НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – М. 1730 «С». 2021.10.13. 02 ПЗ

МАНЖУРА ОЛЕКСАНДР АНДРІЙОВИЧ

2022

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:631.528:633.812

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

Коломієць Ю.В

(підпис)

“ ” 2022 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

Екобіотехнології та біорізноманіття

Кваско О.Ю.

(підпис)

“ ” 2022 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Отримання культури "бородатих" коренів рослини Астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus Pall*)»

Спеціальність 162 біотехнології та біоінженерія

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

Проф., д. с-г. наук		**Лісовий М.М.**
(науковий ступінь та вчене звання)	(підпис)	(ПІБ)

Керівник бакалаврської роботи

Кандидат біологічних наук		**Кваско О.Ю.**
(науковий ступінь та вчене звання)	(підпис)	(ПІБ)

Виконав _____ **Манжура О.А.**

(підпис) (ПІБ студента)

КИЇВ – 2022

НУБіП України

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____

"___" _____ 2022 р.

З А В Д А Н Н Я

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Манжури Олександра Андрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Отримання культури "бородатих" коренів рослини Астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus Pall*)

керівник роботи к.б.н., Кваско О.Ю.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «13» жовтня 2021 р. № 1230 «С»

2. Строк подання студентом роботи 11 листопада 2022

3. Вихідні дані до роботи орієнтовані літературні джерела, методики введення культури в умови *in vitro* та отримання культури «бородатих» коренів, трансформація бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, орієнтовний склад поживних середовищ.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Підбір експлантів та умов для стримання асептичних рослин Астрагалу шерстистоквіткового; методіка трансформації рослини бактерією *Agrobacterium rhizogenes*; підбір умов культивування культури «бородатих» коренів рослини Астрагалу шерстистоквіткового

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., Кваско О.Ю.	15.10.21	15.10.21
2	к.б.н., Кваско О.Ю.	01.03.22	01.03.22
3	к.б.н., Кваско О.Ю.	15.08.22	15.08.22
Висновки	к.б.н., Кваско О.Ю.	29.09.22	29.09.22

6. Дата видачі завдання 01 жовтня 2021

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

	Назва етапів випускної магістерської кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Розділ 1. Огляд літературних джерел згідно обраної тематики	01.04.2022	
2.	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	10.05.2022	
3.	Розділ 3. Результати дослідження	20.09.2022	
4.	Висновки та оформлення списку літератури	25.10.2022	

Студент _____ _____

(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ _____

(підпис) (прізвище та ініціали)

НУБіП України

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота на тему « Отримання культури "бородатих" коренів рослини Астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus Pall*)» виконана на 56-ти сторінках друкованого тексту. Містить у собі 30 рисунків та 5 таблиць. Опрацьовано 31 літературне джерело.

Робота складається з таких розділів: зміст, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результатів дослідження та обговорення, висновків та списку використаної літератури.

Дослідження проводилось в навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП.

Метою роботи було отримати культуру «бородатих» коренів рослини *Astragalus dasyanthus* шляхом генетичної трансформації бактерією *Agrobacterium rhizogenes*.

Завдання роботи:

1. Введення в культуру *in vitro Astragalus dasyanthus* методом поверхневої стерилізації насіння.
2. Генетична трансформація бактерією *Agrobacterium rhizogenes*.
3. Аналіз ростових показників отриманих ліній культури «бородатих» коренів.

Предметом дослідження була культура «бородаті» корені рослини *Astragalus dasyanthus*.

Об'єктом дослідження був процес отримання культури «бородатих» коренів рослин *Astragalus dasyanthus*.

НУБіП України

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 5

ВСТУП 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 8

1.1. Ботанічна характеристика та опис культури астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus*) 8

1.2. Систематична характеристика астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus Pall.)* 10

1.3. Анатомічна будова культури *A. Dasyanthus* 12

1.4. Культура Astragalus dasyanthus in vitro 14

1.5. Характеристика та опис бактерії *Agrobacterium rhizogenes* 16

1.6. Культура бородатих коренів 25

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 31

2.1. Лабораторні методи 31

2.2. Підбір поживного середовища 34

2.3. Генетична трансформація *Astragalus dasyanthus* бактерією *Agrobacterium rhizogenes* 38

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ 42

3.1. Введення в культуру *in vitro Astragalus dasyanthus Pall.* методом поверхневої стерилізації насіння 42

3.2. Генетична трансформація бактерією *Agrobacterium rhizogenez* 44

3.3. Аналіз ростових показників отриманих ліній культури «бородатих» коренів 47

ВИСНОВКИ 49

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 51

НУБіП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

A.rhizogenes - Agrobacterium rhizogenes

A. dasyanthus - Astragalus dasyanthus

РРР - регулятори росту рослин

БАП - 6- бензиламінопурин

Кін - кінетин

MS - Murashige and Skoog (Мурасіге і Скуга)

Т-ДНК - Дезоксирибонуклеїнова кислота плазміди Ti/Ri

БК – «бородаті» корені

НУБіП України

ВСТУП

Актуальність. *Astragalus dasyanthus* – трав'янистий багаторічник, що належить до родини *Fabaceae* (бобових), лікарська рослина, що занесена в Червону книгу України. Препарати з даної рослини виявляють седативну, гіпотензивну та кардіологічну дію. Вони поліпшують функціональну діяльність печінки, позитивно впливають на процес згортання крові. На даний момент Україна є недостатньо забезпечена лікарською рослинною сировиною. Однією з причин є низька насіннєва продуктивність культури.

Іншою причиною є те, що велика кількість цієї рослини вирощувалась в Криму, а зараз, в зв'язку з геополітичним становищем, ця сировинна база недоступна тимчасово для нас, тому є сенс розробляти технології отримання альтернативної сировини на основі "бородатих" коренів.

Структура та обсяг дипломної роботи. Дипломна робота складається зі вступу, 3-х розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає 31 найменування. Робота викладена на 51 сторінці машинописного тексту. Фактичний матеріал дипломної роботи подано у вигляді 41 рисунка та 5 таблиць.

Об’єкт дослідження – процес отримання культури «бородатих» коренів рослин *Astragalus dasyanthus.*

Предмет дослідження – культура «бородаті» корені рослини *Astragalus dasyanthus.*

Мета дослідження – отримати культуру «бородатих» коренів рослини *Astragalus dasyanthus* шляхом генетичної трансформації бактерією *Agrobacterium rhizogenes.*

Завдання дослідження:

4. Введення в культуру *in vitro Astragalus dasyanthus* методом поверхневої стерилізації насіння.

НУБіП України

5. Генетична трансформація бактерією *Agrobacterium rhizogenes*.
6. Аналіз ростових показників отриманих ліній культури «бородатих» коренів.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ботанічна характеристика та опис культури астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus*)

Астрагал (волохатоцвітий) шерстистоквітковий, *Astragalus dasyanthus* волохато опушена, багаторічна трав'яниста рослина з родини бобових (*Fabaceae*). Зникаюча рослина, занесена до Червоної книги України.[23] Рід *Astragalus* нараховує понад 3000 видів, переважна більшість з них поширені в Передній і Середній Азії, приблизно 500 видів в Новому Світі: від Еквадору до півдня Південної Америки та від Канади до Гондурасу; в Україні поширено приблизно 40 видів.[28], [13].

Біологічна класифікація: домен – Ядерні; царство – Рослини; відділ – Покритонасінні; клас – Евдикоти; підклас – Розиди; порядок - Бобовоцвіті; родина - Бобові; рід - Астрагал; вид – Астрагал Шерстистоквітковий (*Astragalus dasyanthus*); Біноміальна назва – *Astragalus A. dasyanthus Pall.*

Багаторічна трав'яниста рослина родини бобових. Відноситься до життєвої форми кущиків, що утворюють каудекс (багатоглавий стеблокорінь). Має довге волохате опушення. Стебла прямі або висхідні, 10—35 см заввишки, з добре розвинутими міжвузлями. Листки чергові, непарноперисті, з 13—18 парами видовжено яйцевидної, овальної або довгасто-овальної форми листочків, завдовжки 8-20 мм. [25]

Прилистки ланцетоподібні, загострені. Квітки зигоморфні, блідо-жовті, в густих головчастих китицях 3-6 см завдовжки з 6-20 квітками на верхівках довгих квітконосів. Всі частини астрагалу, за винятком внутрішньої сторони вінчика, вкриті довгими жовто-білими волосками. Плід — волохатий біб, 10-12 мм завдовжки. Цвіте у червні-серпні. Плодоносить у липні-серпні.[22] (рис. 1.1).

