флавоноїди (апігенін, лютеолін і кемпферол) [3].

Обидва класи сполук пов'язані з біологічною активністю виду, такими як антиоксидантний, антимікробний та кардіопротекторний ефекти, які є найбільш вивченими, а також його протизапальні, нейропротекторні, седативні, цитотоксичні та антидепресивні ефекти, які менш відомі [4]. Антимікробний потенціал Змієголовника пояснюється його ефірними оліями, пов'язаними з його антиоксидантною здатністю, що продемонстрована проти *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* та *Listeria monocytogenes* [3].

Аналізуючи проведені дослідження виявлено, що найбільша кількість лікарських сполук у Змієголовника молдавського зазвичай міститься у верхній частині рослини, а саме в квітках і верхівках стебла. Основною сполукою є розмаринова кислота, другим за вмістом є апігенін, за ним йдуть лютеолін-7-О-глюкозид, славова кислота та кавова кислота.

1. Ідентифіковані та кількісно визначені компоненти зразка *D. moldavica* (мг/мл екстракту), зібрані за допомогою аналізу РХ-МС

Назва еталонної або відокремленої сполуки	Вміст (мг/мл)
Розмаринова кислота	5.833 ± 0.0624
Апігенін	0.967 ± 0.0492
Лютеолін-7-О-глюкозид	0.820 ± 0.0327
Елагова кислота	0.597 ± 0.0411
Кавова кислота	0.500 ± 0.0163

Змігеловник молдавський має багатий хімічний склад, який включає флавоноїди, фенольні кислоти, терпени та інші біологічно активні сполуки. Вони надають рослині протизапальні, антимікробні, антисептичні та антиоксидантні властивості. З цього приводу Змігеловник молдавський використовується в традиційній медицині для лікування захворювань дихальних шляхів, запалення шкіри, гострих респіраторних інфекцій та інших захворювань [4]. Також відомий як заспокійливий засіб, він використовується для полегшення стресу та тривожності.

Загалом, Змігеловник молдавський є корисною рослиною з багатою історією використання у медицині та кулінарії, що привертає увагу науковців і любителів природних ліків.

Список використаних джерел:

1. Aćimović, M.; Šovljanski, O.; Šeregelj, V.; Pezo, L.; Zheljzkov, V.D.; Ljujić, J.; Tomić, A.; Četković, G.; Čanadanović-Brunet, J.; Miljković, A.; et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activity of *Dracocephalum Moldavica* L. Essential Oil and Hydrolate. *Plants* 2022, 11, 941.
2. Golparvar, A.R.; Hadipanah, A.; Gheisari, M.M.; Khaliliazar, R. Chemical Constituents of Essential Oil of *Dracocephalum Moldavica* L. And *Dracocephalum Kotschyi* Boiss. from Iran. *Acta Agric. Slov.* 2016, 107, 25–31.
3. Jöhrer, K.; Galarza Pérez, M.; Kircher, B.; Çiçek, S.S. Flavones, Flavonols, Lignans, and Caffeic Acid Derivatives from *Dracocephalum Moldavica* and Their In Vitro Effects on Multiple Myeloma and Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 14219.
4. Moldovan, C.; Nițu, S.; Hermeziu, M.; Vidican, R.; Sandor, M.; Gâdea, Ș.; David, A.; Stoian, V.A.; Vătcă, S.D.; Stoian, V. Growth Characteristics of *Dracocephalum Moldavica* L. in Relation to Density for Sustainable Cropping Technology Development. *Agriculture* 2022, 12, 789.



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**



**ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЙ ТА БІОРІЗНОМАНІТТЯ**

**X ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО-
ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ
ВЧЕНИХ «БІОТЕХНОЛОГІЯ:
ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ»**

2-3 травня 2024 р.

м.Київ



Самолук А. А., Коломієць Ю. В. Особливості культивування <i>Daucus carota in vitro</i> для підвищення біорезистентності та виробництва корисних біопродуктів.....	62
Савіцька Л. В., Нестерова Н. Г. Використання рослин роду <i>Fagaceae</i> в озелененні міст.....	63
Северін С.М., Ткаченко Т.А. Перспективні напрямки використання вуглецевих наноматеріалів у сільському господарстві.....	65
Сідорович Є.А., Нестерова Н.Г. Аспекти впливу засолення ґрунту за дії 6-БАП на фізіологічні показники рослин кукурудзи <i>Zea mays</i> L.	67
Сірик А.Є., Бойко О.А. Вплив біологічних активних речовин грибів роду <i>Daedaleopsis</i> J.Schröt. на ріст і розвиток овочевих культур.....	69
Сипченко О.Ю., Лобова О.В. Мікроклональне розмноження Змігловника молдавського (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.)	69
Словінський В.В., Бородай В.В. Ефективність комплексного застосування біопрепаратів в технології вирощування сої.....	70
Сокол Д. О., Дрозд П. Ю. Моніторинг впливу інвазивних чужорідних видів на біорізноманіття водних екосистем.....	71
Хоменко Д.С., Лісовий М.М. Пробіотичні штами лакто- та біфідобактерій.....	73
Хомюк М.П., Кваско О.Ю. Особливості калусогенезу рослин монарди лимонної (<i>Monarda citriodora</i> Cerv. ex Lag.)	74
Швець Д. О. Бойко О. А. Характеристика ксилотрофних базидієвих грибів та їх використання в моніторингу екологічних систем.....	76
Шевченко А.В. Оптимізація біотехнології виробництва вакцин для птахівництва.....	76
Шкарбан П.О., Таран О.П. Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях.....	78
Шляхтун І.С., Кличенко О.І. Морфологічна різноманітність калюсних тканин Лаванди вузьколистої (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)	79

