УДК 576:57.085.23 https://doi.org/10.7124/FEEO.v39.1834

АЛЄКСЕЙШИНА В. В.[1]
БУЛКО О. В.[2]
ЛЬОШИНА Л. Г.[2]✉

[1] *ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна, 03022, м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2*
[2] *Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148*
✉ *llioshina@ukr.net*

САЛІЦИЛОВА КИСЛОТА ЯК СТИМУЛЯТОР ФЕНОЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У КУЛЬТУРАХ ВОЛОСИСТИХ КОРЕНІВ *OCIMUM BASILICUM* L.

Мета. Дослідження впливу саліцилової кислоти як еліситора на накопичення фенольних сполук у культурах трансформованих коренів hairy root двох сортів базиліку (*Ocimum basilicum* фіолетовий та *O. basilicum* лимонний). ***Методи***. Насіння базиліку вводили у культуру *in vitro* після поверхневої стерилізації та культивували на поживному середовищі МС. Культури трансформованих коренів отримували стандартним методом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації листкових експлантів рослин. Для стимуляції синтезу вторинних метаболітів застосовували еліситацію саліциловою кислотою у концентраціях 100 мкМ, 200 мкМ та 300 мкМ. Вміст фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом Фоліна-Деніса. ***Результати***. У ході дослідження було отримано культури трансформованих коренів обох сортів базиліку. Встановлено, що застосування саліцилової кислоти стимулює накопичення фенольних сполук у отриманих культурах. Для фіолетового базиліку максимальний вміст фенолів спостерігався при концентрації 200 мкМ, тоді як для лимонного базиліку – при 100 мкМ саліцилової кислоти. ***Висновки***. Еліситація саліциловою кислотою є ефективним підходом для стимуляції біосинтезу фенольних сполук у культурах трансформованих коренів базиліку. Оптимальна концентрація еліситора залежить від сорту рослини.

Ключові слова: вторинні метаболіти, еліситація, культура трансформованих коренів, саліцилова кислота, фенольні сполуки, hairy root, *Ocimum basilicum.*

Базилік (*Ocimum basilicum* L.) з родини *Lamiaceae* – однорічна трав'яниста ефіроолійна, лікарська та декоративна рослина, широко поширена в регіонах із тропічним і субтропічним кліматом, а також культивується в Європі, Азії та Північній Америці. Рослини роду *Ocimum* є важливим джерелом біологічно активних сполук, які широко використовуються у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості. Ефірна олія базиліку характеризується значною біологічною активністю та проявляє антимікробні, протигрибкові, антиоксидантні, цитотоксичні, протизапальні та антивірусні властивості, що зумовлює її застосування в традиційній і доказовій медицині (Zhakipbekov et al., 2024; Torres et al., 2018).

Хімічний склад рослин роду *Ocimum* добре вивчений і включає ефірні олії, фенольні сполуки, флавоноїди, терпеноїди та інші вторинні метаболіти. Основними компонентами ефірної олії є ліналоол, євгенол, метилхавікол та інші сполуки, які визначають фармакологічну активність рослин (Zhakipbekov et al., 2024; Srivastava et al., 2022).

Зростання попиту на біологічно активні сполуки рослинного походження, а також обмеженість природних ресурсів зумовлюють необхідність пошуку альтернативних джерел їх отримання. Хімічний синтез вторинних метаболітів часто є складним або економічно недоцільним через їхню складну структуру. У зв'язку з цим вирощування рослин в контрольованих умовах розглядається як ефективна альтернатива природній рослинній сировині, оскільки дозволяє

© 2026 Алєксейшина В. В., Булко О. В., Льошина Л. Г. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

отримувати цільові сполуки незалежно від екологічних і сезонних факторів (Pulvirenti et al., 2025).

