

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

12.02 – МР. 216 “С” 2023.02.15. 9 ПЗ

ДОЦЕНКО АЛІНИ АНДРІЇВНИ

2023 р.

НУБІП І УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 604.7:634.8

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій
та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В.

Кваско О.Ю.

(підпис)

« 17 » 07 2023 р.

(підпис)

« 17 » 07 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Оптимізація біотехнологічних етапів клонального мікророзмноження винограду (*Vitis vinifera* L.)»

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

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

Керівник магістерської
кваліфікаційної роботи

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Коломієць Ю.В.

(підпис)

(ПІБ)

Виконала

Доценко А.А.

(підпис)

(ПІБ студента)

КИЇВ - 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

Доценко Аліни Андріївни

(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 «Оптимізація біотехнологічних етапів
клонального мікророзмноження винограду (*Vitis vinifera* L.)»

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. Одержання стерильних експлантів рослин винограду *Vitis vinifera* L.
2. Індукція калюсних тканин *Vitis vinifera* L.
3. Вплив ферулової кислоти на якісний та кількісний склад фенольних сполук;
4. Вплив ферулової кислоти на вміст пластидних пігментів у досліджуваних екстрактах сортів рослин винограду.

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

Коломісць Ю.В.

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

Доценко А.А.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на тему: «Оптимізація біотехнологічних етапів клонального мікророзмноження винограду (*Vitis vinifera* L.)» обсягом 66 сторінок комп'ютерного тексту формату А4. Містить: 11 таблиць, 19 рисунків, 47 використаних джерел.

Структура дипломної роботи: ВСТУП, Розділ 1. Огляд літератури, Розділ 2. Матеріали і методи, Розділ 3. Результати та обговорення, ВИСНОВКИ, СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

Мета дослідження. Мета магістерської кваліфікаційної роботи – оптимізувати технологію мікроклонального розмноження різних сортів рослин винограду, оцінити якісний та кількісний склад фенольних сполук й пластидних пігментів в отриманій рослинній сировині за умов культивування рослин-регенерантів на поживному середовищі з феруловою кислотою.

Об'єкт дослідження – мікроклональне розмноження сортів винограду *Vitis vinifera* L.

Предмет дослідження – вплив клонального мікророзмноження рослин сортів винограду на агротехнічні та промислово-цінні показники.

Методи дослідження: біотехнологічні методи (культура ізольованих тканин і органів, мікроклональне розмноження), біохімічні (високоєфективна тонкошарова хроматографія, високоєфективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія), аналітичні, статистичні (статистичний аналіз отриманих даних).

Завдання дослідження:

– підібрати вихідний рослинний матеріал для мікроклонального розмноження;

– визначити оптимальний спосіб стерилізації експлантів;

– встановити оптимальний склад поживних середовищ для кожного етапу мікроклонального розмноження для отримання достатньої кількості посадкового матеріалу досліджуваних сортів;

– здійснити підбір компонентів поживного середовища для індукції калюсу та культивування калюсної тканини.

НУБІП України

– дослідити вплив ферулової кислоти на якісний та кількісний склад фенольних сполук;

– проаналізувати вміст пластидних пігментів у досліджуваних екстрактах сортів рослин винограду.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
Розділ I. Огляд літератури.....	9
1.1. Класифікація родини Виноградові.....	9
1.1.1. Систематика євразійського винограду.....	10
1.2. Морфологічна характеристика роду <i>Vitis</i> L.....	11
1.2.1. Традиційні способи вегетативного розмноження.....	15
1.3. Виноград в культурі <i>in vitro</i>	15
1.4. Отримання калюсної тканини.....	17
1.4.1. Отримання калюсу та його культивування.....	17
1.5. Мікроклональне розмноження.....	25
1.6. Умови синтезу фенольних сполук у рослин <i>Vitis Vinifera</i>	30
1.7. Використання фенольних сполук винограду.....	33
Розділ 2. Матеріали і методи.....	36
2.1. Введення в культуру.....	39
2.1.1. Підготовка рослинного матеріалу.....	39
2.1.2. Власне мікророзмноження.....	41
2.1.3. Укорінення рослин-регенерантів.....	42
2.2. Одержання калюсної тканини.....	42
2.3. Підбір поживного середовища для мікророзмноження.....	42
2.4. Визначення якісного та кількісного вмісту фенольних сполук.....	44
2.5. Кількісне визначення пігментів.....	47
2.6. Статистичний аналіз результатів.....	47
Розділ 3. Результати та обговорення.....	48
3.1. Визначення ефективного методу стерилізації.....	48
3.2. Введення в культуру <i>in vitro</i>	49
3.3. Мікроклональне розмноження рослин-регенерантів.....	50

3.4. Визначення оптимального складу поживного середовища для отримання калюсної культури.....	53
3.5 Дослідження якісного та кількісного вмісту фенольних сполук.....	56
3.6 Вплив ферулової кислоти на синтез пігментів	59
ВИСНОВКИ.....	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	64

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Виноград є однією з найважливіших плодкових культур, що вирощуються у світі. Це харчова, економічно та фармакологічно цінна культура. За даними асоціації «Український клуб аграрного бізнесу», з кожним роком відбувається нарощування обсягів імпорту столового винограду. Так, протягом 2021 року в нашу країну було завезено 34,5 тис. тонн плодів винограду, що на 44% та на 60% більше в порівнянні з 2020 та 2019 роками, відповідно. Виноград є цінною прибутковою культурою для України, однак, існує низка проблем, що унеможлиблює повноцінний розвиток цієї галузі.