УДК 58.085

Сипченко О. Ю., Лобова О. В

**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗМІГОЛОВНИКА МОЛДАВСЬКОГО
(*DRACOCERPHALUM MOLDAVICA L.*)**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
e-mail: oksana.sypchenko@gmail.com*

Змієголовник молдавський (*Dracocephalum moldavica L.*) – однорічна ароматична рослина родини Глухоцвітих (*Lamiaceae*). Родом з Сибіру та Центральної Азії, також росте в Єгипті, Китаї та Монголії на висоті до 2700-3100 м над рівнем моря. Надземна частина змієголовника широко використовується в традиційній медицині для лікування розладів шлунку та печінки, а також головного та зубного болів. Дослідження показують, що екстракти змієголовника молдавського мають антихелікобактерну активність, а також седативні, знеболювальні та ранозагоювальні властивості. Основними речовинами, відповідальними за терапевтичну дію надземної частини змієголовника, є фенольні кислоти (переважно розмаринова, кавова та ферулова), флавоноїди та компоненти ефірної олії. Відомо, що флавоноїди та фенольні кислоти є корисними для здоров'я людини та профілактики захворювань завдяки їхній сильній антиоксидантній активності, здатності поглинати вільні радикали та нейтралізувати активні форми кисню.

Мікроклональне розмноження стає ключовим інструментом у збереженні змієголовника молдавського, який має не тільки естетичне значення, але й важливе медичне призначення. Відтак, дана робота спрямована на вивчення можливостей мікроклонального розмноження змієголовника молдавського, зокрема, на аналізі його генетичних особливостей та розвитку ефективних протоколів культивування.

У цьому дослідженні порівнювали проліферацію пагонів *in vitro* та регенерацію рослин змієголовника молдавського у напівтвердих та рідких культуральних системах. Кінчики пагонів рослин використовували як експлантати для вивчення реакції проліферації пагонів на середовища Мурасіге і Скуга (MS), що містили різні рівні 6-бензиламінопурину (БАП), кінетину та 6- γ -диметилаліламінопурину (2iP).

Експлантати обробляли стерилізаційними розчинами етанолу (C₂H₅OH) 70% і хлориду ртуті (II) (HgCl₂). Останнім етапом було промивання H₂O дист. 3 x 10 хвилин для видалення хімічних агентів.

Серед різних досліджуваних середовищ максимальна кількість пагонів була отримана на середовищі MS з 4,0 мг/л БАП (40,7). Серед усіх обробок для вкорінення пагони на середовищі MS з 1,0 мг/л індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) дали максимальну кількість коренів (14,4). Дослідження також вказують на те, що система рідкого культивування може

сприяти мікроклональному розмноженню змігловника молдавського, а рослинний матеріал є потенційно цінним для використання у виробництві рослинних добавок та ефірної олії.

Використання мікроклонального розмноження є важливим з точки зору збереження генетичної різноманітності змігловника молдавського, а також у забезпеченні постійного доступу до рослинного матеріалу для подальших наукових експериментів та промислового використання. Ефективні протоколи культивування та відтворення цієї рослини є першим кроком у забезпеченні її стабільного збереження та використання у подальших дослідженнях.

Список використаної літератури

1. Brewer MS (2011). Natural antioxidant: sources, compounds, mechanism of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10:221-247.
2. Sharma, M., & Sharma, N. (2017). Micropropagation: A tool for the conservation of rare and endangered plant species. In *Micropropagation: Uses and Conservation of Plant Genetic Resources* (pp. 213-233). Springer, Singapore.
3. Moldovan, C.; Nițu, S.; Hermeziu, M.; Vidican, R.; Sandor, M.; Gâdea, Ș.; David, A.; Stoian, V.A.; Vâtcă, S.D.; Stoian, V. Growth Characteristics of *Dracocephalum Moldavica* L. in Relation to Density for Sustainable Cropping Technology Development. *Agriculture* 2022, 12, 789.
4. Golparvar, A.R.; Hadipanah, A.; Gheisari, M.M.; Khaliliazar, R. Chemical Constituents of Essential Oil of *Dracocephalum Moldavica* L. And *Dracocephalum Kotschyi* Boiss. from Iran. *Acta Agric. Slov.* 2016, 107, 25–31.