Культури клітин, калюсів і органів рослин роду *Ocimum* активно досліджуються як модельні системи для вивчення біосинтезу біологічно активних речовин (Pandey et al., 2015). Особливу увагу привертають культури трансформованих коренів – «волосисті корені» або «hairy root», які мають низку переваг, зокрема високі темпи росту на середовищах без екзогенних фітогормонів, генетичну та біохімічну стабільність, відносну простоту культивування та здатність до синтезу вторинних метаболітів із біологічною активністю (Georgiev et al., 2007). Культури волосистих коренів рослин роду *Ocimum* вже використовуються як модельні системи для дослідження вторинного метаболізму та отримання фармакологічно цінних сполук (Srivastava et al., 2016). Показано, що культури волосистих коренів базиліка демонструють стабільний ріст і конститутивне виробництво ретиноєвої кислоти**,** яке може додатково підсилюватись при обробці еліситорами (Bais et al., 2002). Проте на сьогодні недостатньо даних про ефективність вторинного метаболізму у культурах волосистих коренів *Ocimum*.

У зв'язку з цим метою нашої роботи була індукція культури волосистих коренів базиліка, дослідження синтезу фенольних сполук та їх еліситація в культурі для підвищення біосинтезу вторинних метаболітів, що мають фармакологічну активність**.**

Матеріали і методи

У роботі використовували насіння виробництва Enza Zaden (Нідерланди) *O. basilicum* фіолетовий та *O. basilicum* лимонний. Введення рослин в культуру *in vitro* проводили із використанням комерційного стерилізуючого агента Естер Дез («ЕГХ», Україна), в якому витримували насіння протягом 35 хв. Пророщування насіння та подальше культивування рослин проводили на агаризованому середовищі МС (Murashige and Skoog, 1962) в контрольованих умовах термальної кімнати (фотоперіод 16/8, температура 22 ± 2^0C).

Генетичну трансформацію проводили із використанням агропінового штаму *Agrobacterium rhizogenes* A4 (сьогодні часто класифікується як *Rhizobium rhizogenes*) з векторною конструкцією pCB124, яка містила цільовий ген рекомбінантного людського інтерферону альфа-2b *(HuINFa-2b).*

Добову суспензійну культуру бактерій осаджували центрифугуванням (6500 об/хв, 4 °C, 10 хв). Осад ресуспензували у середовищі МС з додаванням 2,4-Д 2мг/л та 200 мкМ ацетосирингону з подальшим культивуванням на роторному шейкері (120 об/хв) при 27 °C протягом 1 години. Підготовлені двотижневі листкові експланти інокулювали дорощеною бактерією із застосуванням вакуумної інфільтрації (двічі протягом 2 хв).

Після 48-годинного співкультивування з бактерією експланти розміщували на середовище В5 (Gamborg et al., 1968), яке містило 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерії. Сформовану культуру, після відокремлення від первинних експлантів, субкультивували на безгормональному агаризованому або рідкому середовищі В5.

Мікроскопічний аналіз проводили на світловому мікроскопі МБС-9.

Для стимуляції біосинтезу вторинних метаболітів використовували саліцилову кислоту (СК) (хч) у концентрації 100 мкМ, 200 мкМ та 300 мкМ. Висушену рослинну сировину екстрагували у 70% етанолі протягомі 24 годин.