Однією з таких, є майже недоступність до якісного та здорового посадкового матеріалу. Крім того, виноград зазвичай розмножується живцями, а іноді відводками та щепленням. Розмноження традиційними методами є досить довгим та повільним процесом і не може бути основою розвитку нових генотипів із бажаними ознаками.

Таким чином, необхідно оптимізувати процес мікророзмноження винограду для отримання здорового посадкового матеріалу задля економічного розвитку нашої держави. Більше того, клітини рослин винограду містять ряд вторинних метаболітів, серед яких важливе місце має поліфенол – ресвератрол. Він є потужним антиоксидантом, що сприятливо діє на ЦНС, серцево-судинну систему організму людини, має здатність пригнічувати розвиток ракових клітин [33]. У лабораторних умовах отримання поліфенолу можливе за рахунок виділення його із суспензійної культури. Тому, отримання стерильної культури рослин *Vitis vinifera* L. з найвищим вмістом ресвератролу є необхідним для подальшого культивування калюсної тканини, яка слугуватиме матеріалом досліджень для виділення корисної для здоров'я людини сполуки.

Мета дослідження. Мета магістерської кваліфікаційної роботи – оптимізувати технологію мікроклонального розмноження різних сортів рослин винограду, оцінити якісний та кількісний склад фенольних сполук й

пластидних пігментів в отриманій рослинній сировині за умов культивування рослин-регенерантів на поживному середовищі з феруловою кислотою.

Об'єкт дослідження – мікроклональне розмноження сортів винограду

Vitis vinifera L.

Предмет дослідження – вплив клонального мікророзмноження рослин сортів винограду на агротехнічні та промислово-цінні показники.

Для досягнення сформульованої мети було поставлені такі основні завдання:

– підібрати вихідний рослинний матеріал для мікроклонального розмноження;

– визначити оптимальний спосіб стерилізації експлантів;

– встановити оптимальний склад поживних середовищ для кожного етапу мікроклонального розмноження для отримання достатньої кількості посадкового матеріалу досліджуваних сортів;

– здійснити підбір компонентів поживного середовища для індукції калюсу та культивування калюсної тканини.

– дослідити вплив ферулової кислоти на якісний та кількісний склад фенольних сполук;

– проаналізувати вміст пластидних пігментів у досліджуваних екстрактах сортів рослин винограду.

Розділ I. Огляд літератури

1.1. Класифікація родини Виноградові

За систематичною характеристикою родина виноградових *Vitaceae* Juss.

Належить до порядку Крушинові (*Rhamnales*) підкласу Розиди (*Rosidae*), класу Дводольні (*Dicotyledones*), типу покритонасінні (*Angiospermae*), підцарства Вищі рослини (*Embryobionta*), царства Рослини (*Vegetabilia*) [5].

Родина Виноградові об'єднує 14 родів, що налічує 176 видів. Серед усіх родів, практичне значення мають, насамперед *Vitis*, а також *Partenocyssus*, *Ampelopsis*, *Tetrastigma* та *Cissus*. Найбільш чисельним родом є – *Cissus*, що налічує більше 350 видів, поширених в тропічній і субтропічній зонах Америки, Азії та Австралії. В еволюції родини Виноградові цей рід виконує роль ключового, адже з нього походять всі інші роди. *Cissus* – товзучі, шоді прямиостоячі чагарники з невеликою кількістю вусиків або без них. Всі представники роду використовуються переважно в кімнатному та оранжерейному квітництві й у декоративному садівництві (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Один з видів роду *Cissus* в озелененні
(фото з мережі Інтернет)

Рослини родини *Vitaceae* поширені на території помірної, субтропічної і тропічної зон. Дикорослі види ростуть переважно в лісах, на схилах гір, у долинах рік, іноді – в засушливих місцях. Варто зазначити, що багато видів не вивчено та їх геноми не встановлені (*) (рис. 1.2).

Родина <i>Vitaceae</i> <i>Juss. (976)</i>		
Роди		
<i>Cyphostemma</i> Alst. 2 n = 20, 22, 44, 66 (230)	<i>Cissus</i> L. 2 n = 24, 26, 28, 36, 40, 48, 50, 96 (319)	<i>Cayratia</i> Juss. 2 n = 30, 40, 60, 80 (61)
<i>Tetrastigma</i> Mid. 2 n = 22, 44, 52 (120)	<i>Acareosperma</i> <i>Gagner.</i> * 2 n = ?? (1)	<i>Clematicissus</i> Planch. 2 n = 40 (1)
<i>Rhoicissus</i> Planch. 2 n = 40 (12)	<i>Pterisanthes</i> Blume. * 2 n = ?? (20)	<i>Ampelocissus</i> Planch. 2 n = 40, 80 (90)
<i>Vitis</i> L. 2 n = 38, 40 (78)	<i>Pterocissus</i> Urb. et <i>Ek.</i> * 2 n = ?? (1)	<i>Partenocissus</i> Planch. 2 n = 40 (19)
<i>Landukia</i> Planch. 2 n = 40 (1)	<i>Ampelopsis</i> Michx. 2 n = 40 (23)	

Рис. 1.2. Схема відомих родів родини Виноградові [5]

Усі види роду *Vitis* є однаковими за походженням та слугують матеріалом для виведення нових сортів. Істотні відмінності між видами залежать від екологічних умов зростання. За походженням їх поділяють на три групи: євразійські, східно-азійські та американські види.

Східно-азійська група є найбільш чисельною групою, що налічує 44 види винограду.