НУБіП України

Рис. 1.1 Астрагал шерстистоквітковий

Біологічно активні речовини, що містяться в астрагал, забезпечують широкий спектр фармакологічних ефектів. У траві астрагалу шерстистоквіткового виявлені тритерпенові глікозиди (дазіантозиди), флавоноїди (кемпферод, кверцетин, ізорамнетин та астрагалозід) (рис. 1.2), дубильні речовини, кумарини та оксикумарини, амінокислоти, вітаміни, токоферола преимуществ. Астрагал відноситься до рослин, що накопичують селен. У траві знайдено до 1,5 мг% селену. У рослині містяться різноманітні макро- та мікроелементи (кальцій, кремній, алюміній, залізо, магній, кобальт, цинк, мідь, марганець, молібден, хром). [7]

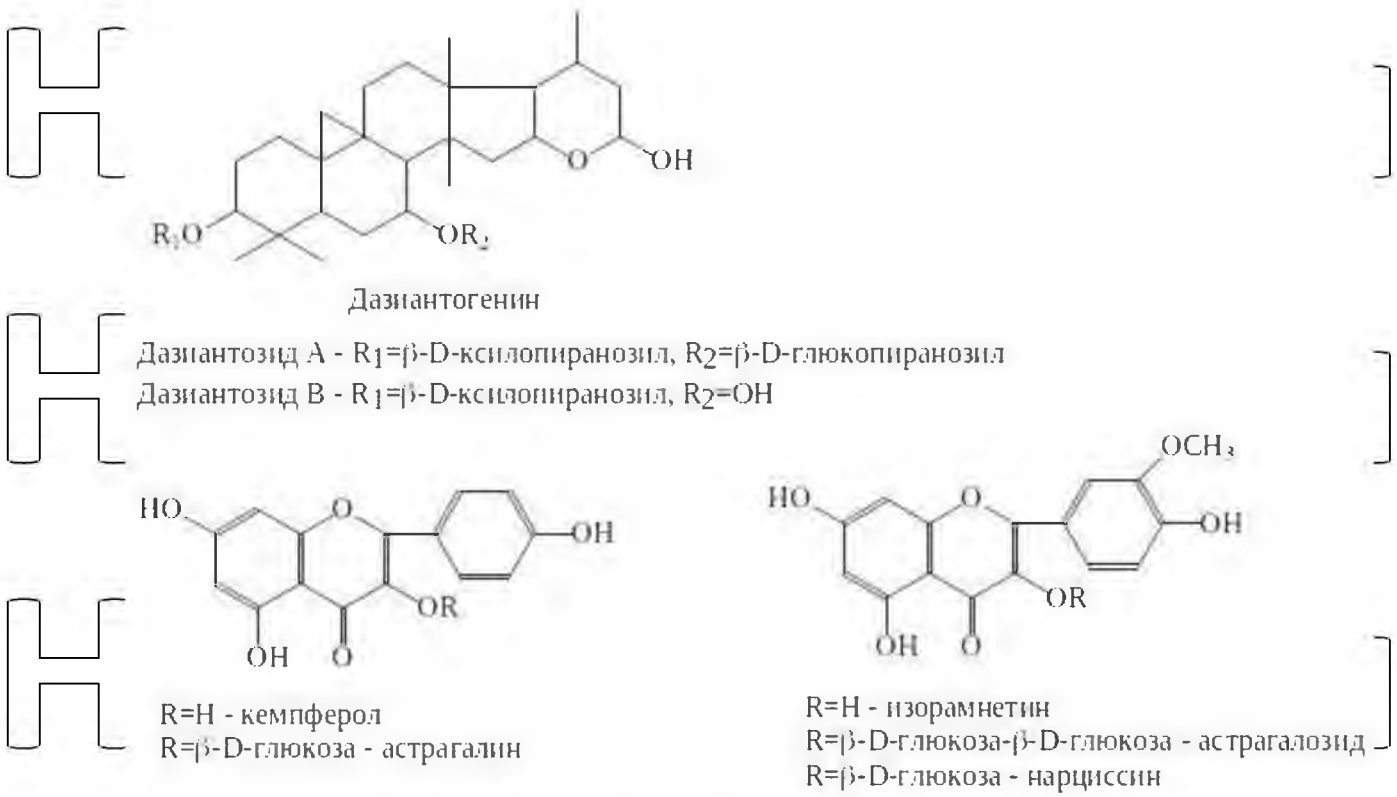

Рис. 1.2. БАР (біологічно активні речовини) астрагалу

1.2. Систематична характеристика астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus Pall.*)

Астрагал (*Astragalus*) – це рід покритонасінних, дводольних рослин сімейства бобових (*Fabaceae*). Рід нараховує понад 3000 видів. Астрагал шерстистоквітковий (*Astragalus dasyanthus Pall.*), також відомий під назвами «Астрагал волохатоцвітий» - вид астрагалу, який цінується за свої лікарські властивості, і використовується у фармацевтичній, медичній, біотехнологічній та у декоративних галузях.[30]

Рослини родини бобових (*Fabaceae*) – це однорічні та багаторічні рослини, ліани, дерева, кущі та напівкущі, об'єднані в 500 родів і 17100 видів. До відомих представників цієї родини відносяться наступні рослини: квасоля, горох, боби, сочевиця, конюшина, люцерна та інші.

НУБіП України

Табл. 1.1.

Таксономія астрагалу шерстистоквіткового

Домен:	Еукаріоти *Eukaryota*
Царство:	Рослини *Plantae*
Відділ:	Судинні рослини *Tracheophyta*
Надклас:	Покритонасінні *Angiosperms*
Клас:	Евдикоти *Eudicots*
Порядок:	Бобовоцвіті *Fabales*
Родина:	Бобові *Fabaceae*
Рід:	Астрагал *Astragalus*
Вид:	Астрагал Шерстистоквітковий *Astragalus dasyanthus*

Порядок бобовоцвіті (*Fabales*) – порядок квіткових рослин, по традиційній класифікації включав в себе лише родину бобових (*Fabaceae*), відповідно до сучасної класифікації належить до підкласу розидів (*rosids*) та включає в себе

НУБіП України

чотири родини: бобові (*Fabaceae*), китяткові (*Polygalaceae*), квілайя (*Quillajaceae*), сурианові (*Surianaceae*). [19],[11]

НУБіП України

1.3. Анатомічна будова культури *A. Dasyanthus*

Стебло на поперечному зрізі округло-ребристе, не пучкового типу, в якому знаходиться велика кількість судинно-волокнистих пучків. (рис. 1.3а, б) Клітини епідермісу стебла прозенхімної форми з прямими або скошеними кінцевими клітинами, продизи аномоцитного типу. Зустрічаються прості двоклітинні товстостінні волоски з короткою базальною клітиною, яка часто містить пігмент, і довгою кінцевою (термінальною) клітиною з крупнобугорчастою поверхнею. Біля стебла в місці прикріплення простих волосків зустрічаються клітини епідермісу, які утворюють розетку. Серцевинна порожнина в стеблі займає велику ділянку.

Рис. 1.3а, б Стебло на поперечному зрізі

Епідерміс є покривною тканиною стебла, його клітини різні за формою і величиною. Епідерміс містить велику кількість тонкостінних і товстостінних триклітинних повітряних волосків. (рис. 1.4а) На епідермісі стебла, крім волосків, зустрічаються також продихи. (рис. 1.4б) Під епідермісом виступає хлорофілоносна паренхіма кори, її клітини різної величини, стінки цих клітин потовщені.

Рис. 1.4а Фрагмент епідермісу стебла з повітряними волосками

Рис. 1.4б Епідеміс стебла (в – триклітинні волоски, п – продихи)

В листі з поверхні видно клітини верхнього епідермісу з звивистими стінками та більш звивистостенні клітини нижнього епідермісу. Продихи аномоцитного типу розташовані з обох сторін листа. Клітини епідермісу по жилці прозенхімної форми зі звивистими стінками. На листі, квітковій стрілці та чашці присутні прості волоски різних розмірів того ж типу, що і на стеблі. Часто на поверхні листа зустрічаються розетки без волосків.(рис. 5а, б, в, г)

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

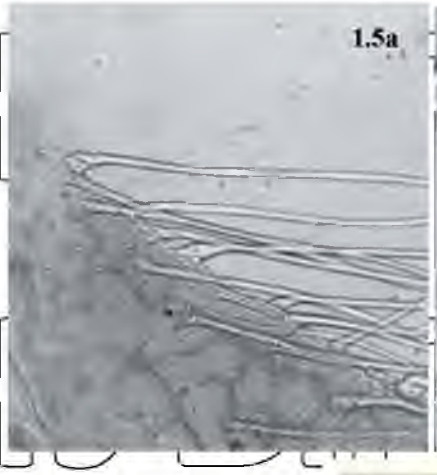

Рис. 1.5а фрагмент краю листа з простими довгими волосками

Рис. 1.5б фрагмент епідермісу по жилці листа із фрагментами простих триклітинні волосків

Рис. 1.5в поперечний зріз рахісу складного листа

Рис. 1.5г Поперечний розріз листка (в - повітряні волоски, ев – верхній епідерміс, п – палісадна тканина, гм – губчатий м'якуш, во- групи волокон, ко – коленхімподібна паренхіма, ен – нижній епідерміс, п′ - нижній ряд палісадної тканини)

1.4. Культура Astragalus dasyanthus in vitro

Мікророзмноження рослин *in vitro* дозволяє отримати безвірусні однорідні зразки. Успіх мікроклонального розмноження залежить від середовища культивування, живильного середовища, його концентрації, генотипу та фізіологічного стану донора, комбінації регуляторів росту рослин, також від

відповідного вибору експлантату. Найкраще використовувати матеріал, отриманий зі здорових (неінфікованих) міцних рослин з оптимальними умовами вирощування. Розмір експлантату залежить від виду біологічного матеріалу і коливається в межах від 0,1 мм до 10 мм. Мікророзмноження можливо виконати за трьох типів експлантів: кінчиків пагонів або вузлів, кінчиків меристем та плоди (насіння). Початок культивування астрагалу in vitro включає поверхневу стерилізацію початкових експлантів. Стерилізація спочатку етиловим спиртом (70%), а потім в білизні (гіпохлорит натрія), зазвичай, така стерилізація ефективна для більшості видів астрагалу, який планують вводити в *in vitro*.