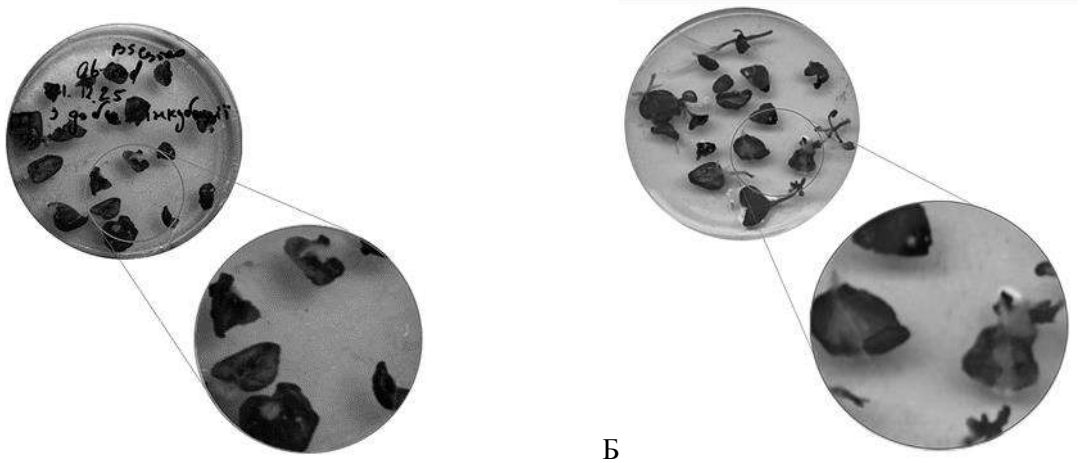
Загальний вміст фенольних сполук визначали методом Фоліна-Деніса (Singleton et al., 1999). Виміри проводили на спектрофотометрі Fluostar Omega (Німеччина).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Excel, стандартного пакета програм Microsoft Office (Microsoft, США). У таблицях та на малюнках представлені середньоарифметичні значення показників та їх стандартні помилки.

Результати та обговорення

На 14-й день культивування на листкових експлантах обох базиліків спостерігали ознаки утворення волосистих коренів, які характеризувалися пухнастою структурою та відсутністю геотропізму (рис. 1).

Сформовані волосисті корені відокремлювали від первинних експлантів та переносили на свіже безгормональне середовище В5 із зменшеною кількістю антибіотиків до повної елімінації бактерії. Після формування трансформованих коренів усі лінії, що мали ознаки культури волосистих коренів, відбирали для подальшого культивування.



А Б

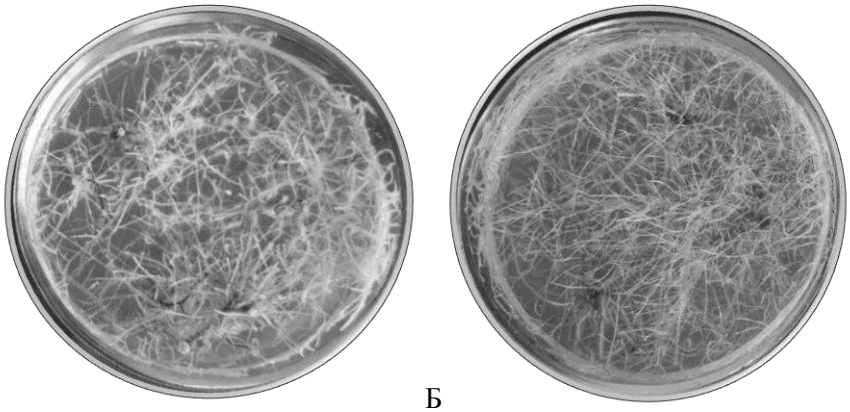
Рис. 1. Перші ознаки утворення культури волосистих коренів на 14-й день культивування. *O. basilicum* фіолетовий (А) та *O. basilicum* лимонний (Б)

В результаті було отримано культури волосистих коренів базиліку фіолетового та лимонного. Морфологічний аналіз показав, що корені обох різновидів мали подібні фенотипові ознаки характерні для hairy root, а саме – високу ступінь галуження, відсутність геотропізму та формування великої кількості бічних відгалужень (рис. 2).

Однак, між досліджуваними варіантами було виявлено певні відмінності. Зокрема, волосисті корені фіолетового базиліка характеризувалися дещо більш вираженою опушеністю (підвищеною щільністю кореневих волосків), що надавало їм візуально більш «пухнастого» вигляду порівняно з коренями лимонного базиліка (рис. 2А). Останні, хоча й мали схожий рівень галуження, мали відносно гладкішу поверхню з менш інтенсивним розвитком кореневих волосків (рис. 2Б).