Євразійська група представлена видом *Vitis vinifera* L., що поширений в дикій та культурній природі.

Американська група представлена 30 видами.

1.1.1. Систематика євразійського винограду

Євразійський виноград *Vitis vinifera* L. культивується в усьому світі та має широкий кліматичний ареал зростання – від помірної до тропічної

клімату. Це одна з найдавніших культур, яка тісно пов'язана з історією людства.

Усі культурні сорти європейсько-азіатського винограду походять від лісового дикого винограду – *Vitis vinifera* L. subsp. *Silvestris* Gmel. Назва виду походить від латинського слова, що в перекладі означає «той, що дає вино».

Це ліана або сланкий чагарник, якому притаманний великий поліморфізм морфологічних ознак листків, насіння, грона та ягід. Він не стійкий до філоксери, морозу та є сильно вразливим до грибних захворювань; вологолюбний, якість плодів є кращою за американські види; розмножується насінням.

За А. М. Негрулем, усі сорти культурного євразійського винограду мають три еколого-географічні групи: східні, західноєвропейські та види басейну Чорного моря.

1.2. Морфологічна характеристика роду *Vitis* L.

Більшість представників роду *Vitis* L. – плетучі чагарники, або повзучі ліани, з розвиненими вусиками, які обвиваються навколо опори. Вусики рослини гіллясті, без потовщень, стеблового походження, представляють видозмінені суцвіття, що стали безплідними. Листки цілокраї.

Суцвіття представлене складною китицею. У винограду воно формується зі спеціалізованого сильно розгалуженого генеративного пагону, який має кілька віток (осей) розгалуження. Головна вісь суцвіття та її бічні відгалуження довго зберігають активну верхівкову меристему, утворюючи невизначену кількість квіток. Квітки дрібні, двостатеві, нерідко і одностатеві (ті, в яких нерозвинені тичинки або маточка). Чашечка, зав'язь та віночок 5-4-членні. Слаборозвинена чашечка, розташована біля основи квітки у вигляді валика з невеликими малопомітними зубчиками. Пелюстки віночка розміщені почергово з чашолистками і при розпусканні бутонів або відгинаються назад, або, зростаючи з верхніми частинами, опадають у вигляді ковпачка [14]. При основі зав'язі часто розвивається залозистий нектарний диск. Тичинок (3)4-5, які розміщені проти пелюсток в одне коло. Між тичинками та зав'яззю

знаходиться нектарник. Зав'язь верхня, з двома пилковими гніздами, у кожному гнізді розташовані два сім'язчатки [14].

Плід — ягода, що включає 2-4 насінини з твердою оболонкою. Насіння дрібне, з коротким або видовженим носиком, грушоподібної форми, з ендоспермом.

Квітка винограду правильна. Однак у деяких американських видів квітки з недорозвиненою маточкою, тобто функціонально чоловічі, у європейських сортів є квітки з недорозвиненим пилком. Такі рослини вимагають сортів-запилювачів. В окремих сортів винограду зустрічаються

квітки, які мають два кола тичинок (друге коло розвивається в нектарників), квітки з махровим віночком і добре розвинутою чашкою, а також квітки з віночком, що не опадає. Він відкривається вільними пелюстками, що залишаються на квітколожі.

Двостатева квітка має коротку квітконіжку і плоске квітколоже, що розширюється. На ньому розвивається оцвітина. Він складається з редукованої чашечки і віночка з п'яти зрощених зелених пелюсток.

Квітка має нектарники, що складаються з п'яти залоз, які зрослися з основою. Між залозами формуються п'ять тичинок, що мають довгу тичинкову нитку та великий пиляк. Центральну частину квітколожа займає маточка (рис. 1.3). Її зав'язь розділена стінкою двох зрощених плодолистиків і має два невеликі гнізда. Кожний плодолистик включає два сім'язчатки.

Товста стінка зав'язі переходить у короткий стовпчик із округлою приймочкою. За зовнішнім виглядом маточка схожа на плід груші.

У квітконіжку входить 15-18 пучків, які розгалужуються в квітколожі і проходять у всі елементи квітки. У зрілій ягоді вони утворюють «віник», що залишається на квітколожі, якщо ягоду відірвати.

У квіток винограду пиляк і приймочка маточки дозрівають одночасно.

Пилок, що потрапив на приймочку, проростає через стовпчик до сім'язчатків і відбувається запліднення [14].

