

НУБІП України

НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.07 – МКР. 216 «С». 2023.15.02. 1 ПЗ

НУБІП України

**ІВАНЮК КОСТЯНТИН ВІКТОРОВИЧ**

**2023 р.**

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

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

# НУБІП України

УДК 57.085.23

**ПОГОДЖЕНО** **ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Декан факультету Завідувача кафедри  
захисту рослин, біотехнологій та екобіотехнології та біорізноманіття  
екології

Коломієць Ю.В. Кваско О.Ю.  
« / » 2023 р. « / » 2023 р.

# НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
на тему «Клональне розмноження *in vitro* ароматичної лікарської трави *Ocimum basilicum* L. шляхом проліферації пазушних пагонів»

Спеціальність 162 «Біотехнологія 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 Лісовий М.М.  
д. с.-г. наук, професор (підпис) (ІПБ)  
(науковий ступінь та вчене звання)  
Керівник кваліфікаційної магістерської роботи Коломієць Ю.В.  
д. с.-г. наук, професор (підпис) (ІПБ)  
(науковий ступінь та вчене звання)

Виконав Іванюк К.В.  
(підпис) (ІПБ студента)  
КИВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

2023 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Іванюка Костянтина Вікторовича  
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія 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 «Клональне розмноження *in vitro* ароматичної лікарської трави *Ocimum basilicum* L. шляхом проліферації пазушних пагонів»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи регулятори росту, живильні середовища, рослини

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Індукція та проліферація пагонів *O. basilicum* L.
2. Укорінення і адаптація рослин-регенерантів *O. basilicum* L.
3. Індукція каллусу *O. basilicum* L.
4. Регенерація *in vitro* *Ocimum basilicum* L. сорту Пеновезе

Перелік графічного матеріалу:

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

## Реферат

Робота виконана на 46 сторінках, містить 3 розділи, 14 рисунків, 5 таблиць, 47 використаних джерел.

Мета роботи полягала оптимізації етапів мікроклонального розмноження *Ocimum basilicum* L. щодо морфогенезу та прямої регенерації рослин *in vitro*, що буде використовуватися для редагування CRISPR/Cas9.

Базилік запашний (*Ocimum basilicum* L.; Fam. Lamiaceae) – однорічна трав'яниста рослина високого господарського значення, яка використовується в народній медицині, фармакології та харчовому виробництві. В Італії більшість сортів використовують для виробництва знаменитого соусу «песто»; однак майже всі вони сприйнятливі до хвороби базилікової пероноспорозу (BDM), яка сильно знижує ріст свіжого листя та виживання всієї рослини. Сьогодні технологія CRISPR/Cas9 визнана видатним способом покращення генетичної селекції базиліка. У цій роботі ми представляємо оптимізований протокол для прямої регенерації *in vitro* елітного сорту, який є основним обмежуючим фактором для трансформації *O. basilicum*.

Регенерацію отримано з різних експлантів (листя, сім'ядолі, сім'ядольні вузли); найбільша частота отримана з сім'ядольних вузлів проростків, пророщених на середовищі MS, що містить TDZ. Цей протокол може бути використаний для біотехнологічних застосувань як техніка редагування геному для отримання клонів, стійких до хвороб базилікового пероноспорозу.

Вузли та листя використовували як експланти для індукції множинних пагонів та калюсу відповідно. Експланти культивували на середовищі Мурасіге та Скуга (МС) з додаванням різних концентрацій бензиламінопурину (БАП) і кінетину (КІН) окремо та БАП у поєднанні з  $\alpha$ -нафтилоцтовою кислотою (НОК) для індукції множинних пагонів. Для індукції калюсу листові експланти культивували на середовищі МС, доповненому різними концентраціями ауксинів, таких як 2,4-дихлорфеноксіацетова кислота (2,4-Д), НОК та індол-3-масляна кислота (ІМК). Максимальна кількість пагонів була отримана на середовищі з БАП

1,00 мг/л після 8 тижнів культивування. З кожного експлантату було отримано в середньому  $12,9 \pm 0,10$  пагонів із середньою довжиною  $5,94 \pm 0,13$ . Для індукції коренів пагони перенесли в середовище MS, доповнене різними концентраціями ІМК. Найвищий відсоток індукції коренів спостерігався при 4,00 мг/л ІМК. Укорінені проростки адаптували в суміші ґрунту, піску та біогумусу у співвідношенні 1:1:1, відсоток адаптованих рослин становив 60-70%. Оптимальна індукція калюсу спостерігалася на середовищі MS з додаванням 2,0 мг/л 2,4-Д. Калюс пасирували на середовищі MS, що містило різні комбінації БАП і НОК у різних концентраціях.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Вступ	ЗМІСТ	7
Розділ 1. Огляд літератури		9

1.1. Базилік ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) - джерело цінних фітонутрієнтів		9
1.2. Сорти і хемотаксономічна класифікація		11

1.3. Біоактивні сполуки базиліка. Хімічні складові		13
1.3.1. Ефірна олія		14
1.3.2. Фенольні кислоти		16

1.4. Флавоноїди та антоціани		17
Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень		21

2.1. Рослинний матеріал, проростання <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>		21
2.2. Процедура стерилізації		22

2.3. Приготування живильних середовищ		23
2.4. Підбір умов культивування для прямої регенерації		24

2.5. Калусна культура		27
-----------------------	--	----

Розділ 3. Результати досліджень		28
---------------------------------	--	----

3.1. Індукція та проліферація пагонів <i>O. basilicum</i> L.....	28
3.2. Укорінення і адаптація рослин-регенерантів <i>O. basilicum</i> L. ....	31
3.3. Індукція калюсу <i>O. basilicum</i> L. ....	33
3.4. Регенерація <i>in vitro</i> <i>Ocimum basilicum</i> L. сорту Геновезе .....	37
Висновки .....	40
Список використаних джерел .....	41

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

## ВСТУП

Від *Ocimum* включає понад 150 видів, серед яких вид *basilicum* поширений у всьому Середземномор'ї та використовується як кулінарна трава. Базилік запашний (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) – однорічна трав'яниста рослина з високою господарською цінністю, яка використовується в народній медицині [1], фармакології [2] та харчовому виробництві завдяки своєму специфічному аромату та високій антиоксидантній властивості [3]. На ринку доступна велика різноманітність, особливо щодо морфології та складу ефірної олії (хемотипи, тобто подібна морфологія, але інший склад вторинних метаболітів ефірної олії). Серед типів «Дженовезе», які характеризуються великою поверхнею листя та ефірною олією, багатою на ліналоол і бідною на естрагол, FT Italico є сортом, який комерційно використовується в Італії для виробництва Genovese DOP соус песто, найбільш популярний овочевий соус у всьому світі [4]. Базиліку в даний час загрожує важка грибова патологія, спричинена ооміцетом *Peronospora belbaharii*, що викликає хворобу пероноспорозу базиліка (BDM). Спахлахи цієї хвороби вперше описані у Швейцарії [5], а згодом і в усьому світі. В Італії BDM повідомлялося з 2004 року [6], що призвело до втрати виробництва всіх найбільш використовуваних сортів в Італії [7]. Щоб подолати цю проблему, були проведені різні програми генетичного вдосконалення, і на сьогоднішній день на ринку доступні лише кілька сортів, які посидують помірну стійкість до хвороби з цінними ароматичними профілями [8]. Дослідження екологічно чистих стратегій контролю представило альтернативні заходи для вирішення цієї проблеми, хоча й з невеликим успіхом, принаймні в Італії [7]. В останнє десятиліття для садових культур були запропоновані нові стратегії контролю з використанням сортів, стійких до BDM [9] як використання методів редагування геному (GE), таких як CRISPR/Cas9, для точної інактивації генів сприйнятливості (S), однак успіх в отриманні відредагованих рослин залежить від високої ефективності ex novo регенерації бруньок in vitro.



Відповідно до літератури, деякі протоколи були застосовані до регенерації базилика *in vitro* для використання в підходах ГМ, однак більшість із них опосередковуються каллусом (непряма регенерація *in vitro*) і повідомляють про високу реакцію, специфічну для сорту або навіть генотипу [10, 11].

Враховуючи ці аспекти, ми зосредили нашу увагу на рослинах *O. basilicum* з метою створення та оптимізації відповідного протоколу для морфогенезу та прямої регенерації рослин *in vitro*, який буде використовуватися для редагування CRISPR/Cas9.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Базилік (*Ocimum basilicum L.*) - джерело цінних фітонутрієнтів

В останні три десятиліття, особливо в розвинутих країнах Америки та Європи, вчені виявили великий інтерес до досліджень рослин. Сьогодні близько 60% населення світу в лікуванні покладаються на трави та натуральні продукти, які визнані важливим джерелом біоактивних сполук.