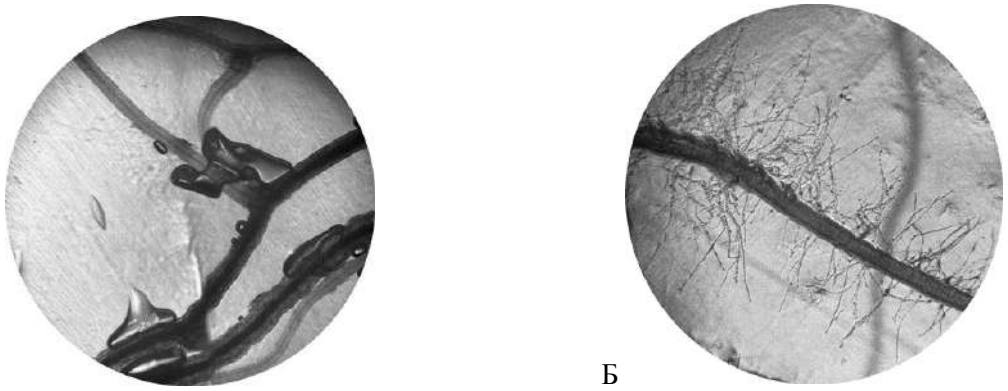
Отримані відмінності можуть бути зумовлені особливостями генотипу досліджуваних різновидів *O. basilicum*, що впливають на регуляцію морфогенезу кореневих волосків у трансформованих тканинах. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, де показано, що культури hairy root різних генотипів *Ocimum* можуть мати суттєву морфологічну відмінність, включаючи різницю у характері росту та структурній організації коренів (Kwon et al., 2021). Зокрема, встановлено, що такі відмінності є генотип-специфічними та можуть бути пов’язані з особливостями експресії *rol*-генів і внутрішнього гормонального балансу клітин (Srivastava et al., 2016).

Спостереження морфології отриманого коріння під світловим мікроскопом виявило різницю між інтактним корінням рослин і культурою волосистих коренів (рис. 3).



А Б

Рис. 2. Культура волосистих коренів на агаризованому середовищі: *O. basilicum* фіолетовий (А) та *O. basilicum* лимонний (Б).



А Б

Рис. 3. Відмінність інтактного коріння рослини (А) від первинного волосистого коріння (Б) під світловим мікроскопом.

Культура волосистих коренів характеризувалась добре розвиненою структурою з великою кількістю бічних коренів і численними та щільно розташованими кореневими волосками, що зумовлювало їх типовий «волосистий» фенотип (рис. 3Б). Натомість інтактні корені мали чітко організовану структуру, контрольоване галуження і локалізоване формування відносно рідких та більш потовщених кореневих волосків (рис. 3А).

Надалі ми вивчали вплив еліситорів для стимуляції біосинтезу вторинних метаболіті у культурі коренів. В якості еліситору було використано саліцилову кислоту, вибір якої та діапазону концентрацій ґрунтувався на даних наукових досліджень, у яких показано ефективність саліцилової кислоти для індукції накопичення вторинних метаболітів у культурах рослин *in vitro*. Зокрема, відповідно до експериментальної роботи (Bhaskar et al., 2022), саліцилова кислота достовірно впливала на рівень накопичення фенольних сполук та інших вторинних метаболітів, при цьому оптимальний ефект спостерігався за нижчих концентрацій еліситора. Саме на основі цих літературних даних було обрано відповідні концентрації СК для проведення власного дослідження.

До нарощеного трансформованого коріння у рідкому середовищі В5 додавали саліцилову кислоту у концентраціях 100 мкМ, 200 мкМ та 300 мкМ. Аналіз проводили через 10 діб культивування. На цей момент досліджувані корені візуально не відрізнялись від контрольного зразка. Виміряли вологу та суху масу коріння для визначення вмісту загальної вологи у зразках. Отримані результати не мали достовірної різниці, що свідчить про те, що осмотичні процеси в культурі залишались стабільними.