Живильне середовище MS (Мурасіге і Скуга, 1962) широко застосовується для культивування in vitro *A.d.*, також можливо вирощувати на середовищі МЗ + БАП (бензиламінопурин)(рис. 1.6), з вмістом БАПу від 0,1 мл/л до 1 мл/л середовища. (рис. 1.7). До того ж, астрагал добре росте на середовищі ½ MS зі зниженим вдвічі вмістом макроелементів; MS з кінетином. Деякі дослідники віддають перевагу середовищам Гамборга (B5).

Рис. 1.6 Введена культура *Astragalus dasyanthus* в *in vitro* на середовищі MS+БАП

НУБіП України

Рис. 1.7 Утворення бічних пагонів культури *A.t.* в умовах *in vitro*

1.5. Характеристика та опис бактерії *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes, також зустрічається назва *Rhizobium rhizogenes*, являє собою грамнегативну грунтову бактерію, що викликає хворобу бородатих коренів у однодольних та дводольних рослин (рис. 1.8) *A. rhizogenes* індукує утворення проліферативних багаторозгалужених придаткових коренів у місці зараження, так званих «бородатих коренів». *Agrobacterium rhizogenes* є природним генним інженером рослин. Було досягнуто успіху у вивченні молекулярних механізмів перенесення ДНК (Т-ДНК), взаємодії з білками рослин-господарів, захисної сигналізації рослин та інтеграції в геном рослин для успішної генетичної трансформації рослин. Т-ДНК і відповідна експресія генів тої змінюють морфологію та вторинний метаболізм рослини-господаря. Під час трансформації відбувається диференціальна втрата кількох генів Т-ДНК. Втрата кількох відкритих рамок зчитувань різко впливає на ріст і морфологічні моделі бородатих коренів, модель експресії генів біосинтетичного шляху та накопичення специфічних вторинних метаболітів. (табл. 1.2.)

Рис. 1.8 *Agrobacterium rhizogenes* [31]

Таблиця 1.2

Продукція вторинного метаболіту в трансформованих коренях

Види рослин	**Штам A. rhizogenes, використаний для трансформації**	**Вторинний метаболіт**
Aconitum heterophyllum	LBA 9402, LBA 9360, A4	Гетеразин, атизин, гетидин
Agastache rugosa	R1000	Розмаринова кислота
Ajuga multiflora	A4	20-гідроксіекдизон
Ambrosia maritima	ATCC15834	Тіарубрин А, тіарубрин А епоксид, тіарубрин А діол
Ammi majus	A4, LBA9402	Умбеліферон
Artemisia annua	–	Артемізинін

Таблиця 2.1. (продовження)

A. dubia, A. indica	LBA 9402 і 8196	Артемізинін
Astragalus mongholicus	LBA 9402, ATCC 15834, R 1601 і TR 105	Астрагалозид I, астрагалозид II, астрагалозид III
Atropa acuminata	LBA 9402	Атропін, скополамін
Atropa belladonna	15834	Атропін, скополамін
Atropa belladonna	MAFF 03-01724, ATCC 15834	Гіосціамін, 6b-гідроксигіосціамін, скополамін
Atropa belladonna	AR15834	Скополамін, гіосціамін
Azadirachta indica	LBA 9402	Азадірахтин, німбін, саланін, 3-ацетил-1-тиглоілазадірахтинін, 3-тіглоілазадірахтол
Brugmansia candida	LBA 9402	Скополамін, гіосціамін
Brugmansia candida	LBA 9402	Кадаверин, путресцин, спермідин, спермін
Brugmansia suaveolens	15834, TR 105	Тропін, псевдотропін, скополін, скопіна, апоскополамін, гіосціамін
Calystegia sepium	15834	Калістегін

НУБіП України

Таблиця 1.2. (продовження)

Camptotheca acuminata	ATCC 15834, R-1000	Камптотецин, 10-гідроксикамптотецин
Catharanthus roseus	15834, A2, A2-83, A47-83, R1000	йохімбін, аймаліцин, тетрагідроальстонін, таберсонін, горхаммерицин, лохнерицин, веналстонін, віндолінін, 19-епі-віндолінін, катарантин, перикалін, О-ацетилваллезамін
	15834	Катарантузонімаранозид А, катарантусопімаранозид В
	R1000	Вінкристин, вінбластин
C. roseus var. Prabal	A4	Серпентин, аймаліцин
Centaurium erythraea, *C. pulchellum*	A4M70GUS	Ксантон
Cephaelis ipecacuanha	ATCC 15834	Цефаелін, еметин
Cichorium intybus	LMG 150	Ескулін, ескулетин
Cinchona ledgerina	LBA 9402	Хінін, цинхонідин, хінідин, хінамін

Таблиця 1.2. (продовження)

Cinchona officinalis	LBA 9402	Триптамін, стриктозидин, хінідин, хінін, цинхонін, цинхонідин
Coleus blumei	A4	Розмаринова кислота
Coleus forskohlii	MAFF 03-01724	Розмаринова кислота
Datura stramonium	LBA 9402	Гіосциамін, апогіосціамін
	1855, AR-10, TR-105, ATCC15834, A4, A41027, ATCC13333	Гіосціамін, скополамін
	ATCC 15834	Гігрін, тропінон, апоатропін
Duboisia leichhardtii	15834, A4	Скополамін
Glycyrrhiza glabra	LBR56	Глициризинова кислота
Glycyrrhiza pallidiflora	pR1 15834	Лікоагроізофлавон, лікоагрозид С, калікозин, еритринін, ізолівіритигенін, ехінатин, маакіаїн, трифоліризин, ононін
Glycyrrhiza uralensis	ACCC 10060	Глициризин

НУБіП України

Таблиця 1.2. (продовження)

Gmelina arborea	ATCC 15834	Вербаскозид
Gynostemma pentaphyllum	ATCC 15834	Гіпенозід
Harpagophytum procumbens	ATCC 15834	Гарпагозид, галова кислота
	A4	Гарпагозид, вербаскозид, ізовербаскозид
Hyoscyamus albus	LBA9402, A4	Атропін
Hyoscyamus muticus	LBA9402, A4	Скополамін, гіосціамін
Linum tauricum ssp. *tauricum*	TR 105, ATCC 15834	4-деметил-6-метоксиподофілотоксин,6-метоксиподофілотоксин
Nicotiana tabacum cv. Xanthi	LBA9402, LBA9402 pLAL21	Гіосціамін, скополамін, нікотин, норнікотин, анабазин, анатабін, анаталін
Ocimum basilicum	ATCC 15834, MAFF 03-01724	Розмаринова кислота, літоспермінова кислота, літоспермінова кислота кислота Б
Ophiorriza pumila	15834	Розмаринова кислота

НУБіП України

Таблиця 1.2. (продовження)

Panax ginseng	A4	Гінзенозид
Papaver bracteatum	R15834	Морфін, носкапін, сангвінарин
Papaver somniferum var. *album*	LBA 9402	Морфін, кодеїн, сангвінарин
Picrorhiza kurroa	LBA 9402	куткозид, пікрозид I
Plantago lanceolata	LBA 9402	Вербаскозид, плантамозид
Plumbago indica	ATCC 15834	Пламбагін
Plumbago zeylanica	A4	Пламбагін
Przewalskia tangutica	A4	Гіосціамін, скополамін
Pueraria phaseoloides	ATCC 15834	пуерарин
Rauvolfia micrantha	ATCC 15834	Аймаліцин, аймалін
Ruta graveolens	LBA 9402	Пінарин, рутакультин, ксантотоксин,бергаптен, ізопімпенілін, остол, остенол, диктамнін, скімміанін, кокусагінін, рибалінін та ізомер рибалініну
Salvia broussonetti	ATCC-15834	Бруссонол, ігестол

НУБіП України

Таблиця 1.2. (продовження)

Salvia miltiorrhiza	ATCC-15834	Таншинони
Salvia sclarea	LBA 9402	Сальвіпізон, етіопінон, феругінол
Saussurea involucrata	LBA 9402, R1000, R1601	Сирінгін
Saussurea medusa	R1601	Ясеозидин
Scopolia parviflora	KCTC 2703	Скополамін, гіосціамін
Scutellaria baicalensis	A4	Байкалін, вогонозід, байкалеїн, вогонін
	ATCC 15834	Байкалін
	A4GUS	Байкалін, вогонін
Taxus x *media* var. *Hicksii*	LBA 9402	Паклітаксел, 10-деацетилбаккатин III
Tylophora indica	A4	Тилофорин
Valeriana wallichii	LBA 9402, A4	ізовалероксигідрокси дідровальтрат, дідровальтрат, ацевальтрат, гомодідровалтрат

НУБіП України

Вірулентні штами *Agrobacterium* містять плазміди, що індукують пухлини (Ti) або Ri плазмід. *A. rhizogenes* містить плазміду Ri, що володіє різними генними сегментами (рис. 1.9). Перенесена ДНК (Т-ДНК) називається Т-областю, якщо вона розташована на плазміді Ti або Ri. Під час інфікування *Agrobacterium* фрагмент ДНК переноситься від бактерії до клітини рослини (рис. 1.10). Цей фрагмент ДНК є копією сегмента під назвою Т-ДНК. Т-ДНК є частиною приблизно 200 п.н. плазміди Ti/Ri, присутньої в *Agrobacterium*, яка кодує функції для кон'югації плазміди Ti/Ri, синтезу і катаболізму опіну, а також ініціації, перенесення та інтеграції Т-ДНК. Т-області нативних плазмід Ti і Ri мають розмір приблизно 10-30 п.н.. Т-області визначаються прикордонними послідовностями Т-ДНК. Ці рамки мають довжину 25 п.н і мають високу гомологічну послідовність. Вони фланкують Т-область у прямо повторюваній орієнтації. [2], [3]