Рослини забезпечують велику кількість біологічно активних сполук, які мають багато підтверджених корисних властивостей, таких як антиоксидантна, протимікробна, протівірусна, антигіпертензивна, протизапальна та ін. Поліфеноли, як біологічно активні сполуки, застосовуються для приготування дієтичних добавок, нутрицевтиків,

функціональних харчових інгредієнтів або космецевтичних засобів [1]. Функціональна їжа – це така їжа або інгредієнти, які при регулярному вживанні спричиняють певний корисний ефект для здоров'я, окрім своїх основних поживних властивостей. Як правило, ці продукти містять різні кількості та типи біоактивних сполук. Якщо біологічно активну сполуку

включено до рецептури харчових продуктів із певною метою, новий продукт можна вважати функціональною їжею. Переваги нового функціонального харчування для здоров'я, наприклад, такі: зниження рівня холестерину, полегшення непереносимості лактози/глютену, швидке позбавлення від діареї та пригнічення проліферації ракових клітин. З іншого боку, нутрицевтики,

згідно з визначенням, - це дієтичні добавки, які доставляють у формі концентрату біоактивні сполуки з їжі, присутні в нехарчовій матриці, і використовуються з метою зміцнення здоров'я в дозах, які перевищують ті, які можна отримати зі звичайної їжі. Зазвичай це продукти, які споживаються у

вигляді пігулок, таблеток, капсул і порошку. Було показано, що нутрицевтики з різних джерел, таких як фрукти та овочі, рослини, гриби, водорості та мікрободорості, містять широкий спектр біологічно активних сполук

(компонентів), таких як поліфеноли, каротиноїди, кумарини, антоціани та інші.

Поліфеноли є вторинними рослинними метаболітами, які мають різноманітні структури та функції в рослинах і добре відомі як антиоксиданти в раціоні людини [2]. Антиоксиданти є життєво важливими речовинами, які мають здатність захищати клітинну мембрану від пошкодження, спричиненого окисним стресом, викликаним вільними радикалами [3]. Зростає інтерес до природних антиоксидантів, наприклад

поліфенолів, присутніх у лікарських і ароматичних травах, які можуть допомогти запобігти окислювальному пошкодженню [4]. Поліфеноли мають ідеальну структурну хімію для поглинання вільних радикалів, і було показано, що вони є більш ефективними антиоксидантами ніж вітамінів токоферол і аскорбат. Антиоксидантні властивості поліфенолів обумовлені їхньою

високою реакційною здатністю як донорів водню або електронів, а також здатністю радикала, похідного від поліфенолу, стабілізувати та делокалізувати неспарений електрон (функція розриву ланцюга), а також їх здатністю хелатувати іони перехідних металів [2]. Організм людини має численні

механізми, особливо ферментативні та неферментативні антиоксидантні системи для захисту клітинних молекул від пошкодження, викликаного активними формами кисню (АФК). Проте певна кількість екзогенних антиоксидантів постійно потрібна для підтримки адекватного рівня антиоксидантів, щоб збалансувати АФК в організмі людини. Багато

синтетичних антиоксидантів, таких як бутильований гідроксиданізол (ВНА) і бутильований гідроксилтолуол (ВНТ), є дуже ефективними і використовуються для промислової обробки. Їх використання було обмежено, оскільки вони мають токсичні, мутагенні та канцерогенні властивості для здоров'я людини [5]. Отже, сполуки, особливо з природних джерел, здатні

захищати від опосередкованого АФК ушкодження, вони можуть мати потенційне застосування для профілактики та/або лікування захворювань. Фенольні сполуки в травах діють як антиоксиданти завдяки

своїм окисно-відновним властивостям, що дозволяє їм діяти як відновники, донори водню, гасники вільних радикалів і хелатори металів [6].

У багатьох випадках рослини, суміші рослин або навіть екстраговані сполуки додають до їжі, щоб забезпечити їх корисні властивості [7]. Серед ароматичних і лікарських рослин, доступних харчовій промисловості, базилік має багатообіцяючу корисну дію.

Базилік (*Ocimum basilicum* L.) відноситься до сімейства губоцвітих (*Lamiaceae*), дуже ароматний і приємний на смак, який використовується переважно в кулінарії. Він походить з Азії, Африки, Центральної та Південної

Америци, але широко культивується в багатьох країнах, особливо в Середземноморському регіоні. Це зелена трава, яка може досягати приблизно 90 см у висоту, має ланцетоподібні листя, які глянцеві та ароматні. Базилік

відомий своїм значним генетичним різноманіттям із зареєстрованими від 50 до 150 видів, заснованими на варіаціях у морфологічних характеристиках, таких як звичка росту, колір листя та квітки, розмір і форма, а також ароматичний склад [8]. За неймовірний аромат базилік ще називають «королем трав».

Одне з найвідоміших застосувань цієї трави як спеції та інгредієнта в кухнях Італії та Південно-Східної Азії. Його часто використовують в суміші для салатів і різних соусів, серед яких найпопулярнішим є італійський песто. Базилік також є однією з найпопулярніших кулінарних трав у Північній

Америци, яку використовують у свіжому або сушеному вигляді. Базилік традиційно використовувався в народній медицині для лікування запалення дихальних і сечовивідних шляхів, астми, як вітрогонний, шлунковий і спазмолітичний засіб [9].

## 1.2. Сорт і хемотаксономічна класифікація

Більшість комерційних сортів базиліка, доступних на ринку, належать до виду *O. basilicum*. Darrah [10] класифікував сорти *O. basilicum* на сім типів: високі стрункі види, до яких відноситься група солодкого базиліка;

крупнолистяні, міцні види, включаючи «Листовий салат», також званий «італійським» базиліком; карликові види, які відрізняються коротким і дрібним листям, наприклад, базилік «Буш»;

компактні види, також описані, *O. basilicum* var. *турсифлора*, яку зазвичай називають «тайським» базиліком; *purpurescens*, види базиліка фіолетового кольору з традиційним солодким ароматом базиліка;

фіолетові типи, такі як «Темний опал», можливий гібрид між *O. basilicum* і *O. foenicolei*, який має лопатеві листя, із солодким базиліком і ароматом гвоздики та *citriodorum* типу, який включає базилік з лимонним смаком.

Таксономія базиліка ускладнюється існуванням численних ботанічних сортів, назви сорту та хемотипів у межах виду, які можуть істотно не відрізнитися за морфологією [11]. Ароматичний характер кожного виду базиліка визначається генотипом і залежить від основних хімічних сполук ефірних олій (ЕО), які в основному складаються з монотерпенів і фенілпропаноїдів [12]. Хемотипи зазвичай класифікуються на основі переважачих сполук або компонентів >20%. Ароматичні сполуки, такі як ліналоол, евгенол, метилхавікол, метилциннамат і цитраль, можна знайти в хемотипах базиліка. Ці хемотипи відомі під назвами, заснованими на географічному походженні, наприклад єгипетський, європейський, Реюньон або тропічний базилік [11]. Європейський тип, солодкий базилік, вважається найякіснішим ароматом, що містить ліналоол і метилхавікол як основні компоненти [9]. Єгипетський базилік схожий на європейський, але містить більший відсоток метилхавіколу. Тип Реюньон з Коморських островів, Мадагаскару, Таїланду та В'єтнаму характеризується високою концентрацією метилхавіколу [12]. Тропічний базилік з Болгарії, Індії, Гватемали та Пакистану багатий на метилциннамат, тоді як базилік з Яви та Північної Африки багатий евгенолом [9].

### 1.3. Біоактивні сполуки базиліка. Хімічні складові

Завдяки наявності вторинних метаболітів, таких як ефірні олії, дубильні речовини, феноли, флавоноїди, антоціани та стероїди, види *Ocimum* давно відомі своїми цілющими властивостями та використовуються в традиційній народній медицині.

Базилік має високий вміст магнію, калію та заліза (табл. 1.1).

Таблиця 1.1: Вміст поживних речовин у 100 г свіжого базиліка.

Поживні елементи	Зміст
Жир	0,64 г
білок	3,15 г
вода	92,06 г
<b>Вітаміни</b>	
Вітамін А	264 мкг
$\beta$ -каротин	3142 мкг
Тіамін ( $B_1$ )	34 мкг
Рибофлавін ( $B_2$ )	76 мкг
Ніацин ( $B_3$ )	902 мкг
Пантотенова кислота ( $B_5$ )	209 мкг
Вітамін $B_6$	155 мкг
Вітамін $B_9$	68 мкг
Холін	11,4 мг
Вітамін С	18,0 мг
Вітамін Е	0,80 мг
Вітамін К	414,8 мкг
<b>корисні копалини</b>	
прибл	177 мг
Fe	3,17 мг
Mg	64 мг
Mn	1,148 мг
P	56 мг
K	295 мг
Na	4 мг
Zn	0,81 мг

Магній і калій, як одні з семи незамінних макроелементів, покращують здоров'я серцево-судинної системи та передачу нервових імпульсів, а також забезпечують захист від низки хронічних захворювань. Це стимулятор травлення і використовується як сечогінний засіб. Він багатий різноманітними важливими поживними речовинами, особливо вітаміном А, вітаміном С, кальцієм і фосфором. Він також містить високі концентрації каротиноїдів, таких як  $\beta$ -каротин, і ці речовини перетворюються на вітамін А в організмі. Бета-каротин пропонує навіть більше переваг, ніж сам по собі вітамін А, і він, як відомо, є потужним антиоксидантом.

Базилік є багатим джерелом поліфенолів. Поліфеноли включають багато класів сполук, починаючи від фенольних кислот, простих або складних флавоноїдів і закінчуючи кольоровими антоціанами. З точки зору фармакологічної активності, вони діють проти перекисного окислення.