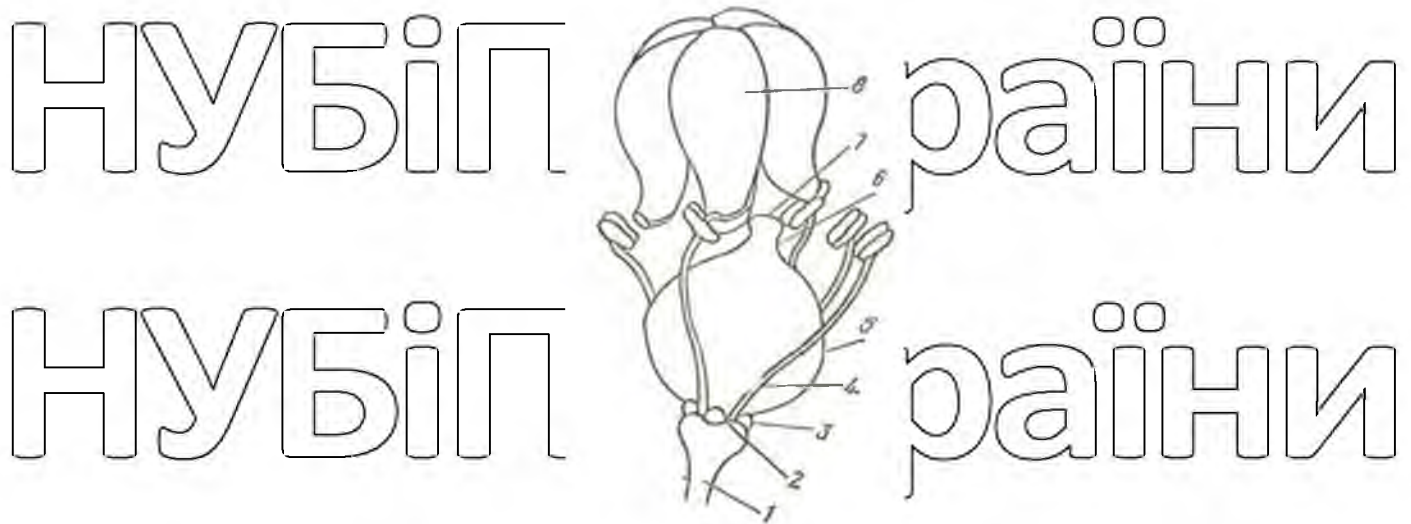


Рис. 1.3 [14]. Двостатевий квітка винограду: 1 – квітколоже; 2 – чашолистки; 3 – нектарник; 4 – тичинка; 5 – зав'язь; 6 – стовпчик; 7 – приймочка; 8 – віночок

Система пагонів куща винограду формується у кожного по-своєму.

Однак, незалежно від цього формування, головними є однорічні пагони, оскільки виноград плодоносить лише на поточному прирості.



Рис. 1.4. Будова метамера однорічного пагону [14]: 1 – листок; 2 – стебло; 3 – брунька

Однорічний пагін розвивається з генеративної бруньки, оскільки в ній закладені всі елементи пагону: листки, вузли, міжвузля, вусики та суцвіття.

Брунька має верхівкову меристему, яка здатна утворювати нові елементи пагону, тобто це листя, вузли, міжвузля, вусики та суцвіття. Під час росту бруньки першими розвиваються раніше закладені у ній елементи, потім нові, які утворені верхівковою меристемою. Частину стебла з брунькою, міжвузлям

та листком називають метамером, з яких і складається пагін (рис. 1.4). Закладення вусиків та суцвіття відбувається у бруньці як осьове завершення пагону. Листкорозгашування винограду є почерговим. Для пагону характерним є верхівковий ріст шляхом розтягнення міжвузлів, за рахунок меристеми, що залишилася у відповідних вузлах.

Бруньки винограду закладаються в пазусі кожного листка і верхівки пагону та розрізняються за будовою.



Рис. 1.5. Молоде суцвіття з бутонами [14]. 1 – моцода пазушна брунька; 2 – бічна брунька; 3 – вісь суцвіття, яке продовжує міжвузля

Пазушні бруньки починають формуватися у бруньці попереднього року з моменту закладання листкових зародків (листяних горбків). Вони утворюються в пазусі первинного листка у вигляді меристематичного горбка, що розвивається у міру росту пагону. У бруньці утворюється зовнішнє лускате листя, яке зовні закривають метамери майбутнього пагону. В пазусі лускатого листя з'являються 3-7 бічних бруньок, в яких також закладаються метамери пагонів. Вічко винограду (пазушна брунька) має головну бруньку і кілька бічних. Вони здатні проростати в рік утворення, утворюючи однострічні пагопи (рис. 1.5). У бруньках, починаючи з четвертого-п'ятого вузла, у сприятливих умовах, закладаються суцвіття в міру зростання пагону. Однак суцвіття не формуються вище за перший вусик. Спільці бруньки винограду утворюються з пазушних бруньок, які не проросли. Вони зосереджуються в частині гілки з корвою і часто багаторазово розгалужуються.

1.2.1. Традиційні способи вегетативного розмноження

Основним способом вегетативного розмноження винограду є розмноженням однорічними осінньо-зимовими живцями (чубуками).

Традиційно, культурні сорти винограду з насінни не вирощують, оскільки такі нащадки не зберігають однорідності генотипу, виростають слабкими та потребують різних агротехнічних умов покращення якості. Однак, даний спосіб розмноження можна застосувати в селекційній роботі [15].

За розмноження чубуками, пагони для живцювання зрізають восени, перед укриттям виноградника, і зберігають їх до весни. Зрізані, звільнені від листків пагони, довжиною до 120 см, зв'язують в пучки по 100-200 шт. Потім обробляють дезінфікуючими розчинами – 0,5% хінозолом та інсектофунгіцидом [14]. Зберігають посадковий матеріал в сховищах, підвалах та траншеях, прикривши його плівкою. Під час зберігання підтримують температурний режим повітря на рівні 2-6 °С і вологості 90-95%. Під кінець зберігання зрізи чубуків стають зеленими, а бруньки готові до проростання [16].

Також ефективним способом вегетативного розмноження є розмноження зеленими живцями. Призначають для швидкого розмноження нових та цінних сортів винограду, які були отримані селекціонерами або наявні в обмеженій кількості.

Розмноження відводками виконують у наступний спосіб: зрілий пагін закопують в неглибокій ямці, залишаючи на поверхні лише верхівку. В підземній частині молодих пагонів утворюються бічні корені, і молодий пагін частково переходить на самостійне кореневе живлення. Даний спосіб використовують для важко вкорінених сортів, в домашньому садівництві, при реконструкції виноградника.