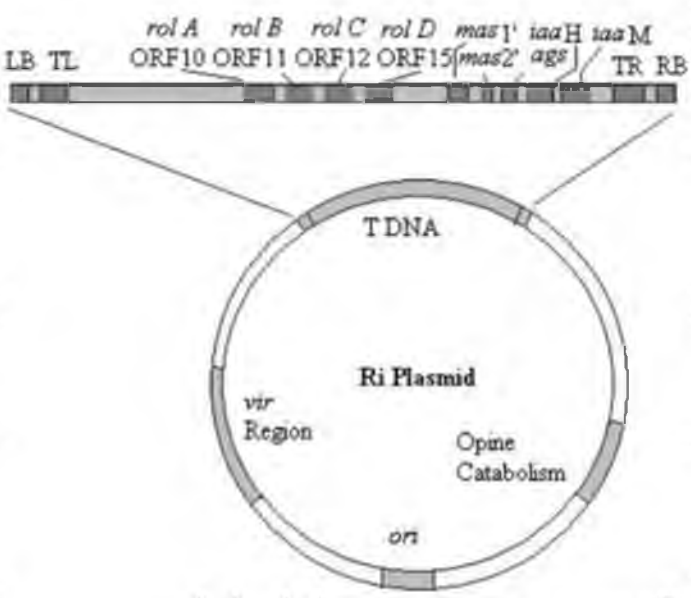

Рис. 1.9 Схематичне зображення Ri плазміди *A. Rhizogenes*

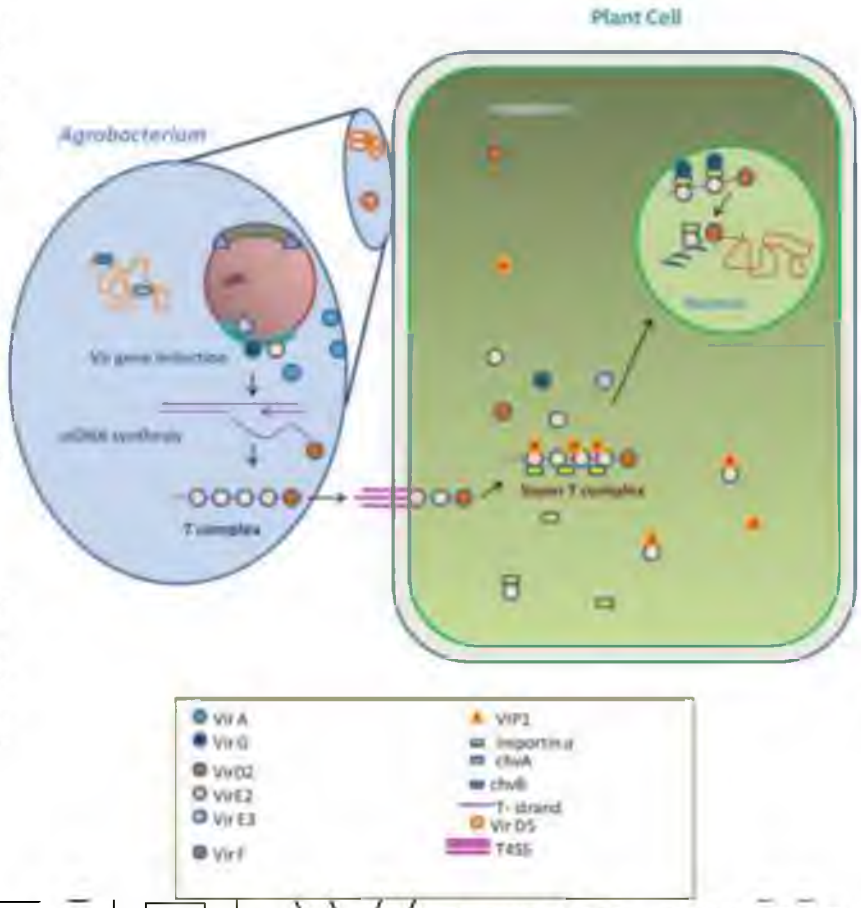

Рис. 1.10 Перенесення Т-ДНК на основі Ri плазміди Agrobacterium для генетичної трансформації рослин. Назви білків-ефекторів вірулентності та рослинних білків показано у рамці

Здатність *A. rhizogenes* інфікувати рослини зумовлена наявністю Ri-плазмід (індукують утворення «бородатих» коренів), які містять гени перенесу rol (rolA, rolB, rolC та rolD), несуть відповідальність за інтеграцію генетичного матеріалу в ДНК клітин господаря. Така система отримання цінних біоактивних сполук дуже зручна з ряду причин, а саме: «бородаті» корені не потребують регуляторів росту рослин (РРР), здатні до масштабного зростання, швидко ростуть і мають високу генетичну стійкість.

1.6. Культура бородатих коренів

Культура бородатих коренів є типом культури рослинної тканини , який використовується для вивчення метаболічних процесів рослин або для

виробництва цінних вторинних метаболітів або рекомбінантних білків, часто за допомогою генної інженерії рослин.[15]

Природна грунтова бактерія *Agrobacterium rhizogenes*, яка містить плазміди, що індукують розвиток коренів (так званими плазмідами Ri), може інфікувати коріння рослин і спонукати їх виробляти джерело їжу для бактерії і аномально рости. Бородаті корені особливо легко культивувати в поживному середовищі, оскільки гормони не потрібні, на відміну від додаткових коренів, вони неопластичні, з невизначеним ростом. Новоутворені корені, індуковані бактерією *A. rhizogenes*, мають високу швидкість росту (порівняно з нетрансформованими додатковими коренями), а також генетичну та біохімічну стабільність. [16]

Отже, *in vitro* «бородаті корені» мають ряд специфічних рис: інтенсивний гормононезалежний ріст, відсутність позитивного геотропізму, високий ступінь галуження. Найчастіше *A. rhizogenes* використовують для отримання трансгенних рослин класу дводольних, хоча нині визначено умови, за яких є можливість застосовувати цей вид бактерій для трансформування геному однодольних рослин [1].

Бородаті кореневі культури можна використовувати для фіторемедіації та особливо цінні для вивчення метаболічних процесів, залучених у фіторемедіації.

Подальші застосування включають детальні дослідження фундаментальних молекулярних, генетичних і біохімічних аспектів генетичної трансформації та індукції бородатих коренів.

Ri плазміди можна сконструювати так, щоб вони також містили Т-ДНК , яка використовується для генетичної трансформації (біотрансформації) рослинних клітин. Отримані генетично трансформовані кореневі культури можуть виробляти велику кількість вторинних метаболітів. [4], [14], [5]

Процедура, яка використовується для індукції бородатих коренів (рис. 1.11), включає культивування пошкоджених частин рослин (так звані експланти) із суспензіями *A. rhizogenes* в асептичних умовах. Пошкоджені рослинні експланти можна інфікувати штамами *Agrobacterium* або шляхом прямого посіву бактеріальними суспензіями та інкубації на твердому середовищі, або шляхом культивування в рідкому середовищі.

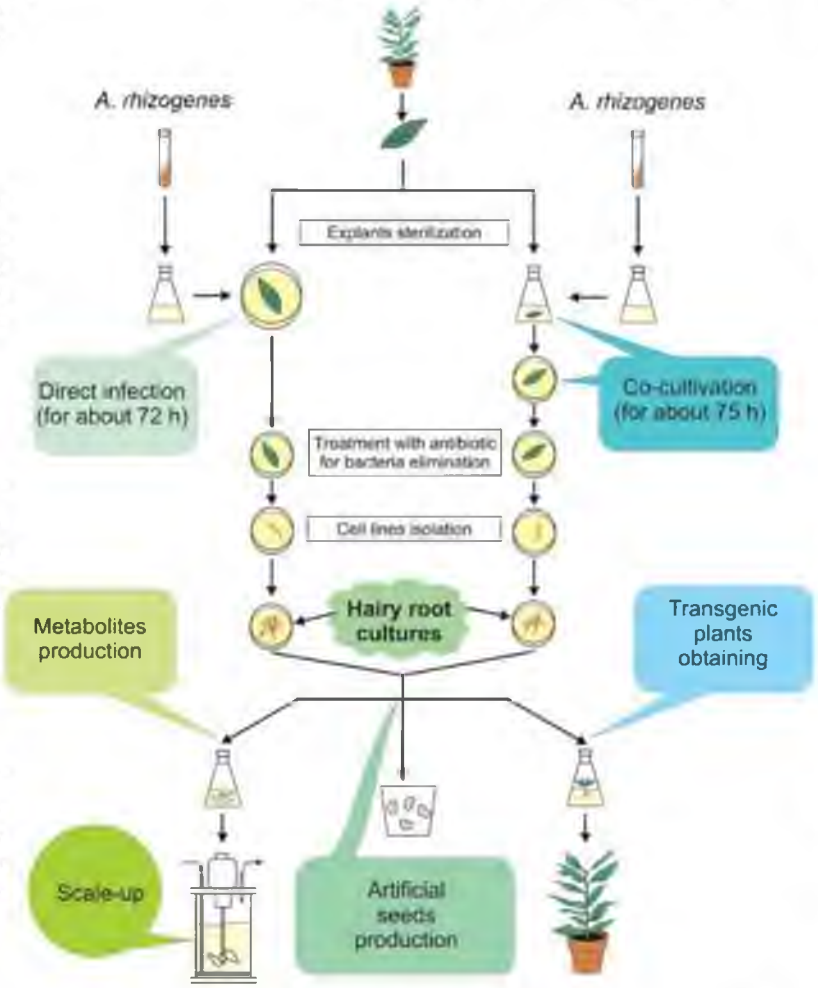

Рис. 1.11 Блок-схема для індукції культур бородатих коренів і деякі з їхніх застосувань

Культури бородатих коренів були створені на різноманітних видах астрагалів, і вони пропонують багато переваг перед звичайними системами культурами клітин, включаючи швидкий незалежний від ауксину ріст, генетичну стабільність і стабільне виробництво вторинних метаболітів на високому рівні

Бородаті корені були індуковані спільним культивуванням листя або стебел стерильних рослин із суспензією *Agrobacterium rhizogenes* для отримання трансформованих кореневих культур. Такі культури вирощували на середовищі MS без фітогормонів, що містило 2-6% (мас./об.) сахарози при 25°С у темряві. [8]

Результати фенотипічної відповіді від вставки в геном рослини Т-ДНК були різними. У деяких більш непокірних видів астрагалу успішна трансформація була досягнута за допомогою різноманітних штамів *Agrobacterium rhizogenes*, які виявляють різні особливості господаря. Однак різні штами бактерій показали різну здатність індукувати бородаті корені на листкових експлантатах того самого виду астрагалу.