### 1.3.1 Ефірна олія

Базилік є економічно важливою культурою для виробництва ефірної олії. ЕО базилика, екстрагований за допомогою дистиляції з водяною парою з листя та квітучих верхівок, використовується для ароматизації харчових продуктів, стоматологічних та ротових продуктів, у парфумерії та ліках [9]. Світове виробництво ВП базилика становить близько 100 т/рік. Вміст базилика ЕО знаходиться в діапазоні від 0,5 до 1,0 % для європейського хемотипу, хоча варіації вмісту ЕО в різних країнах можуть бути пов'язані з різними кліматичними умовами в регіонах. Дослідження Маротті та ін. [12] показали, що вміст ЕО в траві 10 сортів італійського базилика коливався від 0,3 до 0,8 %. У великому дослідженні 270 сортів базилика в Німеччині вміст олії коливався від слідів до 2,65 %. Базилік з Фіджі має вміст ЕО лише 0,2 % (переважаючі сполуки: ліналоол 22,3 %, метилевгенол 24,7 % і метилциннамат 23,6 %). Базилік із Куби має значно вищий вміст ЕО 1,9-2,5 % (переважаючі сполуки: метилхавікол 66,8 %, 1,8-цинеол 5,4 % і ліналоол 5,0 %), тоді як базилик із Буркіна-Фасо має вміст олії 0,7-1,8 % (домінуючі сполуки: 1,8-цинеол 60,2 %,  $\alpha$ -терпіненол 6,5 % і  $\beta$ -пінен 5,7 %) [13].

Існують величезні варіації в складі базилікових EO. Ефірні олії, отримані з *O. basilicum*, традиційно класифікуються на чотири різні хемотипи з багатьма підтипами на основі основних компонентів олії: збагачений ліналоолом, збагачений метилхавіколом, збагачений метилциннаматом і збагачений метилевгенолом [14]. Олії з різних видів базилика та різних районів виробництва мають різні смакові якості та різну вартість на світовому ринку (табл. 1.2). Європейський базилик EO, з ліналоолом і метилхавіколом як основними компонентами, часто вважається найвищою якістю і найкращим ароматом. Цей вид масла зазвичай використовується в косметичній і парфумерній промисловості. Запахні базилики (кориця, солодка та лимон) використовуються в желе, меді, оцті та випічці.

Таблиця 1.2: Вихід ефірних олій (Y) і умістичний склад деяких сортів

#### *O. basilicum*

культивар	Колір		Y (% об./мас.)	Основні сполуки
	листок	Квітка		
Аніс	зелено-фіолетовий	світло-рожевий	0,62	ліналоол (56%), метилхавікол (12%)
кориця	зелений	рожевий	0,94	ліналоол (47%), метилциннамат (30%)
Темний опал	фіолетовий	рожевий	1,08	ліналоол (80%), 1,8-цинеол (12%)
Дженовезе	зелений	білий	0,90	ліналоол (77%), 1,8-цинеол (12%)
Італійський крупнолистий	зелений	білий	0,83	ліналоол (65%), метилхавікол (18%)
Солодка	зелено-фіолетовий	рожевий	0,43	ліналоол (58%), метилхавікол (13%)
Мамонт	зелений	білий	0,77	ліналоол (60%), метилхавікол (32%)
Наполетано	зелений	білий	0,89	ліналоол (66%), метилхавікол (10%)
Опал	фіолетовий	рожевий	0,91	ліналоол (80%), 1,8-цинеол (13%)
Osmín Purple	фіолетовий	рожевий	0,66	ліналоол (77%), 1,8-цинеол (15%)
Фіолетові оборки	фіолетовий яскравий	фіолетовий	0,49	ліналоол (55%), 1,8-цинеол (20%), метилхавікол (6%), метилевгенол (9%)
Червоний Рубін Фіолетовий	фіолетовий	рожевий	0,74	ліналоол (70%), 1,8-цинеол (9%), метилхавікол (10%), метилевгенол (6%)
Солодкий	зелений	білий	0,84	ліналоол (69%), 1,8-цинеол (11%), метилхавікол (13%)
Sweet Fine	зелений	білий	0,98	ліналоол (86%), 1,8-цинеол (6%)
Солодкий тайський	зелений	рожевий	0,40	ліналоол (6%), метилхавікол (60%)
тайська (Pіхтерс)	зелений	рожевий	0,52	метилхавікол (90%)

Ефірна олія базилика має різноманітні властивості. Було продемонстровано протівірусну [15], антиоксидантну [16],



протизапальну [17], протидіабетичну [18] та інгібіторну дію проти ВІЛ-1 [19]. Було продемонстровано сильну антимікробну дію на грампозитивні, грамнегативні бактерії, дріжджі та цвіль [20]. П'расад та ін., [21] вивчали антимікробну активність ЕО базилика з Франції, Індії та Ніязбо, які багаті ліналоолом, метилхавіколом і метилциннамом, відповідно, проти 11 грампозитивних і 7 грамнегативних бактерій. Вони виявили, що ці масла були більш ефективними проти грампозитивних бактерій, ніж проти грамнегативних бактерій. Також спостерігався фунгістатичний ефект базиликових олій [21, 22]. Ефірна олія виявила інсектицидну активність, і вся рослина, а також ЕО є добре відомим засобом від комах [13]. Нещодавні дослідження Danesi та ін. [23] показали, що ЕО з сорту фіолетового базилика краще захищають кардіоміцити від окисного стресу, ніж зелені сорти «Genovese» та «Lettuce Leaf».

### 1.3.2 Фенольні кислоти

Базилік містить високий рівень фенольних кислот, які сприяють його сильній антиоксидантній здатності [24]. Основними фенольними кислотами, які містяться в базилику, є розмаринова, кавова, каftarова і цикорінова кислоти [25-27]. Розмаринова кислота, як поширена фенольна кислота в екстрактах базилика, є важливою фітохімічною речовиною завдяки своїм антиоксидантним і фармакологічним властивостям. Було встановлено, що він є потужною активною речовиною проти вірусу імунodefіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) [28]. Вміст фенолової кислоти залежить від сорту базилика, а також від екстрактів, отриманих різними розчинниками та методами екстракції. У таблиці 4 представлені загальні фенольні сполуки, флавоноїди та антоціани з різних сортів *Ocimum basilicum*. Загальний вміст фенольних кислот і концентрація фенольних кислот у базилику сильно залежить від умов навколишнього середовища під час росту, включаючи температуру та фотоперіод, наявність поживних речовин у ґрунті та сезонні, географічні та кліматичні зміни. Крім того, ті самі комерційні продукти з базилика можуть деградувати фенольні кислоти через вік, умови зберігання та/або процес

сушіння. Основна роль фенольних кислот — антиоксиданти. Антиоксидантна активність фенольних кислот в основному зумовлена їх окисно-відновними властивостями [24]. Отже, вони демонструють інші переваги, можуть захищати від серцево-судинних захворювань, діяти як антитромбоцитарні та протизапальні засоби. Вміст фенолів і антиоксидантна активність базилика були подібні до червоної та чорної малини та вищі, ніж у шипшини [29].

#### 1.4. Флавоноїди та антоціани

Флавоноїди - це фенольні речовини, виділені з широкого спектру рослин, які діють як антиоксиданти, протимікробні засоби, фоторецептори, зорові атрактори, живильні репеленти та для екранування світла в рослинах. В організмі людини виявляють різні біологічні дії, включаючи антиалергічну, протівірусну, протизапальну та судинорозширювальну дії, і є важливими компонентами в раціоні людини. Проте найбільший інтерес приділено антиоксидантній активності флавоноїдів, яка зумовлена їхньою здатністю зменшувати вільні радикали. Флавоноїди, виділені з базилика, належать до підгрупи флавонів і флавонолів, які зустрічаються як глікозильовані похідні. Дослідження, проведені Grayer et al., [33] показали, що домінуючі компоненти в *O. basilicum* були: кверцетин, лютеолін, апігенін і кемферол переважно як *O*-глікозиди.

Інтенсивно фіолетовий пігментований базилик є гарним джерелом антоціанів. Деякі сорти фіолетового базилика мають значний рівень антоціанів, водорозчинних фенольних сполук, які в основному відповідають за червону, фіолетову та синю пігментацію рослин. Антоціани виконують різноманітні функції в рослинах, починаючи від захисних до захисних [34] і закінчуючи сприянням росту, розвитку та розмноженню [35]. Вони мають антиоксидантні властивості та здатність поглинати радикали, які корелюють із профілактикою захворювань у людей. Переваги їх споживання пов'язані з нейропротекторними ефектами, зокрема, знизенням ризику хвороби Паркінсона [36]. У таблиці 5 порівнювали рівень антоціану в базилику з

іншими рослинними джерелами. Відповідно до Саймона та ін., [9] було ідентифіковано чотирнадцять різних антоціанів, переважно глікозиди ціанідину та неонідину. Загальний вміст антоціанів коливається від 0,07 до 0,19 мг/г свіжої маси. Flanigan & Niemeyer [30] досліджували 8 різних сортів фіолетового базиліка, де вміст антоціанів коливався від 7,55 до 16,6 мг/г сухої маси (DW). З отриманих результатів пурпурний базилік можна вважати багатим джерелом антоціанів і червоних пігментів, цінних для харчової промисловості.

Нові дослідження показали, що споживання рослинних поліфенолів може мати захисні властивості проти серцево-судинних, нейродегенеративних і запальних захворювань, діабету та деяких форм раку [37]. Базилік — лікарська рослина, яка використовується в традиційній медицині, зокрема в Аюрведе, зокрема для зняття стресу, а в китайській медицині — для лікування серцево-судинних захворювань, включаючи гіпертонію. Це корисний протизапальний засіб, який зменшує запалення приблизно на 54%. Амрані та ін. [38] продемонстрували *in vivo* антиагрегацію тромбоцитів і антитромботичні ефекти водних екстрактів базиліка. Нові результати показали значне зниження рівня глюкози в крові та загального холестерину в плазмі крові, холестерину ЛПНЩ і тригліцеридів [39, 40, 18].