Також поширеним способом вегетативного розмноження є щепи.

1.3. Виноград в культурі *in vitro*

Метод мікроклонального розмноження рослин (МКР) комерціалізується в усьому світі. Він є досить поширеним методом в роботі з рослинним

матеріалом. Метод набув поширення в роботі з трав'янистими рослинами, деревними породами, ягідними та плодовими культурами тощо. Застосування МКР у сільськогосподарському рослинництві дає змогу отримати здоровий посадковий матеріал, стійкий до хвороб та несприятливих змін ґрунтових та кліматичних умов; отримати з удосконаленими потрібними якостями високоврожайні сорти. Саме ці напрямки застосовують для культури винограду. Вони забезпечують якість та рентабельність насаджень. Тому, МКР для цієї проблематики є актуальним і цьому методу приділяється особлива увага.

Наукові дослідження з культури тканин винограду беруть свій початок в 70-х роках ХХ століття. Початкові роботи у даному напрямку належать G. Motel [43], M. Mullins [36], R. Galzy [28]. Головним чином, дослідження були спрямовані на дослідження методів культивування клітин, тканин та органів винограду в умовах *in vitro*.

У 80-90-х роках були проведені дослідження по вирощуванню рослин з важкопророзчуваного насіння; отриманню асептичних рослин зі здерев'янілою лозою; розробці методу щеплення винограду в умовах *in vitro*; регенерації рослин винограду на рідкому поживному середовищі в асептичних умовах; отриманню вільних від вірусних інфекцій рослин із застосуванням культури меристем та термотерапії; індукції ембріогенезу з експлантів пагонів тощо [7].

У даний час дослідження культури тканин винограду представлені у багатьох країнах світу: Україні, Румунії, Молдові, Австрії, Франції, Італії, Канаді, Новій Зеландії, Німеччині, США, Угорщині. Більшою мірою розробки спрямовані на оптимізацію МКР для отримання вегетативних та генеративних нащадків: отримання базових маточкових рослин сортів, клонів та гібридів винограду *in vitro*, отримання адаптованих рослин, культивованих *in vitro*, до різних світлових умов, температурних режимів; застосування методик соматичного ембріогенезу зі суспензійних культур винограду тощо.

Упродовж всього розвитку МКР рослин винограду накопичився ряд винаходів, патентів з даної тематики. Однак, кожному з них має місце доопрацювання, удосконалення. Більшою мірою, вони характеризуються підбором поживного середовища для задоволення кінцевої мети, спрямованістю на використання генетичних принципів, отримання поліплоїдів, отримання та розмноження якісніших нових сортів винограду, розробку способів довготривалого зберігання винограду в культурі *in vitro* [7]. Досить часто клональне мікророзмноження застосовують для вибраних генотипів *Vitis* з використанням культури інтактних або фрагментованих апікальних меристем пагонів, мікрокрізів пазушних бруньок або шляхом формування адвентивних бруньок.

Оскільки виноградарство є перспективною економічною галуззю, зокрема, в Україні, наразі й надалі проводяться дослідження, спрямовані на розвиток методик мікроклонального розмноження винограду.

1.4. Отримання калусної тканини

Сучасні біотехнологічні розробки великою мірою засновані на методи культурі клітин, тканин, і органів рослин та спрямовані на культивування в стерильних умовах *in vitro* рослинних клітин. За основу розробки взята здатність рослинних клітин продукувати в стерильних умовах біологічно активні речовини вторинного синтезу (алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони тощо), важливі для медицини, фармакології, ветеринарії, парфумерії та інших напрямків промисловості. У рослин винограду – це поліфенол – ресвератрол. Зазвичай, вторинні речовини отримують з калусної тканини *in vitro*, вирощеної на щільному (агаризованому) або рідкому (суспензійна культура) поживному середовищі. Продуктивність культивованих клітин може значно перевищувати продуктивність інтактних (природних) рослин.

1.4.1. Отримання калусу та його культивування

Калос – це гетерогенна структура, особливий тип тканини, яка виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин, представляє собою зкупчення недиференційованих клітин. У природному середовищі калос

утворюється на місці поранення рослини (рис.1.6). Ця тканина захищає травмоване місце, накопичує поживні речовини і сприяє регенерації захисного шару поверхневої тканини або втраченого органу (явище тотипотентності).



Рис. 1.6. Калюсна тканина винограду в умовах *in vivo*
(фото з мережі Інтернет)

Початкові дослідження по вирощуванню калюсу були проведені Фехтінгом у 1892 році. Він зробив спробу встановити мінімальний розмір експланту для формування калюсу. Вчений вирощував тонкі зрізи кореня буряка та кульбаби, серменти тополі на піску із застосуванням водопровідної води без стерильних умов. Було встановлено, що калюс утворюється при товщині зрізів не менше, ніж 1,5 мм.

Важливо зазначити, що розмір утворення калюсу залежить від розмірів експланта, який для цього застосовують. Для кожного виду рослин існує мінімальний розмір для культивування. Таким чином, маса утвореного калюсу залежить від розмірів, і, відповідно, числа клітин у експлантів різних видів рослин.

Вперше калюсна тканина була отримана Р. Готре у 1938 році. У своїх дослідженнях він використовував камбій та флоему кореня моркви. Додавши до поживного середовища ауксин, вчений показав його здатність стимулювати ділення клітин камбію. Так, гормони ауксини та цитокініни – індукують утворення калюсу і в тих тканинах рослини, які не здатні його утворювати у відповідь на поранення.