Сприйнятливість видів *Astragalus* до індукції одним і тим же штамом *Agrobacterium* була дуже різною. Деякі види (*A. membranaceus, A. mongholicus, A. monspessulanus*) мають більші труднощі з закладенням трансформованих коренів. У деяких видів (*A. glycyphyllos, A. hamosus, A. boeticus*) рясність коренів з'являється безпосередньо на місці щеплення, але в інших (*A. englerianus, A. mongholicus*) спочатку утворюється калюс, а потім з'являються трансформовані корені. Залежно від виду та штамів *Agrobacterium*, велика кількість коренів з'являється протягом 1-4 тижнів.

Культури бородатих коренів з різних видів астрагалів, які швидко вирощувалися в простому середовищі без фітогормонів, були стабільними за швидкістю росту, виробництвом полісахаридів (рис. 1.12) і сапоніну (рис. 1.13) протягом більш тривалого періоду.

НУБіП України

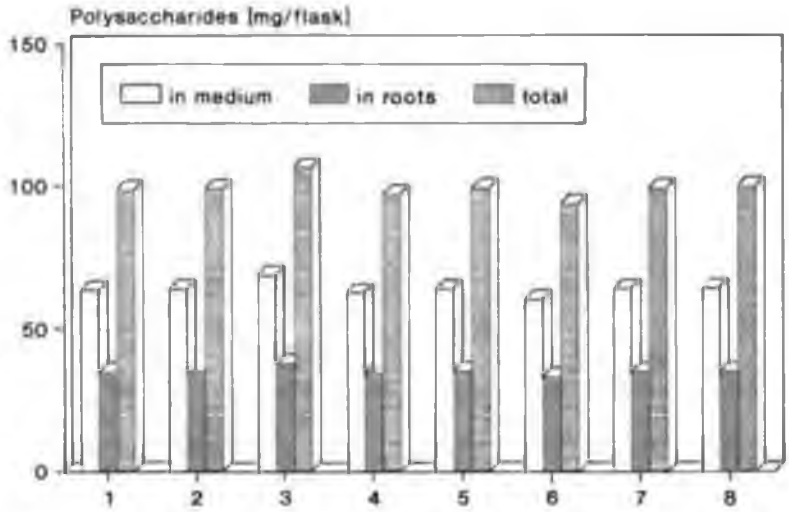

Рис. 1.12 Стабільність росту та виробництва полісахаридів у бородатих коренях *A. mongholicus*

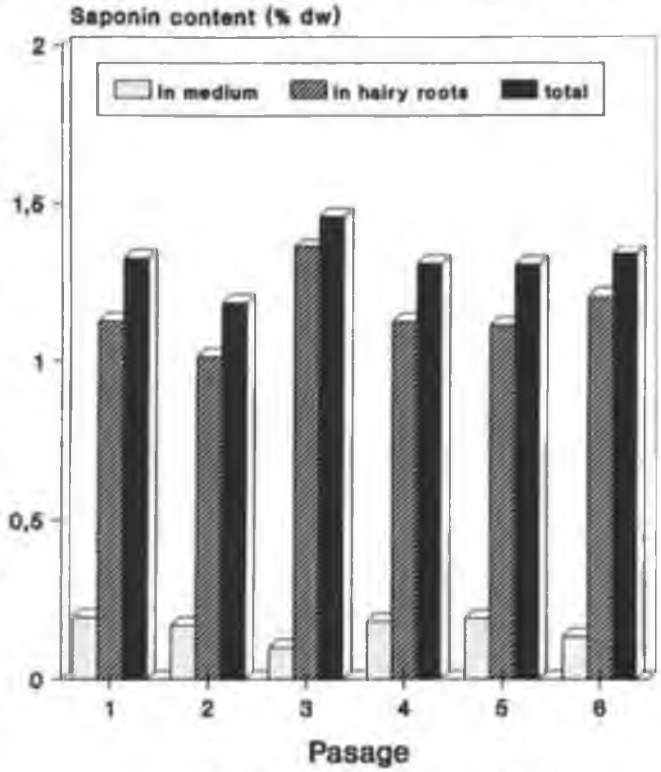

Рис. 1.13 Стабільність росту та виробництва сапоніну в бородатих коренях *A. membranaceus.*

БК *Astragalus spp.* мають велику кількість кореневих волосків, високий ступінь бічного розгалуження та відсутність гестропізму, що призводить до

високих темпів росту. Після короткої лаг-фази БК почали швидко зростати, а свіжа вага зросла в 35-40 разів для *A. mongholicus*, 14-15 разів для *A. gummifer*, 20-25 разів для *A. Membranaceus* за 30 днів.

На теперішній час «бородаті» корені отримали у більш, ніж 160 видів рослин 31 родини, у тому числі понад 100 лікарських рослин із 26 родин.[9] Так було отримано рослини цикорію стійкі до гербіцидів[10] та рослини цикорію з пригніченим цвітінням, а саме *Cichorium intybus L.* та *Daucus carota L.*.[17] Крім того, з таких лікарських рослин як Withania somnifera [12], Echinacea purpurea [18], Rauvolfia serpentina [29], Glycyrrhiza uralensis [20] тощо, було отримано культуру «бородатих» коренів. Добре відомо, що корені, які були отримані за допомогою бактерії *Agrobacterium rhizogenes*, накопичують запасні сполуки або вторинні метаболіти, специфічні для конкретної рослини[5], які можуть мати вищий рівень таких сполук у трансформованих коренях, відносно рослин дикого типу. У трансгенних коренях *Echinacea purpurea* концентрація полісахаридів була вищою, ніж у вихідних рослин.[27]

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використано технічне оснащення лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України та селекціонований штам бактерії *Agrobacterium rhizogenes A4,* який надано із Колекції ~~коріених ґрунтових~~ мікроорганізмів.

Згідно паспорту вищезазначеного штаму *A. rhizogenez* вона активно продукує бородаті корені рослини-господаря та культивується на поживному бульоні при 28°С.

2.1. Лабораторні методи

Для успішного проведення досліджень необхідне дотримання стерильних умов на всіх етапах лабораторної роботи: підготовка інструменту та обладнання, ламінарних боксів та операційної кімнати, підготовка дослідного рослинного матеріалу та приготування поживних середовищ.[21]

Стерилізація посуду та інструментів. Лабораторний посуд необхідно ретельно вимити перед стерилізацією. Культуральний посуд (колби, пробірки та чашки Петрі) та інструменти (ножиці, скальпель і пінцет), попередньо поміщені в бокси, стерилізувалися сухим жаром у сухожаровій шафі. (рис.2.1) Впродовж 2 годин, температура 150-170°С. Металеві інструменти не можна стерилізувати в автоклаві, тому що під дією насиченої пари вони швидко тупляться і іржавіють. Стерилізували інструменти в 70% етанолі й обпалювали у полум'ї спиртівки перед початком роботи в ламінарному боксі та перед кожною операцією.

НУБіП України

Рис.2.1 Сухожарова шафа

Стерилізація ламінарного боксу. Перед початком роботи обробляють ламінарний бокс ультрафіолетовим світлом протягом 2 годин. Це забезпечує стерильність робочої поверхні. Крім того, мікробіологічний фільтр, який завжди є в ламінарному боксі, забезпечує потік чистого, стерильного повітря всередину. Однак, стерилізація ламінар-боксу *Streamline Class II BSC – E Series* ультрафіолетовим світлом відбувається впродовж 30хв. (рис.2.2)

Рис.2.2 Ламінар-бокс *Streamline*

Агаризоване середовище та рідке поживне середовище стерилізують гарячою насиченою парою в автоклаві при 121° С протягом 40 хв під тиском 1 атм. Стерилізацію під тиском проводять у вертикальному автоклаві (YXQ-LB-75SII) (рис.2.3).