Згідно з літературними даними, цитотоксичну активність *O. basilicum* EO та екстрактів досліджували Zafraha та ін. [41] *in vitro* на чотирьох різних клітинних лініях раку людини: клітинах HeLa аденокарциноми шийки матки людини, клітинах FemX меланоми людини, хронічних клітин людини, клітини мєлолейкову K562 і клітини SKOV3 яєчників людини. У цьому дослідженні ізоєвгенол, евгенол, ліналоол і каваова кислота показали високу цитотоксичність і протипухлинну активність проти клітин SKOV3 яєчників людини. Цитотоксична активність *O. basilicum* EO була визнана Kathirvel & Ravi [42] проти пухлинних клітин HeLa і HEP-

2. Дослідники в цій галузі, з різними екстрактами базиліка, все ще безперервні

Завдяки такій кількості переваг для здоров'я базилик стає все більш популярним. Екстракти та ЕО ароматичних/лікарських рослин розглядаються не тільки як профілактика при лікуванні різних захворювань, а й як природні харчові консерванти. У сфері виробництва харчових продуктів

канцерогенність деяких синтетичних антиоксидантів (ВНТ і ВНА) призвела до заміни таких антиоксидантів безпечними добавками/екстрактами, отриманими з природних джерел із доведеною антиоксидантною дією. Сьогодні в харчовій і фармацевтичній промисловості спостерігається

тенденція до заміни синтетичних антиоксидантів натуральними. З цих причин зростає інтерес до аналізу натуральних, нетоксичних і здорових рослинних екстрактів з антиоксидантними властивостями, які можна використовувати як добавки. Як добавка та антиоксидант [43]. Переваги полягали в інгібуванні

окисної деградації ліпідів, що проявляється у відсутності змін органолептичних властивостей, таких як смак, колір і текстура. У цих продуктах ЕО діють як антимікробні агенти. Незважаючи на всі ці корисні ефекти, кілька досліджень повідомляють про включення базилика в харчові продукти. Базилик і його екстракти використовуються для ароматизації та консервування оливкової олії [44]. Така продукція високо цінується

споживачами за насичений колір і ароматні характеристики. Пряма ароматизація оливкової олії з базиликом є новою тенденцією в середземноморському регіоні як для сенсорного, так і для покращення харчування [45]. У Туреччині свіжий базилик також споживають з йогуртом

через його позитивний вплив. Листя базилика були включені в португальський сир «Serra da Estrela» для перевірки їх функціональних і консервуючих властивостей [46], з ідеєю для нових харчових продуктів з натуральними інгредієнтами. Насіння базилика є джерелом полісахаридів [47]. Коли він

замочується у воді, він стає желатиновим і використовується в азіатських напоях і десертах.

Ряд базиликів має комерційний потенціал для виробництва промислової продукції. Наприклад, хемотипи базилика, багаті камфорою або евгенолом,

можуть бути потенційним промисловим джерелом природних сполук - камфори/евгенолу. Саймон та ін. [9] прийшли до висновку, що пурпурний базилік містить дуже високу концентрацію загальних антоціанів і є цінним джерелом цих компонентів, які можуть служити потенційним новим джерелом

червоних пігментів для харчової промисловості. Численні дослідження підтвердили ефективність *O. basilicum* як природний антиоксидант, завдяки переважанню поліфенольних сполук. Було доведено, що розмаринова кислота, основний активний компонент базиліка, має медичну цінність, а також її

чудову антиоксидантну дію разом з вітаміном Е. Антиоксидантна активність базилікового ЕО та екстрактів була в кілька разів вищою, ніж повідомлялося про активність різних трав'яних ефірних олій (*Lavandula angustifolia*, *Majorana hortensis*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum onites*), чия

антиоксидантна здатність була визнана важливою. Загалом, для лікувальних переваг інтенсивне споживання базиліка, ЕО та екстрактів у харчовій та фармацевтичній промисловості становить інтерес.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Рослинний матеріал, проростання *in vitro* та *in vivo*

*In vitro*: насіння *Ocimum basilicum* L. замочували протягом 20 хвилин у розчині гіпохлориту натрію (2,5% активного хлору) для поверхневої стерилізації, а потім тричі промивали стерильною водою.

Насіння висівали на середовище Мурасіге та Скута [13] з додаванням агару 8 г/л при рН 5,7. Процес пророщування проводився в камері для вирощування при  $23 \pm 1$  °C у темряві протягом перших 3 днів, потім перенесено на фотоперіод 16 годин світла (PPFD 30 мкЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) і 8 годин темряви.

Для стерилізації відбирали здорові та молоді експланти, вузлові пазушні бруньки та листові диски приблизно 1-1,5 см. Вирізані експланти ретельно промивали в проточній водопровідній воді протягом приблизно 15-20 хвилин і в 5% (мас./об.) розчині миючого засобу Tween 20 протягом 10 хвилин для видалення прилиплих частинок живого і неживого. Після ретельного промивання в стерильній дистильованій воді експланти поверхнево стерилізували 70% етанолом протягом 30 секунд, а потім у 0,02% (мас./об.) водному HgCl<sub>2</sub> протягом 3-5 хвилин в асептичних умовах. Стерилізовані експланти переносили в камеру інкуляції, де їх промивали двічі дистильованою стерильною водою принаймні 7 разів, щоб видалити будь-які сліди поверхневих стерилізуючих хімікатів, присутніх на поверхні експлантів.

В якості вихідних матеріалів для прямих експериментів з органогенезу *in vitro* розглядалися гіпокотили та сім'ядолі 2-тижневих сянців, а також перші справжні листки та сім'ядольні вузли 4-тижневих сянців.

*In vivo*: насіння поміщали для пророщування в теплицю на субстрат і стерилізований пісок (70:30 об./об.) і регулярно поливали. Через один місяць, коли перші справжні листки були добре розвинені та вирягнуті, їх поверхнево стерилізували відповідно до протоколу, запропонованого [14], щоб отримати

стерильні дисткові експланти для проведення експериментів з регенерації in vitro.

## 2.2. Процедура стерилізації

Стерилізацію кімнати інокуляції та інкубації досягали фумігацією кімнати формальдегідом протягом щонайменше 12 годин. Надлишок парів формаліну видаляли шляхом поміщення рідкого аміаку в чашку петри в фумігаційну зону.

Камеру з ламінарним повітряним потоком протирали спиртом і піддавали дії бактерицидної УФ-лампи (253,7 нм) протягом півгодини перед інокуляцією.

Культуральні флакони та скляний посуд залишають у нерозведений сірчаній кислоті на ніч, а потім промивають проточною водою з використанням миючого засобу з наступним споліскуванням деіонізованою дистильованою водою.

Флаконам і скляному посуду давали висохнути протягом деякого часу і стерилізували в духовці з гарячим повітрям при 180 °C протягом 2 годин або при 360 °C протягом 1 години.

Скальпелі, пінцети, алюмінієва фольга, флакони, циліндри, чашки Петрів, пробірки тощо стерилізували вологою стерилізацією в автоклаві. Ці інструменти загортали в алюмінієву фольгу та автоклавували при 15-20 фунтів протягом 15 хвилин. Стерилізовані інструменти були негайно перенесені в камеру з ламінарним повітряним потоком.

Перед інокуляцією всі інструменти та флакони витримували в камері з ламінарним потоком повітря в присутності ультрафіолетового світла протягом приблизно 30 хвилин. Експлантати спочатку зберігали на стерильному цигарковому папері, щоб видалити воду з поверхні. Експлантати переносили на обробку дошки, потім експлантати обрізали до 0,5-1 см і висаджували на культуральне середовище. Горловину флаконів з культурою тримали близько до полум'я та закривали одразу після інокуляції ватною пробкою та

маркували. Флакони з інокульованими культурами інкубували в темних і світлих умовах при  $24 \pm 2$  °C. Умови освітлення забезпечували холодно-білі люмінесцентні лампи (polux XL) 4000 люкс.

### 2.3. Приготування живильних середовищ

У цьому дослідженні використовувалося базальне середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) [13]. Живильне середовище складається з усіх мікро- і макроелементів, вітамінів і амінокислот. Усі необхідні хімічні речовини для приготування середовища MS зважували за допомогою електронних ваг Shimadzu тонопан. Був приготовлений основний розчин із сильністю середовища MS у 500 разів і зберігали його в холодильнику. Стабільний стандартний базовий розчин різних PGR готували шляхом зважування 10 міліграмів (мг) кожного з PGR, розчинення в 10 мілілітрах (мл) дистильованої води та зберігання при 5°C.

Середовище було доповнено різними концентраціями цитокінінів, а саме БАП (6-бензиламінопурин і КН (кінетин) окремо або в комбінаціях БАП і НОК для множинного формування пагонів і різних концентрацій ауксинів, а саме 2,4-Д, ІМК, НОК у концентрації 1 мг/л

Для індукції каллусу регулятори росту рослин використовували окремо або в комбінації. В кінчній колбі за допомогою мірного циліндра та стерильного шприца додавали необхідну пропорцію компонентів середовища, а саме мікро- та макро, вітамінів та регуляторів росту.