Американський вчений Уайт в ході своїх експериментів у 1931 році показав здатність калюсу до необмеженого росту при перенесенні його на свіже поживне середовище.

Калюс також може утворитися в результаті проліферації (розростання тканини організму шляхом ділення клітин) внутрішніх тканин експланту без зв'язку з поверхнею зрізу через порушення гормонального балансу. Таким чином, проліферація – це новоутворення вже існуючих клітин та тканин шляхом розмноження.

Процес отримання первинного калюсу та його культивування вимагають додержання умов стерильності поживного середовища, посуду, інструментів і лабораторного приміщення. Рослинний матеріал сам по собі може слугувати джерелом зараження, оскільки на його поверхні завжди знаходиться епіфітна мікрофлора. Для поверхневої стерилізації необхідно спочатку ретельно вимити експланти з мильним розчином та промити дистильованою водою. Потім рослинний матеріал піддається стерилізації різноманітними хлоровмісними речовинами (гіпохлорит натрію, гіпохлорит кальцію, хлорамін, хлорне вапно), речовинами із вмістом ртуті (сулема, діюцид), а також діоксидом водню та етанолом [2, 4, 11]. Рідше для даних цілей використовують сполуки бром, сірчану кислоту, фенол та антибіотичні речовини. Вибір стерилізуючої речовини підбирають в залежності від рослинного об'єкту (таблиця 1.1). Особливість вибору хімічної речовини відповідає такому, щоб вона мала згубний вплив на всі мікроорганізми, але мінімально пошкоджувала тканини рослини.

Таблиця 1.1
Стерилізація вихідного матеріалу [4]

Об'єкт	Час стерилізації, хв			
	Діюцид (0,1%)	Гіпохлорит Натрію, Кальцію (5- 9%)	HgCl ₂ (0,1%)	H ₂ O ₂ (10-12%)
Сухе насіння	15-20	15-20	10-15	12-15

Продовження таблиці 1.1

Бологе насіння	6-16	10-15	6-8	6-8
Пагони	20-40	20-25	20-25	-
Листя	1-3	3-6	0,5-3	3-5

Окрім того, стерилізуюча речовина повинна легко змиватися при промиванні дистильованою водою. В іншому випадку, відбудеться отруєння тканин і це негативно вплине на подальший хід експерименту при культивуванні. Підбір стерилізації матеріалу проводиться експериментально для кожного об'єкту, застосовуючи відомі правила та розчини.

Очищений фрагмент тканини чи органу (експлантат) для культивування поміщають на відповідне для нього стерильне поживне середовище, який через деякий час починає рости та утворювати масу недиференційованих клітин – калюс.

Склад поживних середовищ може бути різним, однак всі вони повинні містити необхідні для розвитку рослинних компонентів макроелементи, мікроелементи, джерела вуглецю, вітаміни, в окремих випадках – гормони та регулятори росту (таблиця 1.2). Клітини в культурі є гетеротрофами, тому їм необхідні вуглеводи. Тому, джерелом вуглецю в поживному середовищі є глюкоза або сахароза в концентрації 20-40 г/л. Сахароза при автоклавуванні середовища гідролізується до більш доступних для засвоєння рослиною моносахаридів.

Основою всіх поживних середовищ для вирощування ізолюваних тканин рослин є мінеральна основа – мікро- та макроелементи: азот, фосфор, сірка, цинк, мідь, молібден та інші. Азот надходить до середовища у вигляді нітратної або амонійної солі, сірка – у вигляді сульфату, залізо вводять у вигляді неорганічних солей або солей органічних кислот у вигляді хелату, фосфор – у складі фосфату. До складу всіх поживних середовищ входять іони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Майже всі живильні середовища (особливо для суспензійних культур клітин) містять групу мікроелементів: В, Мп, І, Сп, Zn, Мо, Со. Також, більшість поживних середовищ для культивування клітин і тканин містить

вітаміни: піридоксин, аскорбінова кислота, пантотенова кислота, рибофлавін, біотин, тіамін.

Необхідним компонентом для культивування калюсу є фітогормони – ауксини та цитокініни, співвідношення яких повинно бути 10:1. Для отримання калюсу та його розмноження в якості ауксинів найчастіше використовують 2,4-Д, α -нафтилоптова кислота або ІОК. ІОК є природним ауксином, який легко окислюється в клітинах. Її додають до середовища у великих кількостях та рідко використовують в якості єдиного ауксину.

6-фурфуриламінопурин або кінетин є обов'язковим компонентом для індукції ділення клітин – цитокінін. Більш активним є 6-бензиламінопурин (БАП).

Для утворення первинного калюсу, рідше – для підтримки його росту, до поживного середовища додають комплексні органічні добавки: солодовий, дріжджовий, картопляний екстракт; березовий, томатний, апельсиновий соки; незрілі ендосперми злаків чи кокосового горіха; гідролізат казеїну, суміш амінокислот. Разом з тим, додавання добавок є недосконалим, адже вони у своєму складі містять невідомі фактори росту.

Компоненти поживного середовища мають свої особливості, однак існує таке, що має універсальний підбір складових для багатьох видів культур рослин. Таким живильним середовищем є Мурасіге і Скуга. Поживне середовище Гамборга та Евелега використовують при культивуванні клітин і тканин бобових рослин та злакових. Середовище Уайта є оптимальним для укоріненні пагонів та нормалізованого росту стеблової частини рослини. Середовище Ніча та Ніч рекомендують для індукції андрогенезу у культурі пшавків, а також морфогенезу у злаків [4].