Рис.2.3 Вертикальний автоклав Boxun YXQ-LB-75SII

Рослинні матеріали стерилізують 70% етанолом, ртутними препаратами (сулема, фапосепт, діоцид), 1% бромною водою, розчинами що містять активний хлор («Білизна», 9% гіпохлорит натрію, 0,5-5% гіпохлорит натрію, хлорамін), антибіотики (якщо матеріал заражений бактеріями чи грибами), перекись водню з концентрацією від 5 до 20% та азотнокислим сріблом концентрацією 0,5-2%. [27]

Вищевказані речовини негативно впливають і на самі рослинні клітини, тому вид, концентрацію та час обробки стерилізуючими речовинами підбирають експериментально відповідно до типів експлантів і культур та їх фізіологічного стану. [26]

В якості експланту ми обрали насіння *Astragalus dasyanthus Pall.* для введення культури в *in vitro*. Для стерилізації насіння було обрано 70% етанол та

25% розчин комерційного препарату «Білизна» (діюча речовина гіпохлорит натрію).

Стерилізацію насіння проводили в декілька етапів:

1. Помістили насіння астрагалу в марлевий мішечок, так як його розміри не перевищували 3 мм, та помістили в 70% етанол на 1 хв.
2. Промили насіння астрагалу в стерильній дистильованій воді, протягом 5хв.
3. Перенесли експлант у хімічний стакан з 25% розчином комерційного препарату «Білизна» на 10 хвилин.
4. Насіння ретельно промивали в дистильованій воді тричі по 10 хвилин у кожній посудині.

2.2. Підбір поживного середовища

Середовище Мурасіге і Скуги (MS) вважається одним із найбільш універсальних середовищ для клітин більшості видів рослин. Залежно від складу, він може спричиняти утворення калюсу або індукувати морфогенез у багатьох дводольних рослин.

В залежності від типу експланту, виду рослини та мети використовуються різні модифікації середовища MS для культивування клітин, тканин та органів рослин.

Підготовлені стерильні експланти *A. dasyanthus* інокулювали на середовище MS (Мурасіге і Скуга) + БАП (бензиламінопурин). (табл. 2.1) Середовище MS є одним із найбільш поширених живильних середовищ і є оптимальним для вирощування *Astragalus dasyanthus* у культурі *in vitro*. (рис. 2.4а, б)

НУБіП України

Табл. 2.1 Склад поживного середовища MS + БАП

Компоненти	Кількість на 1л	Кількість на 0,5л
Макро MS	100 мл	50 мл
Мікро MS	1 мл	0,5 мл
Вітаміни MS	1 мл	0,5 мл
$CaCl_2 * 2H_2O$	100 мл	50 мл
Fe-хелат	5 мл	2,5 мл
Інозитол	0,1 г	0,05 г
Сахароза	30 г	15 г
БАП	1 мл	0,5 мл
Гліцин	1 мл	0,5 мл
Агар-агар	6,8 г	3,4 г
pH	5,7-5,8	

НУБіП України

Рис. 2.4а, б Введена культура *Astragalus dasyanthus* в *in vitro* на середовищі MS+БАП

Приготування поживного середовища складалося з наступних етапів:

1. Помістили мірний стакан на магнітний змішувач (рис. 2.5), додавши в нього 200 мл дистильованої води. Відміряли у мірному стаканчику 50 мл макро MS, відміряли самплером 0,5 мл мікро MS; також у мірному стаканчику 50 мл $CaCl_2 * 2H_2O$; 0,5 мл вітамінів MS; 2,5 мл Fe- хелату; 0,5 мл БАП.
2. Зважили 0,05 г інозитолу, 15 г сахарози на хімічних вагах (рис. 2.6). До стакану з іншими компонентами на магнітній мішалці додавали кожну з наважок.
3. Зважили 3,4 г агар-агару та пересипали у термостійку колбу. У колбу налили 200 мл дистильованої води і залишили на 15-20 хв для набухання.
4. Колбу з агар-агаром помістили в мікрохвильовку, доводити до повного розчинення агару, періодично помішуючи.
5. Розчинений агар додали до стакану з розчином на мішалці, середовище довели до необхідного об'єму дистильованою водою.
6. За допомогою pH-метра (рис. 2.7) виміряли pH розчину, використовуючи кислоту або луг отримали необхідне нам значення 5,7.

7. Приготоване живильне середовище розлили в пеніцилінові пробірки, щільно закривши фольгою і автоклавували при 121°С 40 хвилин, тиск 1 атмосфера.

НУБіП України

Рис. 2.5 Магнітний змішувач з підігрівом

Рис. 2.6 Хімічні ваги

Рис. 2.7 pH-метр

2.3. Генетична трансформація *Astragalus dasyanthus* бактерією *Agrobacterium rhizogenes*

Генетична трансформація – це модифікація клітини шляхом введення та подальшої експресії чужорідного генетичного матеріалу в клітині.

Отримання трансгенних коренів є перспективним рішенням для активації біосинтезу біологічно активних сполук. Використавши метод опосередкованої трансформації застосовуючи бактерію *Agrobacterium rhizogenez* штаму *A4*. Головними перевагами отримання трансгенних коренів є швидкий ріст і активація синтезу вторинних метаболітів.

Перший етап підготовки до трансформації складався з приготування поживного бульйону для того, щоб підготувати сток бактерії *Agrobacterium rhizogenez* штаму *A4*. Для цього ми зважили 3г поживного бульйону, змішали з 200 мл дистильованою водою. Склад поживного бульйону був наведено в таблиці 2.2. Розлили приблизно по 30 мл у баночки і простерилізували. Дали середовищу охолонути, щоб бактерія не загинула. Відмірили самплером 1 мл сток бактерії *Agrobacterium rhizogenez* штаму *A4* і додавали в поживний бульйон. Потім ставили в термостат (рис. 2.8) при 28°С на 2 доби. Після цього на певний час до трансформації поставили в холодильник.

Таблиця 2.2.

Склад поживного бульйону

КОМПОНЕНТ	**КІЛЬКІСТЬ**
Пептон ферментативний	10г/л
Натрію хлорид	4,5г/л
Дріжджовий екстракт	0,5г/л

НУБіП України

pH 7,2±0,2

Рис. 2.8 Термостат

Другим етапом підготовки до трансформація ми приготували 400 мл живильного середовища MS і простерил зували його. Умовно поділили його на 2 частини. Перші 200 мл середовища розлили по чашках Петрі. В наступні 200 мл середовища ми додали антибіотик Цефотаксим (Cefotaximum) концентрацією 600 мг/л, і також розлили по чашка Петрі.

Третім етапом була безпосередньо трансформація. В якості експлантів ми вирішили використовувати листя. Для цього ми взяли рослини астрагалу, відрізали від нього листя. На листі зробили обережні надрізи. (рис. 2.9а, б). Наступним кроком ми взяли стерильну чашку Петрі, відміряли самлером і налили в неї 5 мл бактерії *Agrobacterium rhizogenez* штаму *A4*, яку ми раніше сіяли на поживний бульйон (рис. 2.10). Додали в цю чашку Петрі листя астрагалу і поставили в термостат на 30хв при 28°С. Після цього почали висаджувати трансформовані експланти в чашки Петрі на поживне середовище MS, яке ми зробили раніше. Висаджували з відстанню між листочками приблизно 10 мм. (рис. 2.11а, б)