Середовище доводили до необхідного об'єму шляхом додавання деіонізованої стерильної дистильованої води перед додаванням 3% (маса/об'єм) сахарози та 0,8% (маса/об'єм) агару рН середовища виміряли та відрегулювали до 5,8 за допомогою 0,1N NaOH і, якщо необхідно, з 0,1 NHCL.

Як джерело вуглецю додавали сахарозу. Після додавання агару середовище нагрівали до розплавлення агару.



Рідке середовище порівну розливали у культуральні флакони (по 10 мл у флакони) і негайно закривали ватними пробками. Середовище автоклавували при 121°C протягом 15 рсi протягом 15 хвилин.

Горловину флаконів з культурою щільно закривали після автоклавування, не заважаючи охолоджувати. Маркування середовища проводили мітками, а культуральні флакони зберігали в стерильних умовах

#### 2.4. Підбір умов культивування для прямої регенерації

Перші справжні листки 4-тижневої розсади, як досягнуті розсадою *in vitro*, так і стерилізованими *in vivo* листям, використовували як вихідні експланти та розрізали на дрібні шматочки, як повідомляє [14], видаляючи середню жилку та кінчик листа.

Експланти поміщали абаксiальною стороною вгору на два різні середовища, засновані на середовищі для розмноження пагонів MS B [15] (MS1 і MS2, табл. 2.1.) і в те саме середовище, в яке додавали дві антиоксидантні сполуки (MS1LA і MS2LA), тобто лимонну кислоту (10 мг/л) та аскорбінову кислоту (100 мг/л), щоб зменшити потемніння експлантів.

Таблиця 2.1.

Вихідні рослинні матеріали та склад середовища, використані в експериментах з регенерації. Базове середовище MS з 3% сахарозою використовували як контроль.

Тип експлантату	PGR (концентрація) додано до середовища MSS	Сполуки (концентрація), додані до середовища MSS	Середовища
Перший справжній лист ( <i>in vitro</i> або <i>in vivo</i> )	БАП (1 мг/л)	-	MS 1
	БАП (1 мг/л)	+Лимонна кислота (10 мг/л) + Аскорбінова	MS 1 LA

		кислота (100 мг/л)	
	TDZ (4 мг/л)	-	МС 2
	TDZ (4 мг/л)	+Лимонна кислота (10 мг/л)	МС 2 ЛА
		+ Аскорбінова кислота (100 мг/л)	
Гіпокотили (in vitro)	ІОК (1 мг/л)	+ZnSO <sub>4</sub> (12,9 мг/л)	МС 3
	TDZ (4 мг/л)	-	МС 2
	TDZ (4 мг/л)	+Лимонна кислота (10 мг/л)	МС 2 ЛА
		+ Аскорбінова кислота (100 мг/л)	
Сім'ядолі (in vitro)	ІОК (1 мг/л)	+ZnSO <sub>4</sub> (12,9 мг/л)	МС 3
	TDZ (4 мг/л)	-	МС 2
Сім'ядольні вузли (CN) (in vitro)	TDZ (4 мг/л)	TDZ (4 мг/л)	МС 2

Використовували п'ять чашок Петрі з 10 експлантатами для кожного середовища в трьох повторах (150 загальних експлантів/середовище для МС1 і МС2) або в двох повторах (100 загальних експлантів/середовище для МС1ЛА і МС2ЛА).

Сегменти гіпокотилу (довжиною близько 5 мм) 2-тижневих сянців *O. basilicum* вирізали та поміщали на чашки Петрі на три різні середовища (МС3, МС2 або МС2ЛА) [16] і [14]. Експлантати спостерігали кожні 15 днів і

субкультивували щомісяця протягом 2 місяців. Чотири чашки Петрі з 10 експлантатами для кожного середовища використовували в трьох повтореннях (загалом 120 експлантатів/середовище).

Сім'ядолі без черешків 2-тижневих сіянців поміщали на регенераційне середовище (MS2 або MS3); чотири чашки Петрі з 20 експлантатами для кожного середовища були використані в трьох повторах (загальна кількість експлантів 240/середовище).

Сім'ядольні вузли (CN), які склалися з шматка приблизно 0,8 см в довжину всередині епікотілю, гіпокотіля та черешків сім'ядолей, були вирізані з 4-тижневої розсади. Усі експланти поміщали на середовище для регенерації (MS2). Три чашки Петрі з 15 експлантатами/середовище використовували в трьох повторах (загалом 135 експлантатів/середовище).

Матеріали експлантатів усіх експериментів поміщали в камеру для вирощування при  $23 \pm 1$  °C з фотоперіодом світла 16 годин (PPFD 30 мкЕ м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>) для гіпокотилів, сім'ядолей і ХН, а в темний для листя. Експланти, вирощені на середовищах, доповнених TDZ, спочатку поміщали в темряву на 15 днів, як повідомляє [14].

Для всіх експериментів як контроль використовували вільне від гормонів середовище розмноження MS shoot B [15] з 3% сахарози (4 чашки Петрі на експеримент).

Для індукції множинних пагонів вузлові експланти инокулюють на середовище MS, доповнене такими гормонами, як БАП і КІН (0,5, 1,0, 2,0 і 3,0 мг/л) окремо та БАП у комбінації з НОК (0,1, 0,25 і 0,5 мг/л). Культуру зберігали протягом 4 тижнів і пересівали на ті самі комбінації середовища MS для подальшої проліферації та подовження. Кожна обробка складалася з 10 повторів і повторювалася двічі. Загальну кількість пагонів на експлант і довжину пагонів вимірювали через 8 тижнів культивування. Пагони довжиною 3-5 см відокремлювали, видаляли та переносили в середовище для вкорінення, доповнене різними концентраціями (1,0, 2,0, 3,0 і 4,0 мг/л) ІМК окремо. Через 4 тижні культивування вимірювали загальну кількість коренів,

утворених на пагін, і довжину коренів. Вкорінені рослини (4-5 см) обережно виймали з пробірок і промивали стерильною водою, щоб видалити сліди агару, що прилипли до коренів. Рослини пересаджували в паперові стаканчики, наповнені сумішшю стерилізованого піску, ґрунту та біогумусу у співвідношенні 1:1:1. Акліматизовані рослини були перенесені та встановлені в полі.

## 2.5. Калюсна культура

Для індукції калюсу стерилізовані листкові експланти культивували в середовищі MS, доповненому різними концентраціями ауксинів, таких як 2,4-Д, НОК та ІМК, окремо (1,00, 2,00, 3,00, 4,00 мг/л). Утворені калюси періодично пересівали кожні два тижні на середовище MS, що містить БАП (1 мг/л) + НОК (0,5 мг/л); БАП (1мг/л) + 2,4-Д (0,5мг/л); БАП (1 мг/л) + ІМК (0,5 мг/л); БАП (2 мг/л) + НОК (0,5 мг/л); БАП (3 мг/л) + НОК (0,5 мг/л) для індукції багаторазових пагонів.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Індукція та проліферація пагонів *O. basilicum* L.

Ініціація сходів у вузлових експлантатах відбувалася протягом 5-8 днів після інокуляції, тоді як у базовому середовищі це тривало більше 10 днів.

Серед різних протестованих цитокінінів, на середовищі з БАП (1 мг/л) спостерігали максимальну кількість множинних пагонів ( $11,7 \pm 0,1$ ) на

експлантат з 84% відповіддю після 8 тижнів інокуляції, а на середовищі з

кінетином спостерігали індукцію  $7,8 \pm 0,2$  множинних пагонів з 66 %

відповідно. Максимальна висота пагонів ( $4,8 \pm 0,1$  см) спостерігалася при

1 мг/л БАП, а потім  $3,9 \pm 0,2$  см на кінетині 2 мг/л (табл. 3.1, рис. 3.1). Через 4

тижні пагони вирізали та далі пасирували на туж саму концентрацію

середовища для масового розмноження. У наступному субкультивуванні

спостерігалася висока частота розпускання бруньок та індукції множинних пагонів у БАП 1 мг/л (рис. 3.2), а потім КІП 2 мг/л.

Індукція множинних пагонів поступово знижувалася в усіх інших протестованих регуляторів росту. Додавання НОК до БАП у середовищі MS

зменшувало проліферацію пазушної бруньки при дуже низькій концентрації

(0,5 БАП мг/л + 0,1 НОК мг/л; 0,5 БАП мг/л + 0,2 НОК мг/л; 1,0 БАП мг/л + 0,2 НОК мг/л). Однак багаторазова індукція була викликана у вищих

концентраціях (1,0 БАП мг/л + 0,5 НОК мг/л; 2,0 БАП мг/л + 0,2 НОК мг/л; 2,0

БАП + 0,5 НОК мг/л). Крім того, додавання НОК до БАП у середовищі MS

спричинило утворення калюсу в основі вузлових експлантів шляхом

зменшення індукції кількох пагонів (рис. 3.3). Лише поодинокі пагони з

корінням були утворені при низькій концентрації БАП і НОК (рис. 3.4). Кілька

пагонів могли бути отримані лише шляхом поєднання низьких концентрацій

ауксину та цитокініну з БАП (2,0 мг/л) і НОК (0,5 мг/л), будучи найбільш

підходящим.