Сумарні фенольні сполуки визначали методом Фоліна-Деніса за рівнянням калібрувальної кривої та виражали у мг еквіваленту галової кислоти на г сухої маси.

Фенольні сполуки були обрані як аналітичний показник, оскільки вони є однією з основних груп вторинних метаболітів і відіграють важливу роль у захисних реакціях рослин, а їх біосинтез зазвичай індукується під дією стресових факторів або еліситорів.

Результати обрахунків для волосистого коріння *O. basilicum* фіолетового та *O. basilicum* лимонного наведено на рис. 4.

Вміст фенольних сполук у листках обох досліджуваних генотипів *O. basilicum* був вищим порівняно з культурами волосистих коренів, що культивувалися без еліситора. Зокрема, у листках фіолетового базиліку цей показник становив 4,74 мг/г, тоді як у відповідній культурі коренів без обробки саліциловою кислотою – лише 3,10 мг/г. Аналогічна тенденція спостерігалася і для базиліку лимонного: 4,77 мг/г у листках проти 3,26 мг/г у кореневій культурі.

Для *O. basilicum* фіолетового найбільш ефективною виявилася концентрація СК 200 мкМ, за якої вміст фенолів зростав до 4,108 мг/г, що приблизно на 32% більше порівняно до контролю (без СК). При концентрації СК 100 мкМ спостерігалося помірне підвищення до 3,46 мг/г, тоді як концентрація СК 300 мкМ призводила до зниження цього показника до 3,94 мг/г у порівнянні з СК200 мкМ (рис. 4А).

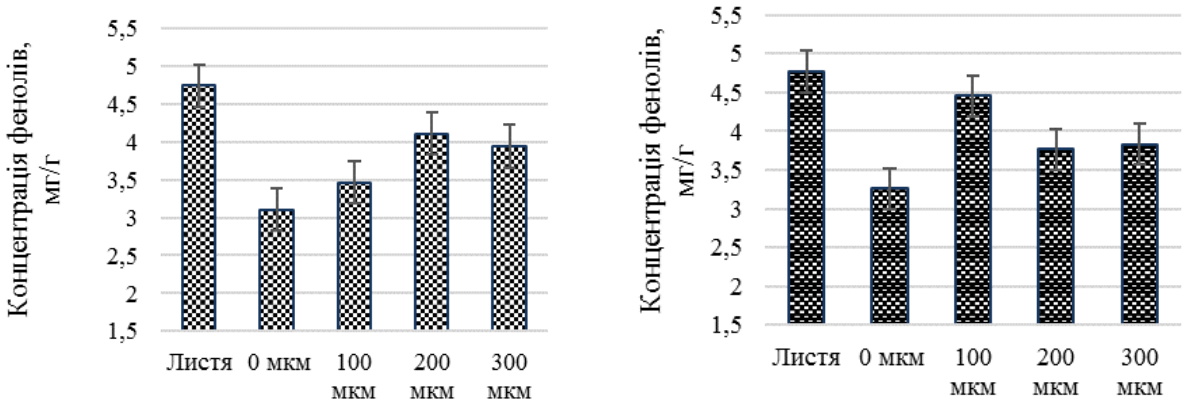


Рис. 4. Графік залежності вмісту фенолів в листках та культурі коренів *O. basilicum* фіолетового (А) та *O. basilicum* лимонного (Б) від концентрації саліцилової кислоти в культуральному середовищі.

У випадку *O. basilicum* лимонного реакція на еліситацію була більш вираженою при нижчій концентрації СК. Максимальний вміст фенольних сполук – 4,45 мг/г був при 100 мкМ СК, що майже на 37% перевищувало контроль. Подальше підвищення концентрації СК до 200 мкМ та 300 мкМ супроводжувалося зниженням рівня фенолів до 3,76 та 3,83 мг/г (рис. 4Б).