Таблиця 1.2.

Склад середовищ для вирощування калюсних тканин рослин [11]

Компоненти середовища	Основне середовище, мг/л				
	Гамборга та Евелега	Мурасіге і Скуга	Ніча та Ніч	Шенка і Хільдебрандта	Уайта

Продовження таблиці 1.2

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$				300	
NH_4NO_3		1650	720		
KNO_3	2500	1900	950	2500	80
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	440	166	200	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ безводний					208,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	370	185	400	360
KH_2PO_4		170	68		
KCl					65
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	169,6				18,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134				
Na_2SO_4					200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28,0	27,8	27,8	15,0	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3	20,0	
H_3BO_3	3,0	6,2	10,0	5,0	1,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	8,6	10,0	1,0	3,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,2	0,001
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025		0,1	
KI	0,75	0,83		1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,1	0,0025
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	13,2	22,3	25,0	13,2	7,0
Мезоінозит	100,0	100,0	100,0	1000,0	
Гліцин		2,0	2,0		3,0
PP	1,0	0,50	5,0	5,0	0,5
Фолієва кислота			0,5	0,0	
Біотин			0,05		
B_1	10,0	0,10	0,5	5,0	0,1
B_6	1,0	0,5	0,5	0,5	0,1
ІОК		0,2			
2,4-Д	2,0			0,5	
Кінетин		0,2			
Сахароза	20000	30000	20000	30000	20000
Агар	7000	8000	7000	6000	7000
pH			5,6-5,8		

Вирощування калосу може бути безперервним процесом. Для цього необхідно кожні 3-4 тижні пересаджувати частину матеріалу на свіже живильне середовище. Для кожного такого циклу вирощування характерним є звичайний для рослинної клітини онтогенез: розтягнення клітин, диференціація їх як зрілих калусних клітин, деградація [11]. Щоб не відбулося

відмирання калюсних клітин, первинний калюс переносять на свіже живильне середовище кожні 28-30 днів [8]. Склад нового поживного середовища залежить від цілі подальшого дослідження.

Процес утворення маси недиференційованих клітин називають калюсоутворенням, або калюсогенезом. Для калюсних клітин характерними є процеси диференціації – утворення відмінностей між материнськими і дочірніми клітинами, а також між дочірніми клітинами. Шляхом диференціації схожі між собою клітини набувають морфологічні відмінності та починають виконувати нові фізіологічні функції. Таким чином, ембріональна, меристематична клітина перетворюється у спеціалізовану. Водночас, процесу утворення *in vitro* первинного калюсу сприяє процес недиференціації: клітини втрачають свою структуру, характерні специфічні функції та повертаються до клітин, що діляться.

Для калюсної тканини, що культивується поверхневим способом на агаризованому середовищі характерна аморфною маса тонкостінних паренхімних клітин, що не мають визначеної анатомічної структури. Колір такої маси клітин може бути білим, жовтуватим, рідше – зеленуватим, дуже рідко – червоним, рожевим. Темно-коричневе забарвлення свідчить про старіння калюсних клітин і пов'язане з накопиченням в них окислених фенольних сполук – хінонів [10]. У залежності від походження й умов культивування калюсні тканини бувають [8]:

- пухкі, сильно наповнені водою, легко розпадаються на окремі клітини;
- середньої щільності, з добре помітними меристематичними осередками;
- щільні, які мають зони редукованого камбію та провідних елементів (судин).

Зазвичай, калюсні тканини, які культують на середовищі, яке збагачене ауксинами, утворюється непігментований пухкий калюс. З такого калюсу дуже легко отримати суспензійну культуру при переміщенні його у рідке середовище. Найбільша здатність до морфогенезу характерна щільній калюсній тканині, яка повільно росте.

Процес утворення калюсу залежить від декількох факторів:

1) частини рослини, яку використовують для культивування. Утворення калюсу відбувається з паренхіми та в області первинних та вторинних меристем.

2) розміру експланту. Більший за розміром експлант спричиняє утворення більш складного та різноманітного набору клітин;

3) вік тканин. Молоді тканини швидше утворюють калюс, ніж зрілі. Тому, для отримання калюсу використовують тканини та органи паростків;

4) полярність рослини. На частинках стебла утворення калюсу буде більш інтенсивне на тій стороні експланту, яка на рослині ближча до кореня. Тому, експланти поміщають на агар апікальною стороною.

Крива росту калюсних клітин має S-подібну форму. Традиційно, має шість фаз, які легко можна виявити при культивуванні поверхневим способом та в рідкому середовищі:

1) латентна (лаг-фаза) – видимий ріст відсутній, відбувається активне поглинання клітинами води та поживних речовин, підготовка клітин до ділення;

2) експоненціальна (логарифмічна) фаза – найбільша мітотична активність клітин, постійне прискорення швидкості росту клітин та зростання маси калюсної культури;

3) лінійна – коротка, швидкість росту клітин залишається постійною;

4) фаза сповільнення росту – швидкість росту клітин постійно зменшується;

5) стаціонарна фаза – число клітин, що діляться, пропорційне числу відмерлих клітин;

6) фаза загибелі, відмирання.

Перехід клітин з однієї фази в іншу контролюється внутрішніми (проліферативний пул, тривалість розтягування, стан клітин) та зовнішніми (склад поживного середовища, рівень рН, вміст кисню, температура, щільність посіву тощо) факторами.