Таблиця 3.1

Вплив регуляторів росту рослин на індукцію множинних пагонів із вузлових експлантів *O. basilicum* L. після 8 тижнів культивування

Концентрація регуляторів росту (мг/л)	Частота регенерації, %	Середня кількість пагонів / експлантат	Середня довжина пагонів (см)
БАП			
0,5	67	10,6 ± 0,1	2,9 ± 0,1
1,0	84	11,7 ± 0,1	4,8 ± 0,1
2,0	77	7,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1
3,0	62	5,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1
КІН			
0,5	66	7,7 ± 0,2	2,5 ± 0,2
1,0	52	4,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1
2,0	80	6,5 ± 0,1	3,9 ± 0,2
3,0	58	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1
БАП + НОК			
0,5+0,1	5	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
0,5+0,2	10	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
1,0+0,2	12	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
1,0+0,5	36	2,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2
2,0+0,2	38	2,9 ± 0,2	2,4 ± 0,2
1,0+0,5	70	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,1

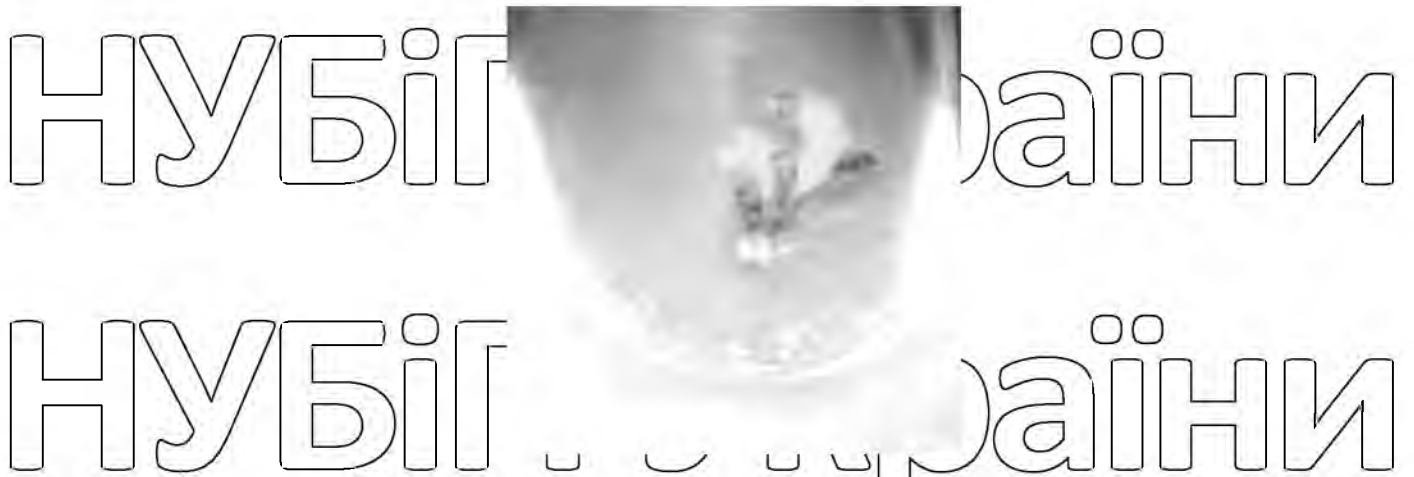


Рис. 3.1. Культивування пагонів після 7 днів культивування, інокульованого на середовище MS, що містить 1 мг/л БАП.

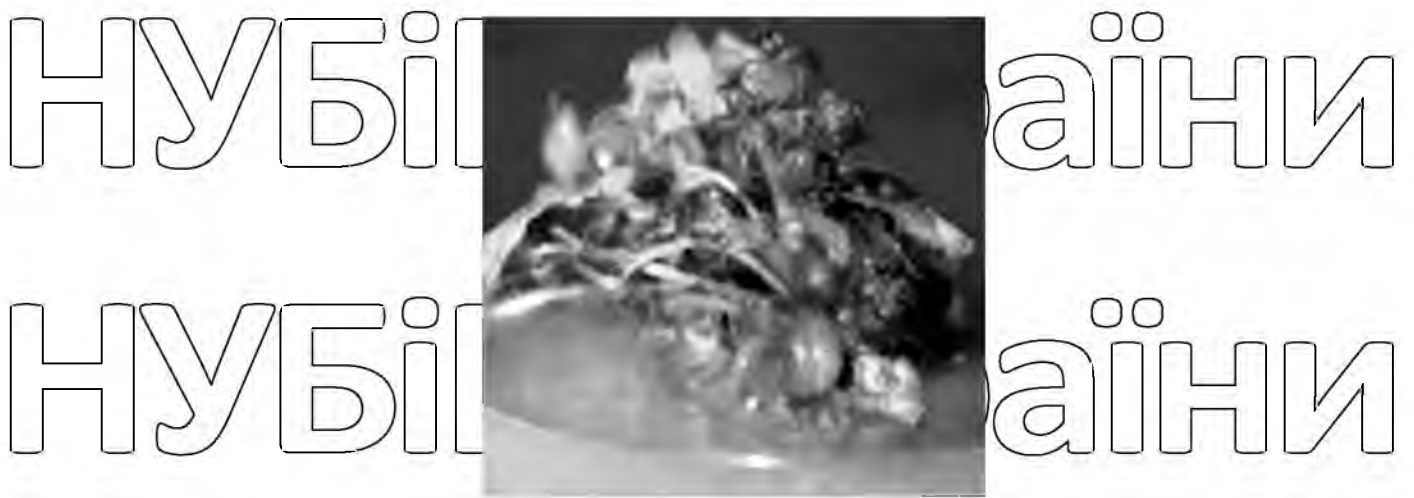


Рис. 3.2. Культивування пагонів через 2 тижні.



Рис. 3.3. Культивування пагонів, що утворилися після пасирування пагонів на середовищі MS, що містить 1 мг/л БАП, з утворенням коренів.



Рис. 3.4. Проліферація пагонів на середовищі MS, що містить низькі концентрації БАП і НОК.



Рис. 3.5. Утворення калюса в основі експлантів за додавання в середовище БАП та НОК.

### 3.2. Укорінення і адаптація рослин-регенерантів *O. basilicum* L.

Укорінення проводили в середовищі MS, доповненому різною концентрацією ІМК.



Будо відмічено, що % регенерації, середня кількість коренів і середня довжина коренів збільшувалися зі збільшенням концентрації ІМК (табл. 3.2, рис. 3.5).

Найвищий % регенерації (95%) і кількість корінців ( $8,4 \pm 0,4$ ) з довжиною кореня ( $4,6 \pm 0,6$ ) спостерігався при 4 мг/л.

При загартуванні при пересадці в подістакани з землею, піском і біогумусом у співвідношенні 1:1:1 прижилося 60-70% рослин.

Таблиця 3.2

Вплив регуляторів росту рослин на індукцію коренів із пагонів

*O. basilicum* L., культивованих на середовищі MS

Концентрація регуляторів росту, мг/л	Частота ризогенезу, %	Кількість коренів на експлант	Середня довжина коренів, см
0.5	76	$2 \pm 1$	$2.2 \pm 0.3$
1.0	95	$5 \pm 1$	$4.1 \pm 0.5$
2.0	74	$6 \pm 2$	$5.6 \pm 0.1$
4.0	93	$7 \pm 1$	$5.7 \pm 0.6$



Рис. 3.6. Утворення коренів in vitro на середовищі MS з 4 мг/л ІМК після 4 тижнів культивування;



Рис. 3.7. Акліматизовані *in vitro* саджанці в пластикових стаканчиках із землею, піском і біогумусом у співвідношенні 1:1:1 для адаптації.

### 3.3. Індуція калюсу *O. basilicum* L.

Індуція калюсу починалася із скручування листя, і калюс з'являвся на зрізаному кінці експлантів листя протягом 8-10 днів після інокуляції.

Найвищу свіжу масу калюсу було отримано з листкових експлантів, інокульованих 2,0 мг/л 2,4-Д протягом 2 тижнів культивування, а потім 4,0 мг/л 2,4-Д (табл. 3.3, рис. 3.8).

Калюс пасирували в 2,4-Д для розповсюдження та обслуговування.

Спочатку калюс був світло-кремово-зеленуватим, пізніше світло-коричневою і зрештою став темно-коричневим після 8 тижнів культивування.

Комбінації всіх середовищ MS, що містять БАП з 2,4-Д, НОК та ІМК, не дали множинних пагонів, але зеленуваті соматичні ембріоїди з'явилися на калюсі після 8 тижнів культивування при вищій концентрації БАП (2 мг / л) + НОК (0,5 мг/л) + ІМК (3 мг/л) + НОК (0,5 мг/л) (рис. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив регуляторів росту рослин на індукцію калюсу з  
листя експлантів *O. basilicum* L. після 4 тижнів культивування

Регулятори росту, мг/л	Частота індукції калюсоутворення, %	Морфологічна характеристика калюсу	
		Щільність	Колір
2,4-Д контроль	18	рихлий	Світло кремовий
1.0	75	рихлий	Світло кремовий
2.0	93	рихлий	Світло кремовий
3.0	58	рихлий	Світло кремовий
4.0	78	рихлий	Світло кремовий
НОК			
1.0	22	рихлий	Світло кремовий

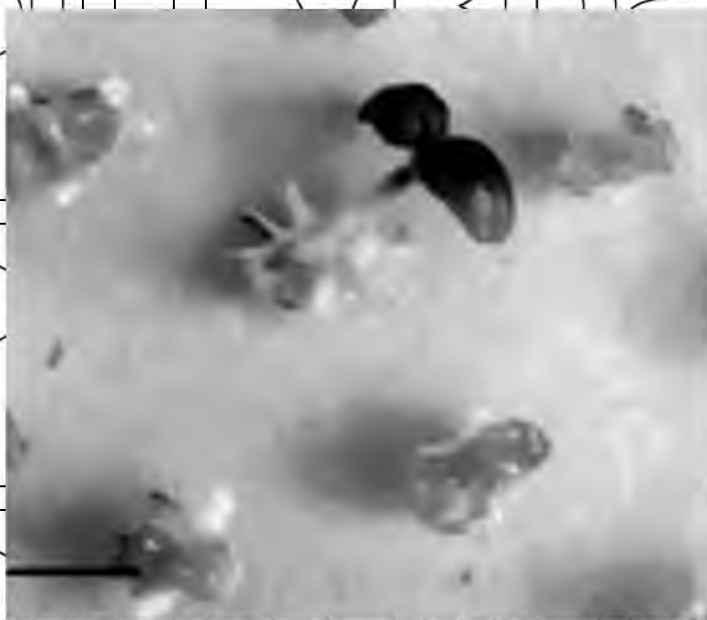


Рис. 3.8. Проліферація калюсу на середовищі MS, що містить 2 мг/л 2,4-Д після  
1 тижня культивування



Рис. 3.9. Рихлий коричневий калюс після 8 тижнів культивування.