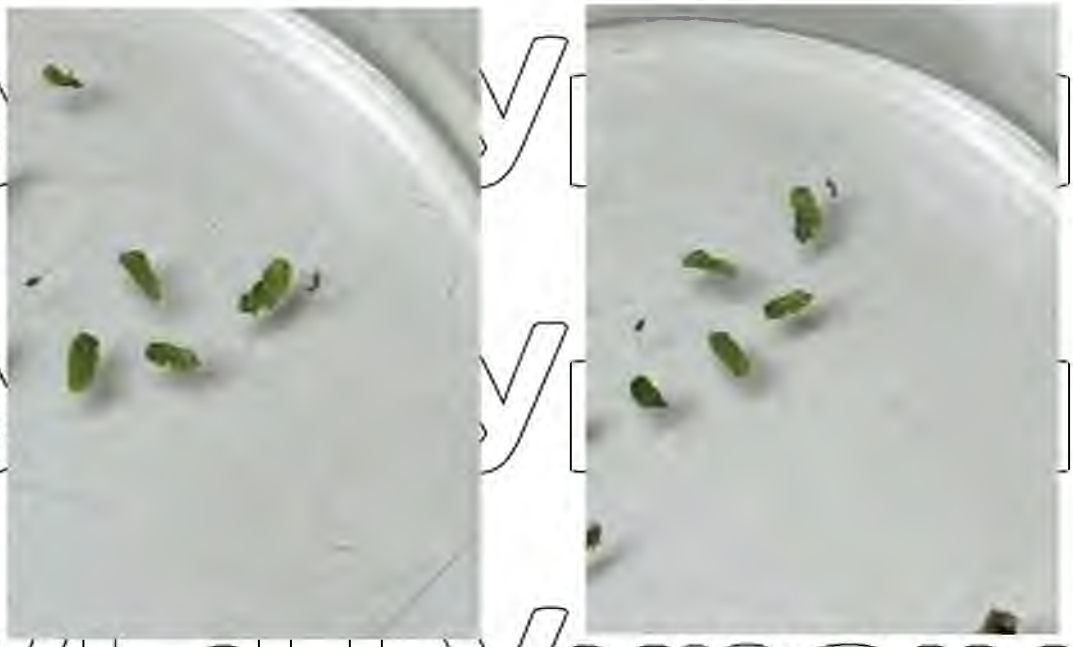

Рис. 2.9а, б надрізи на листі перед трансформацією

Рис. 2.10 *Agrobacterium rhizogenez* штаму *A4* у поживному бульйоні

НУБіП України

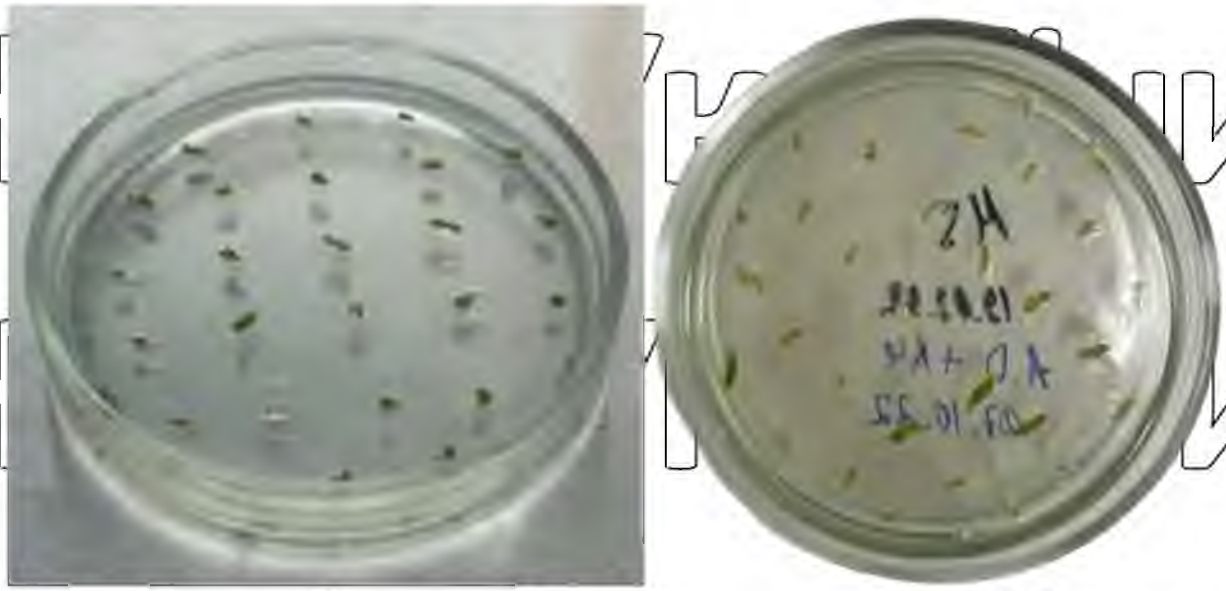

Рис. 2.11 Трансформовані експланти на поживному середовищі MS

Четвертим і останнім етапом трансформації було пересаджування трансформованого матеріалу з середовища MS на поживне середовище MS+cf через три дні.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

6.1. Введення в культуру *in vitro Astragalus dasyanthus Pall.* методом поверхневої стерилізації насіння

Для забезпечення успішного вирощування ізольованих частин рослин живильне середовище і рослинний матеріал повинні бути стерильними. При цьому використовуються засоби стерилізації, які не проникають крізь рослинний матеріал. Їх можна видалити за допомогою простого процесу промивання водою. В якості експлантів нами було обрано насіння астрагалу. Враховуючи, що в навколишньому середовищі велика кількість мікроорганізмів, грибів, їх спор і т.д., ми стерилізували протягом однієї хвилини в 70% етанолі, потім промивали насіння астрагалу в стерильній дистильованій воді протягом 5 хв, наступним кроком ми перенесли експлант у хімічний стакан з 25% розчином препарату «Білизна» (діюча речовина гіпохлорит натрію) на 10 хвилин. Останнім кроком промивали в дистильованій воді тричі по 10 хвилин у кожній посудині.

Розрахунки ефективності стерилізації насіння:

1. Розрахунок відсотка життєздатного незараженого експланту.

100% = 50 посаджених насінин

X = 4 заражених експлантів

X = 4*100/50 = 8%

2. Розрахунок відсотка експлантів, які загинули

100% = 50 посаджених насінин

X = 11 заражених експлантів

X = 11*100/50 = 22%

3. Розрахунок життєздатного, знезараженого насіння, що відповідає ефективності стерилізації:

100% - 8% - 22% = 70%

НУБіП України

НУБіП України

Таблиця 3.1

Результати стерилізації експлантів

Схема стерилізації	Життєздатні, незаражені експланти, %	Експлантів заражено, %	Експлантів загнило, %
70% етанол (1хв), «Білизна» (10 хв)	70	8	22

Простерилізовані експланти *Astragalus dasyanthus* були посаджені *in vitro* на модифіковане середовище MS з БАПом. Загалом простерилізовано і висаджено було 50 насінин, висаджували по 2-3 насінини в пеніцилінки (рис. 3.1.)

Рис. 3.1. Простерилізовані експланти посаджені на модифіковане поживне середовище MS з БАПом

Пересаджені експланти астрагалу показали гарний розвиток на різних модифікація середовища MS: MS з 0,25К, 1К (кінетин) (рис. 3.2.а), ½ MS (рис. 3.2. б), MS + 0,5 БАП (рис. 3.2. в)

Рис. 3.2. А – MS з кінетином; Б – середовище MS з меншою вдвічі концентрацією макроелементів; В – MS з БАП.

3.2. Генетична трансформація бактерією *Agrobacterium rhizogenz*

Бактерія *Agrobacterium rhizogenes* штам *A-4* зберігалася в колекції корисних грунтових мікроорганізмів навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії.

Бактерію *A. rhizogenes* розмножували на живильному середовищі поживного бульйону. При макроскопічному дослідженні (неозброєним оком) ми характеризували помутніння середовища як слабке. Зростання бактерії в поживному бульйоні займало частину поверхні середовища, не доходячи до стінок. Плівка була білуватого кольору, тонкої товщини, гладким характером поверхні плівки, ослизлої консистенції. Бактерія також в деяких випадках утворювала осад, він був незначний. За кольором осад також був білуватий. При струшуванні осад утворював рівномірне помутніння середовища. (рис. 3.3.)

Рис. 3.3. *Agrobacterium rhizogenes A4*

Культуру трансгенних «бородатих» коренів отримали за допомогою опосередкованої трансформації агробактерією штамом *Agrobacterium rhizogenez A4*. В якості експлантів використовувалися листя попередньо вирощеної нами, асептичної культури астрагалу шерстистоквіткового. Для кращого проникнення бактерій були зроблені насічки на експлантах. Кокультивували експланти з суспензією бакерії в чашках Петрі впродовж 30хв в термостаті при 28°С, після цього експланти переносили на середовище MS. Після культивування на живильному середовищі MS впродовж 2 діб, експланти були перенесені на середовище MS з антибіотиком цефотаксимом, концентрація якого була 600 мг/л, для усунення бактерії.

Через певний проміжок часу експланти почали змінювати колір, ставати більш темніщими. (рис.3.4. а, б). Ми отримали результати трансформації лише через 30-45 днів після проведення трансформації. Бородаті корені почали утворюватися у місцях насічок (поранень) експлантів. (рис.3.5.) Спостерігався досить низький відсоток траснформованих експлантів, що становив 4-7%.

Рис. 3.4. а – одразу після перенесення експлантів на поживне середовище; б – через певний час після перенесення на поживне середовище.

Рис. 3.5. Утворення «бородатих» коренів в місцях поранення експланту

Хоча відсоток утворень коренів на екплантах і був низьким, проте корені, які утворилися мали низку переваг для виділення БАР, а саме: росли на безгормональному живильному середовищі, мали від'ємний геотропізм та значне галуження. Частоту трансформації розраховували як відношення кількості експлантів, на яких відбулася трансформація, тобто утворилися корені, до загальної кількості експлантів. Одержані корені надалі вирощували на

агаризованому безгормональному живильному середовищі MS *in vitro* при температурі 26±2°С.

3.3. Аналіз ростових показників отриманих ліній культури «бородатих» коренів

Для визначення збільшення (приросту) біомаси корені однакового розміру приблизно 10±2 мм в довжину) асептично зважували, помішали на середовище MS і культивували в умовах *in vitro* впродовж 14 днів. Корені після цього знову зважували. Приріст біомаси (К) визначається за формулою: $K=w_1-w_0/t_1-t_0$, де w_1, w_0 – кінцева та початкова маса (г) за період t_1-t_0 (доба).

Для *Agrobacterium rhizogenes* опосередкованої трансформації ми використовували експланти листя астрагалу. На 30 добу культивування на агаризованому середовищі MS без додавання регуляторів росту ми спостерігали у місцях поранення експлантів формування коренів типового фенотипу. Частота одержання «бородатих» коренів становила 6,8%. При використанні бактерії *A. rhizogenes* штаму А4 було отримано 4 лінії БК астрагалу, які мали від'ємний геотропізм, значне галуження та росли на поживному середовищі без регуляторів росту. (рис. 3.6.)