Ефект підвищення синтезу флавоноїдів був описаний у роботі Chen et al. (2006) (Chen et al., 2006), де було показано, що саліцилова кислота стимулює експресію та активність ключового ферменту фенілпропаноїдного шляху – фенілаланін-аміноліази, що призводить до підвищення рівня фенольних сполук у рослинних тканинах після обробки саліциловою кислотою.

Проведений аналіз показує, що оптимальна концентрація саліцилової кислоти для індукції біосинтезу фенольних сполук залежить від сорту рослини: для фіолетового базиліку – це 200 мкМ, а для лимонного – 100 мкМ. Але у жодному випадку синтез фенольних сполук у волосистих коренях не перевищує їх кількість у листках.

Проте отримані результати свідчать про підвищення синтезу фенольних сполук у культурах волосистих коренів базиліків внаслідок еліситації саліциловою кислотою.

Синтез фенольних сполук у культурі коренів базиліку відображає загальну перебудову метаболічних процесів, оскільки вторинний метаболізм функціонує як взаємопов'язана система (Vogt, 2010). Відповідно, зміни в одному біосинтетичному шляху супроводжуються змінами у синтезі інших груп вторинних метаболітів. Таким чином, додавання саліцилової кислоти може сприяти підвищенню загального рівня вторинного метаболізму у культурах трансформованих коренів роду *Ocimum.*

Висновки

У ході дослідження за допомогою *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано культури волосистих коренів *O. basilicum* (фіолетового та лимонного), які характеризувалися типовими морфологічними ознаками культури hairy root та відрізнялися від інтактного коріння за мікроскопічною структурою.

Встановлено, що еліситація саліциловою кислотою стимулює синтез фенольних сполук у отриманих культурах волосистих коренів, однак ефективність цього процесу залежить від концентрації еліситора та генотипу рослини. Для фіолетового базиліку оптимальною виявилась концентрація 200 мкМ, а для лимонного базиліку – 100 мкМ, за яких спостерігалось максимальне накопичення загальних фенольних сполук.

Підвищення концентрації саліцилової кислоти не призводило до подальшого зростання вмісту фенолів, а в окремих випадках знижувало його, що свідчить про дозозалежний характер відповіді та необхідність індивідуального підбору концентрації для кожного генотипу.

Порівняльний аналіз показав, що вміст фенольних сполук у листках інтактних рослин перевищує відповідні показники у культурах волосистих коренів без еліситації, але застосування оптимальної концентрації саліцилової кислоти

підвищує рівень їх накопичення та наближує його до показників у листках.

Отримані результати підтверджують, що застосування саліцилової кислоти як еліситора може бути ефективним підходом для інтенсифікації біосинтетичної активності культур трансформованих коренів рослин роду *Ocimum*.

Інформація про фінансову підтримку, подяки: відсутня.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References