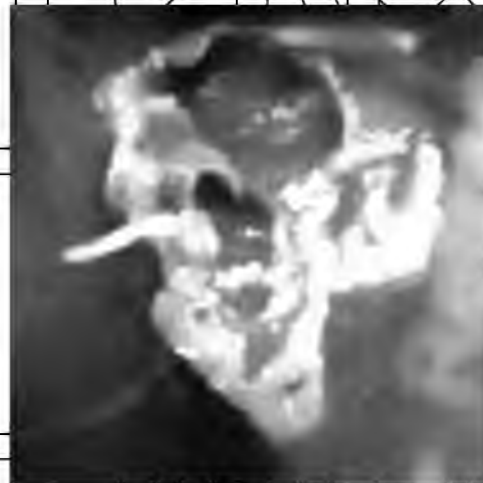


Рис. 3.10. Проліферація калюсу на середовищі НОК 1 мг/л МБ з корінцями.



Рис. 3.11. Відсутність проліферації калюсу при вищій концентрації НОК та ІМК відповідно, з утворенням лише корінців.

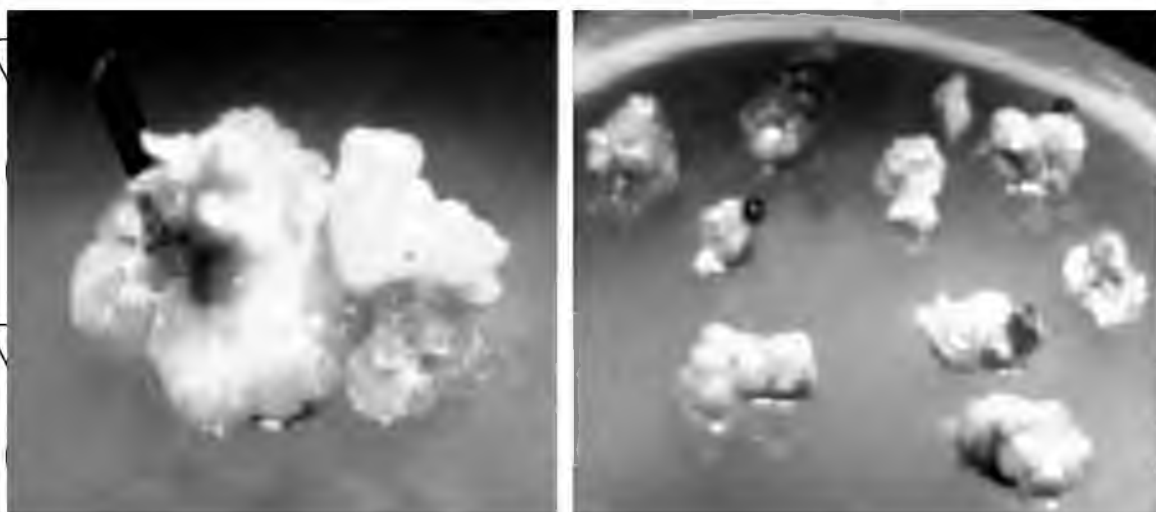


Рис. 3.12. Зеленуваті соматичні ембріони на середовищі MS, що містить БАП (1 мг/л) + НОК (0,5 мг/л)

Описані методи поверхневої стерилізації вузлових і листкових експлантів дозволили отримати 80-85% асептичних експлантів. Найкращим ефективним регулятором росту рослин для індукції множинних пагонів і проліферації з вузлових експлантів *O. basilicum* L. є БАП 1,0 мг/л, а погли КІН 2 мг/л.

Помітне зниження % регенерації спостерігалось при нижчому та вищому рівнях БАП. Подібні результати також були отримані для лікарських рослин, таких як *Paederia foetida* та *Codonopsis pilosula* [14, 15]. У попередньому дослідженні вузлові сегменти *C. stamineus* дали 82% пагонів при культивуванні в 0,5 мг/л БАП [16], а в іншому дослідженні 1,5 мг/л БАП дало більшу кількість пагонів [17]. Різниця у відповіді на комбінацію гормонів може бути зумовлена такими факторами, як генотип рослини та фізіологічний стан експлантів, які впливають на регенерацію пагонів рослини [18]. Наші результати показали, що високе співвідношення БАП : НОК сприяє утворенню пагонів, але низьке співвідношення БАП : НОК індукує утворення коренів та індукцію калюсу в *O. basilicum* L. Крім того, комбінація БАП і НОК в середовищі не мала великого ефекту в індукції та проліферації кількох пагонів. Це дослідження чітко показує, що лише БАП є ефективним для швидкого розмноження пагонів. Повідомлялося про стимулюючу дію БАП на індукцію

множинних пагонів у таких лікарських рослинах, як *Lippia alba* та *Vinca rosea* [19, 20]. Для індукції коренів ІМК 4,00 мг/л було визнано найкращим гормоном росту. Встановлено, що ІМК є ефективним гормоном для укорінення інших видів *Lamiaceae*, таких як *Plectranthus bourneae* та *Ocimum gratissimum* [21, 22]. Ступінь індукції калюсу з листових експлантів різнився за різних регуляторів росту рослин. Подібні результати також були отримані для інших видів *Lamiaceae*, таких як *Coleus vetiverioides* [23] і *Ocimum basilicum* [24]. Наше дослідження щодо розробки етапів розмноження сприяє швидкому розмноженню пагонів та індукції калюсу.

#### 3.4. Регенерація *in vitro* *Ocimum basilicum* L. сорту Геновезе

Регенерація рослин, яка є основним обмежуючим фактором для протоколу трансформації в *O. basilicum*, була отримана лише для кількох конкретних сортів [14, 17].

Відомо, що генотип є фактором, який впливає на розвиток систем регенерації, особливо для видів із численними видами, такими як базилик.

Для базилика «дженовезе», який найчастіше використовується в харчовій промисловості, доступно декілька протоколів, стандартизованих виключно для цього конкретного сорту [11, 18].

У нашій роботі ми запропонували протокол регенерації елітного сорту *O. basilicum* Геновезе, який широко використовується в кулінарії.

Усі досліди проводили, починаючи з однієї партії насіння, щоб уникнути (наскільки це можливо) будь-яких внутрішньосортних генотипових варіацій.

Стосовно листових експлантів можна зробити висновок, що додавання цитокинінів, зокрема БАП (1 мг/л), індукує позитивний вплив на здатність до регенерації (рис. 3.13).



Рис. 3.13 Вплив регуляторів росту і антиоксидантів на здатність до регенерації, що спостерігається у *in vivo* та *in vitro* перших справжніх листках як вихідних матеріалах.

Фактично, для Геневезе вдалося досягти максимального відсотка регенерації (30,4%) з перших справжніх листків *in vivo* (табл. 3.4) порівняно з 36,8%, про які повідомляє [14] для сорту зелено пурпурного.

Макроскопічно було видно, що після двох пересадок на краях листя спостерігаються симптоми побуріння, що призводить до зниження регенераційної здатності.

Потім експеримент було повторено та реалізовано з додаванням антиоксидантів до культурального середовища МС1: додавання лимонної та аскорбінової кислот призвело до дещо кращих результатів щодо відсотка регенерації, хоча статистично недостовірні.

Крім того, усі експланти також продемонстрували очевидну здатність до калогенезу в точці розрізу, що свідчить про можливість застосування альтернативного методу, тобто процесу непрямой регенерації.

Регенерація *in vitro* *Ocimum basilicum* L. сорту Геновезе

Тип експлантату	Середовище	Регенерація пагонів, %	Середня кількість пагонів на експлантат
Листки ( <i>in vitro</i> )	МС1ЛА	30,5±0,7	1,3±0,1
Гіпокотилі	МС2ЛА	8,7±0,2	1,2±0,3
Сім'ядолі	МС2ЛА	18,4±0,8	1,1±0,2
Сім'ядольні вузли	МС2	92,6±0,2	2,4±0,2

Відсотки регенерації, отримані з гіпокотилів або сім'ядолей, також не дали помітних результатів, з дуже низькими відсотками регенерації пагонів *de novo* (з максимумом 8,7% і 18,4% регенерації на середовищі МС2ЛА для гіпокотилів і сім'ядолей, відповідно). Невелика кількість калюсу спостерігалася лише на пошкодженій поверхні експлантів, але був зареєстрований прямий органогенез, оскільки регенеровані пагони виникають із тканини експланта, а не з калюсу. Ризогенез спостерігався на експлантатах сім'ядолей, тоді як гіпокотилі показали пошкодження побуріння через 30 днів. Наші результати щодо елітного сорту відрізняються від результатів, запропонованих Verma et al. [16], в якому запропоновано простий протокोल регенерації комерційного сорту базилика з використанням сульфату цинку; це спостереження передбачає і підтверджує сильну залежність від різних генотипів.