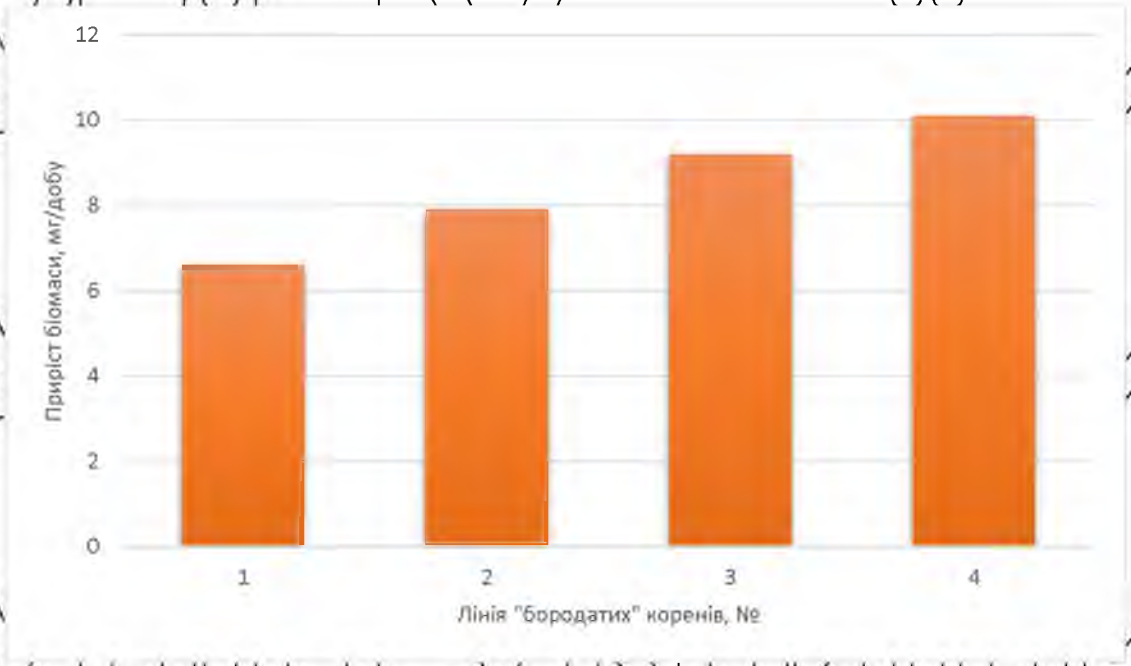

Рис. 3.6. Приріст біомаси

Важливо відзначити, що одержані лінії «бородатих» коренів досить швидко накопичували біомасу. Швидкість накопичення біомаси становила 6,6±0,1 – 10,1±0,3 мг/добу в залежності від лінії. (рис. 3.6.).

Отже, за допомогою агробактерії *A. rhizogenes* можливо отримати культуру «бородатих» коренів *A. dasyanthus* з частотою 6,8% і більше. Наприклад, для підвищення частоти перетворення можна додавати 10 мкм ацетилсирингону в середовище, в якому суспендовані бактерії. Додавання до середовища кокультивування ацетилсирингону змінило частоту трансформації та призвело до значного збільшення кількості подій трансформації. Це сполука, що утворюється під час реакції рослини у відповідь на поранення та активує гени *vir Agrobacterium,* сприяючи перенесенню Т-ДНК плазміди.[6] Результати показують, що ацетилсирингон також можна використовувати для підвищення частлти трансформації, опосередкованої *Agrobacterium,* у видів *Astragalus.* Показники частоти трансформації при використанні ацетилсирингону можуть сягати 90%. [7] Крім того, такі корені характеризуються досить швидким накопиченням біомаси, що робить їх достатньо перспективною сировиною для отримання біологічно активних сполук.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

ВИСНОВКИ

1. На основі опрацьованих літературних джерел проаналізовано біологічні та морфологічні особливості культури *Astragalus dasyanthus*; дано характеристику, опис та принцип дії бактерії *Agrobacterium rhizogenes*; визначено умови для успішної генетичної трансформації та отримання культури бородатих коренів.

2. Експериментально визначено, що рослини Астрагалу шерстистоквіткового успішно культивуються в умовах *in vitro*. В якості вихідного матеріалу доцільно використовувати насіння, попередня скарифікація насіння не є обов'язковою.

3. Показано, що поверхнева стерилізація насіннєвого матеріалу з використанням комерційного препарату «Білизна» (діюча речовина гіпохлорит натрію) в концентрації 25% дозволяє отримати асептичні рослини з ефективністю 70%.

4. Виявлено, що для культивування *in vitro* астрагалу шерстистоквіткового оптимальним є використання живильного середовища Мурасіге і Скуга, а також на його модифікації (додаванням цитокінінів (БАПу, кінетину) та зменшення вдвічі концентрації макроелементів).

5. Отримано життєздатні асептичні проростки *Astragalus dasyanthus* для подальшої його трансформації бактерією *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4).

6. Показано можливість отримання культури "бородатих" коренів рослин *Astragalus dasyanthus* шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації (штам А4).

7. Проведено аналіз ростових показників отриманих ліній культури «бородатих» коренів та виявлено, що швидкість накопичення біомаси отриманих коренів становила 6,6±0,1 – 10,1±0,3 мг/добу в залежності від лінії.

НУБіП України

Отже, рослини *Astragalus dasyanthus* є перспективною рослиною для культивування в умовах *in vitro* та утворення культури "бородатих" коренів як сировини для отримання цінних біологічно активних речовин.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Akutsu M., Ishizaki T., Sato H. Transforma tion of the monocot Alstroemeria by Agrobac, terium rhizogenes // Mol. Breed. — 2004. — V. 13, N 1. — P. 69–78.
2. Chandra, S. (2011). *Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: role of T-DNA in plant secondary metabolism. Biotechnology Letters, 34(3), 407–415.*
3. Gelvin S.B. Agrobacterium and plant genes involved in TDNA transfer and integration // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2000. — Vol. 51. — P. 223–256.
4. Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). *Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(6), 1175–1185.*
5. Giri, A., Lakshmi Narasu, M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotech. Adv. — 2000. — Vol. 18, № 1. — P. 1–22
6. Hohn, B., Koukolikova-Nicola, Z., Bakkern, G., and Grimsley, N. 1989. Agrobacterium-mediated gene transfer to monocots and dicots. Genome, 31 : 987-993
7. Ionkova, I. (1995). *Astragalus Species (Milk Vetch): In Vitro Culture and the Production of Saponins, Astragaline, and Other Biologically Active Compounds. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 97–138.*
8. Krasteva, I., Shkondrov, A., Ionkova, I., & Zdraveva, P. (2016). *Advances in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Bulgarian Astragalus species. Phytochemistry Reviews, 15(4), 567–590.*
9. Li Q., Wu Z., Wong M.L., Li S.J. The Ri-plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* and Its Application in Plant Science // Biotechnology. - 2002. - Vol. 5. - P. 21–25.
10. Limami M. A., Sun L.-Y., Douat C., Helgeson J., Tepfer Natural genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* annual flowering in two

biennials, belgian endive and carrot // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 118, № 2. – P. 543–550.

11. Manchester, Steven R.; Dilcher, David L.; Judd, Walter S.; Corder, Brandon; Basinger, James F. (1 June 2018). "Early Eudicot flower and fruit: Dakotanthus gen. nov. from the Cretaceous Dakota Formation of Kansas and Nebraska, USA"

12. Murthy H. N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Hahn E.J., Paek K.Y. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // J. Integr. Plant Biol. — 2008. — Vol. 50, № 8. — P. 975–981.

13. Plants of the World Online — Kew Science. https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:330028-2

14. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges in: S. Chandra et al. (eds.), Biotechnology for Medicinal Plants. — Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. — P. 29–68.

15. Sévon and Oksman (October 2002). "Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids". Planta Med. 68 (10): 859–68.

16. Shanks JV, Morgan J (April 1999). "Plant 'hairy root' culture". Curr. Opin. Biotechnol. 10 (2): 151–5.

17. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. *Agrobacterium* – mediated transfer of a mutant *Arabidopsis acetolactate* synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11, № 5-6 – P. 243-247.

18. Wang B., Zhang G., Zhu L. et al. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures // Coll. Surf. B Biointerfaces. — 2006. — Vol. 53, № 1. — P. 101–104.

НУБіП України

19. Watson, L.; Dallwitz, M.J. (9 August 2019). "The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval"
20. Zhang H. C., Liu J. M., Lu H. Y., Gao S. L. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the overexpression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment // Plant Cell Rep. — 2009. — Vol. 28, № 8. — P. 1205–1213.
21. ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ. : О.І. Юлевич, 2015.
22. Карпусь І. П. Морфолого-анатомічне дослідження астрагалу шерстистоквіткового (Astragalus dasyanthus Pall) родини Бобових (Leguminosae) / І. П. Карпусь // Фармацевтичний журнал. – 1962. – № 4. – С. 33–37.
23. КІР'ЯН В. М., ГЛУЩЕНКО Л. А., БОГУСЛАВСЬКИЙ Р. Л. ГЕНОФОНД РОСЛИН ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ, 2018
24. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. – Київ: Наукова думка, 1997. – 152 с.
25. Матус В.М., Шпак З.С., Носуля А.М. ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПЕРТИЗИ НА ВІДМІННІСТЬ, ОДНОРІДНІСТЬ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ ЛІКАРСЬКИХ ТА ЕФІРООЛІЙНИХ КУЛЬТУР, 2017
26. Методичні рекомендації. СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ, Т. М. Манушкіна, 2017
27. Навчальне видання Біотехнологія рослин. : КЛЯЧЕНКО ОКСАНА ЛЕОНІДІВНА, 2009
28. Словник українських наукових і народних назв судинних рослин / Ю. Кобів. — Київ : Наукова думка, 2004. — 800 с.
29. Шелудько Ю.В. Отримання та фітохімічний аналіз трансгенної кореневої культури *Rauvolfia serpentina* як джерела нових індольних алкалоїдів: дис. канд. біол. наук: 03.00.20 / НАН України; Інститут клітинної біології і генетичної інженерії. - К., 2004.

НУБіП України

30.[Електронний ресурс]. - Режим доступу: https://redbook-flora.land.kiev.ua/438.html

31. [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України