1. Bais H. P., Walker T. S., Schweizer H. P., Vivanco J. M. Root-specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2002. Vol. 40, No. 11. P. 983–995. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01460-2.
2. Bhaskar R., Xavier L., Udayakumaran G., Kumar D., Venkatesh R., Nagella P. Biotic elicitors: a boon for the in vitro production of plant secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2022. Vol. 149, No. 1. P. 7–24. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1.
3. Chen J.-Y., Wen P.-F., Kong W.-F., Pan Q.-H., Zhan J.-C., Li J.-M., Wan S.-B., Huang W.-D. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology.* 2006. Vol. 40, No. 1. P. 64–72. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.017.
4. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* 1968. Vol. 50. P. 151–158.
5. Georgiev M. I., Pavlov A. I., Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2007. Vol. 74, No. 6. P. 1175–1185. https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5.
6. Kwon D. Y., Kim Y. B., Kim J. K., Park S. U. Production of rosmarinic acid and correlated gene expression in hairy root cultures of green and purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* 2021. Vol. 51, No. 1. P. 35–43. https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1789990.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497.
8. Pandey H., Pandey P., Singh S., Gupta R., Banerjee S. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma*. 2015. Vol. 252, No. 2. P. 647–655. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0711-3.
9. Pulvirenti L., Ferreri T., Strano T., Zappalà F., Infantino S., Caruso C., Morrone R., D'Antona N., Barbera A. C., Carrubba A., Napoli E. Effects of photoperiod on phytochemical profiles of four *Ocimum basilicum* genotypes in a hydroponic climate chamber. *Frontiers in Agronomy.* 2025. Vol. 7. P. 1653993. https://doi.org/10.3389/fagro.2025.1653993.
10. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 1999. Vol. 299. P. 152–178.
11. Srivastava S., Conlan X. A., Adholeya A. Chaill D M. Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2016. Vol. 126. P. 19–32. https://doi.org/10.1007/s11240-016-0973-x.
12. Srivastava S., Lal R. K., Yadav K., Pant Y., Bawitlung L., Kumar P., Mishra A., Gupta P., Pal A., Rout P. K., Chanotiya C. S. Chemical composition of phenylpropanoid-rich chemotypes of *Ocimum basilicum* L. and their antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products.* 2022. Vol. 183. P. 114978. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114978.
13. Torres R. G., Casanova L., Carvalho J., Marcondes M.C., Costa S. S., Sola-Penna M., Zancan P. *Ocimum basilicum* but not *Ocimum gratissimum* presents cytotoxic effects on human breast cancer cell line MCF-7, inducing apoptosis and triggering mTOR/Akt/p70S6K pathway. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2018. Vol. 50, No. 2. P. 93–105. https://doi.org/10.1007/s10863-018-9750-3.
14. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010. Vol. 3, No. 1. P. 2–20. https://doi.org/10.1093/mp/ssp106.
15. Zhakipbekov K., Turgumbayeva A., Akhelova S., Bekmuratova K., Blinova O., Utegenova G., Shertaeva K., Sadykov N., Tastambek K., Saginbazarova A., Urazgaliyev K., Tulegenova G., Zhalimova Z., Karasova Z. Antimicrobial and other pharmacological properties of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Molecules*. 2024. Vol. 29, No. 2. P. 388. https://doi.org/10.3390/molecules29020388.

ALIEKSEYSHYNA V. V.[1], BULKO O. V.[2], LIOSHYNA L. G.[2]

[1] Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Academician Glushkov Avenue, 2

[2] Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148

SALICYLIC ACID AS A STIMULATOR OF PHENOLIC METABOLISM IN HAIRY ROOT CULTURES OF *OCIMUM BASILICUM* L.

Aim. To investigate the effect of salicylic acid as an elicitor on the accumulation of phenolic compounds in hairy root cultures of two *Ocimum basilicum* cultivars (purple and lemon). ***Methods.*** Basil seeds were introduced into in vitro culture following surface sterilization and cultivated on MS nutrient medium. Hairy root cultures were obtained using the standard *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of leaf explants. To stimulate secondary metabolite synthesis,

cultures were elicited with salicylic acid at concentrations of 100 μM, 200 μM, and 300 μM. The total phenolic content was determined spectrophotometrically using the Folin–Denis method. ***Results.*** Hairy root cultures of both basil cultivars were successfully established. The application of salicylic acid was found to enhance phenolic compound accumulation in the obtained cultures. For the purple basil cultivar, the maximum phenolic content was observed at a concentration of 200 μM, whereas for the lemon basil cultivar, the optimum was 100 μM salicylic acid. ***Conclusions.*** Salicylic acid elicitation is an effective approach for stimulating the biosynthesis of phenolic compounds in hairy root cultures of basil. The optimal elicitor concentration is cultivar-dependent.
Keywords: *Ocimum basilicum*, culture of transformed roots, hairy root, elicitation, salicylic acid, secondary metabolites, phenolic compounds.

Надходження статті: 30 квітня 2026 р.
Прийняття до друку після рецензування: 15 червня 2026 р.
Публікація: 30 листопада 2026 р.