Нарешті, спостерігаючи, що деякі пагони виникли з базальної частини сім'ядолей поблизу вузла з'єднання, ми оцінили можливість прямої регенерації з сім'ядольних вузлів, про що також повідомлялося в *O. gratissimum* Ханом та його співробітниками [19]. Використання СН як початкового експланта дало чудові результати: більше 92% експлантів, вирощених на середовищі, що містить TDZ, показали пряму регенерацію, без



проміжних фаз каллусу, в середньому з 2,6 пагонів на використаний експлант.

Регенеровані рослини показали нормальні морфологічні та ростові характеристики, демонструючи повну цілу рослину, регенеровану *in vitro*

через 30 днів. Крім того, всі регенеровані пагони базиліка змогли спонтанно

вкоренитися за 40 днів на середовищі МС, що не містить PGR. Регенерація

цілої рослини з модифікованих клітин і тканин за допомогою методів

культивування *in vitro* є головним вузьким місцем для застосування

редагування геному в різних видах рослин. У рамках італійського проєкту

«Biotech-GEO», спрямованого на розробку сортів базиліка, стійких до

пероноспорозу, розробка відповідного та швидкого протоколу для прямої

регенерації рослин має першочергове значення.



Рис. 3.14. *Ocimum basilicum* Геновезо, фаза вкорінення регенерованих рослин на МС PGR-free.

## ВИСНОВКИ

1. Запропоновані методи поверхневої стерилізації вузлових і листкових експлантів дозволили отримати 80-85% асептичних експлантів.

2. Найкращим ефективним регулятором росту рослин для індукції множинних пагонів і проліферації з вузлових експлантів *O. basilicum* L. є БАП 1,0 мг/л і КІН 2 мг/л.

3. Показано, що високе співвідношення БАП: НОК сприяє утворенню пагонів, але низьке співвідношення БАП: НОК індукує утворення коренів та індукцію калюсу в *O. basilicum* L.

4. Сім'ядольні вузли, культивовані на МС+TDZ (4 мг/л), були найкращим типом соматичної тканини для досягнення високого відсотка регенерації.

5. Показано, що додавання лише БАП до живильного середовища є ефективним для швидкого розмноження пагонів.

6. Для індукції коренів корекоректовано живильне середовище МС з додаванням ІМК 4,00 мг/л.

7. Ступінь індукції калюсу з листкових експлантів коливався в межах від 18 до 93% за різних регуляторів росту рослин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Peschel W, Sanchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzia L, et al. (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem* 97: 137-150.

2. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenol compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.

3. Rao KS, Chaudhury PK, Paradhan A (2010) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. *Food Chem Toxicol* 48: 729-732.

4. Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105: 940-949.

5. Cooper CS, Grover PL (2012) Chemical carcinogenesis and mutagenesis II. Cooper CS and Grover PL (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 164-170.

6. Javanraedi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM (2003) Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem* 83: 547-550.

7. Neacsu M, Vaughan N, Raikos V, Multari S, Duncan GJ, et al. (2015) Phytochemical profile of commercially available food plant powders: Their potential role in healthier food reformulations. *Food Chem* 179: 159-169.

8. Makri O, Kintzios S (2007) *Ocimum* sp. (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties and biotechnology. *J Herbs Spices Med Plants* 13: 123-150.

9. Simon JE, Morales MR, Phippen WB, Vieira RF, Hao Z (1999) Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In *Perspectives on new crops and new uses*, Janick J (Ed); ASHS Press: Alexandria, VA, pp 499-505.

10. Darrah HH (1980) *The cultivated basil*. Buckeye Printing Company. Independence, MO.

11. Simon JE, Morales MR, Phippen WB, Vieira RF, Hao Z (1990) Basil. A

source of essential oils. Janick J and Simon JE (Eds); Advances in new crops. Timber Press, Portland, OR, 484-489 p.

12. Marotti M, Piccaglia R, Giovannelli E (1996) Differences in essential oil composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivar related to morphological characteristics. *J Agric Food Chem* 44: 3926-3929.

13. Keita SM, Vincent C, Schmit JP, Belanger A (2000) Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour Fragr J* 15: 339-341.

14. Lawrence BM (1988) A World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, Washington, DC, USA 1986, Elsevier Sciences Publisher B.V.: Amsterdam 161.

15. Sanchez E, Garcia S, Heredia N, (2010) Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microb* 76: 6888-6894.

16. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S (2003) Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 51: 4442-4449.

17. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM, DeWit DL (2000) Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn.

*Phytomedicine* 7: 7-13

18. Wongsap P, Chaiwarit J, Zamaludien A (2012) In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chem* 131: 964-971.

19. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, et al. (1998) Anti HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biol Pharm Bull* 21: 829-833.

20. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 108: 986-995.

21. Prasad G, Kumar A, Singh AK, Bhattacharya AK, Singh K, et al. (1986) Antimicrobial activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. *Pitoterapia* 57: 429-432.

22. Rai MK, Qureshi S, Pandey AK (1999) In vitro susceptibility of opportunistic *Fusarium* spp. to essential oils. *Mycoses* 42: 97-101.

23. Denesi F, Elementi S, Neri R, Maranesi M, D'Antuono LF, Bordoni A (2008) Effect of cultivar on the protection of cardiomyocytes from oxidative stress by essential oils and aqueous extracts of basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 56: 9911-9917.

24. Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP, Vivanco IM (2002) Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and use in traditional medicines in Iran. *J Agric Food Chem* 50: 5878-5883.

25. Lee J, Scigel CF (2009) Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chem* 115: 650-656.

26. Lee J (2010) Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products. *J Funct Foods* 2: 158-162.

27. Kwee EM, Niemeyer ED (2011) Variations in phenolic compositions and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chem* 128: 1044-1050.

28. Mazumder A, Neamati N, Sunder S, Schulz J, Pertz H, et al. (1997) Curcumin analogues with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J Med Chem* 40: 3057-3063.

29. Juliani NR, Simon E (2002) Antioxidant activity of Basil. Trends in new crops and new uses. Janick J and Whipkey A (eds), ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 575-579.

30. Flanigan PM, Niemeyer ED (2014) Effect of cultivar on phenolic level, anthocyanin composition and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chem* 164: 518-526.

31. Izadiyan P, Hemmateenejad B (2016) Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. *Food Chem* 190: 864-890.

32. Koca N, Karaman S (2015) The effects of plant growth regulators and 1-phenylalanin on phenolic compounds of sweet basil. *Food Chem* 166: 515-521.

33. Grayer RJ, Kite GC, Veitch NC, Eckert MR, Marin PD, et al. (2002) Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochem Syst Ecol* 30: 327-342.

34. Gould KS (2004) Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J Biomed Biotechnol* 5: 314-320.

35. Holton TA, Cornishe EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanins biosynthesis. *The Plant Cell*: 1071-1083.

36. Gao X, Cassidy A, Schwarzchild MA, Rimm EB, Ascherio A (2012) Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson's disease. *Neurology* 78:

1138-1145.

37. Gross M (2004) Flavonoids and cardiovascular disease. *Pharm Biol* 42: 21-35.

38. Amrani S, Harnafi H, Gadi D, Mekhfi H, Legssyer A, et al. (2009) Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *J Ethnopharmacol* 125: 157-162.

39. Amrani S, Harnafi H, Bouanani NH, Aziz M, Serghini-Caid H, Manfredini S, Besco E, Napolitano M, Bravo E (2006) Hypolipidemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR

1339 in rats and its antioxidant property. *Phytother Res* 20: 1040-1045.

40. Zeggwagh NA, Sulpice T, Eddouks M (2007) Anti-hyperglycaemic and hypolipidemic effects of *Ocimum basilicum* aqueous extract in diabetic rats. *Amer J Pharm Toxic* 2: 123-129.

41. Zarlaha A, Kourkoumelis N, Stanojković TP, Kovala-Demertzi D (2014) Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells: Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. *Dig J Nanomater Biostruct* 9: 907-917.

42. Kathirvel P, Ravi S (2012) Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and Hep-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Nat Prod Res* 26: 1112-1118.

43. Sharafati-Chaleshtori R, Rokni N, Rafieian-Kopaei M, Drees F, Salehi E (2015) Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. *J Agr Sci Tech* 17: 817-826.

44. Perez RA, Navarro T, De Lorenzo C (2007) HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as source of flavour in “Campo Real” table olive preparations. *Flavour Fragr J* 22: 265-273.

45. Veillet S, Tomao V, Chemat F (2010) Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chem* 123: 905-911.

46. Carocho M, Barros L, Barreira JCM, Calhella RC, Soković M, et al. (2016) Basil as functional and preserving ingredient in „Serra da Estrela“ cheese. *Food Chem* 207: 51-59.

47. Razavi SMA, Mortazavi SA, Matia-Merino L, Hosseini Parvar S, Motamedzadegan A, et al. (2009) Optimisation study of gum extraction from Basil seed (*Ocimum basilicum* L.). *Int J Food Sci Tech* 44: 1755-1762.