1.5. Мікроклональне розмноження

Метод мікроклонального розмноження рослин (МКР) є досить широко застосовуваним та ефективним методом в роботі з рослинним матеріалом.

Клональним мікророзмноженням називають процес масового безстатевого швидкого розмноження рослин в культурі тканин і клітин, за рахунок якого новоутворені форми рослин генетично ідентичні вихідній. У основі мікророзмноження лежить здатність рослинної клітини до тотипотентності.

Об'єктами культури *in vitro* можуть бути різні тканини, взяті з різних частин рослини. Найчастіше вирощують тканини, що містять первинну та вторинну меристеми. Значно рідше для цього використовують пелюстки та пилкові трубки. Початок зростання експлантів на поживному середовищі та розвиток пагонів залежить від типу та розміру експланту. У рослин-донорів, які не мають апікальної меристеми, спочатку має відбутися дедиференціація вже існуючих спеціалізованих тканин та розвиток пагонів [2].

За рахунок цього методу у короткі строки можна розмножувати унікальні види, стерильні генотипи, види, які важко розмножуються, рідкісні або зникаючі. Мікроклональне розмноження має ряд переваг перед традиційним широко застосовуваним вегетативним методом, однак, також має свої недоліки. Щодо деяких переваг:

- 1) незалежність вирощування від пори року та наявної площі;
- 2) отримання генетично однорідного посадкового матеріалу;
- 3) швидший процес селекції нових видів (скорочується мінімум у 5 разів);
- 4) автоматизація процесу вирощування [6];
- 5) високий коефіцієнт розмноження (10^5 - 10^6 – для трав та квіткових рослин, 10^4 - 10^5 – для чагарників, 10^4 – для хвойних рослин) [6];
- 6) отримання безвірусного посадкового матеріалу;
- 7) отримання рослинного матеріалу з бажаними ознаками;

8) можливість розмноження за наявності мізерної кількості вихідного матеріалу;

9) тривале збереження рослинного матеріалу.

Поряд з цим, цей метод розмноження є технологічно складнішим, ніж вирощування у природних умовах, вимагає необхідних матеріалів, реактивів та обладнання.

Вперше метод клонального мікророзмноження було застосовано 50-х років XX століття французьким ученим Ж. Морелем. Досліднику вдалося одержати перші рослини-регенеранти орхідей [10]. У 1960-х роках у

лабораторії культури тканин і морфогенезу Інституту фізіології рослин ім. К.А. Тимірязєва були вивчені умови мікроклонального розмноження цукрового буряку, картоплі, гвоздики, буряку, фрезії тощо. За Н.В. Катаєвою і

Р.Г. Бутенко класифікація методів мікроклонального розмноження залежить від відмінності рослин, які утворилися в культурі з вихідного рослинного матеріалу, і, навпаки, з культивованого [2].

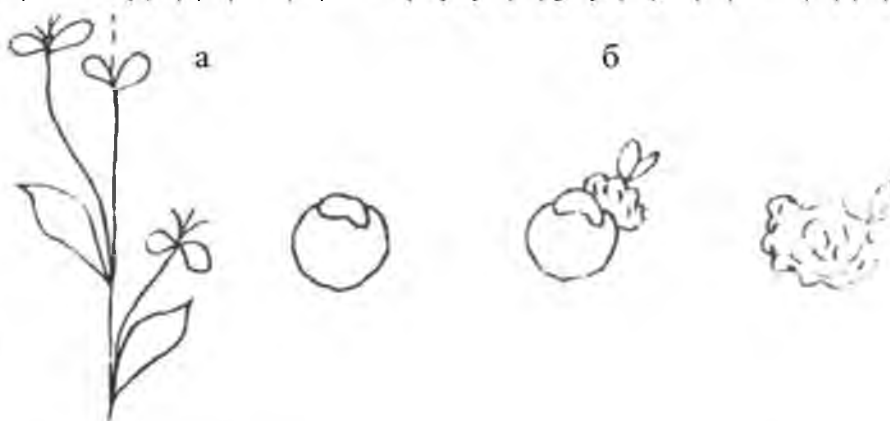


Рис. 1.8. Класифікація методів мікроклонального розмноження (за Н.В. Катаєвою та Р.Г. Бутенко) [2]: а – активізація вже існуючих меристем; б – утворення бруньок на ембріюдах

На сьогодні існує ряд різних методів мікроклонального розмноження, багатьма авторами представлені різні системи та методики:

1) активація розвитку пазушних меристем;

2) утворення адвентивних бруньок;

3) індукція прямого та непрямого соматичного ембріогенезу.

Індукція росту пазушних бруньок та використання пазушних пагонів є найбільш розновоюдженним способом мікроклонального розмноження рослин.

За рахунок природного розвитку рослинного організму, ріст пазушних бруньок зазвичай сповільнюється (явище апікального домінування). Обробка

цитокінінами та зрізання верхівки стебла в природних умовах стимулює ріст пазушних меристем. У лабораторних умовах – додавання до поживного

середовища цитокінів провокує пробудження бічних бруньок та розвиток багаточисленних пазушних пагонів. Однак, потрібно пам'ятати, що вихідні

експланти можуть загинути через токсичну дію високої концентрації фітогормонів (цитокінінів). Надлишок в поживному середовищі ауксинів

може стати причиною індукції калюсу. Який, в свою чергу, пригнічує ріст меристематичної тканини або сприяє розвитку додаткових апексів, які

генетично відрізняються від вихідного експлантату.

Саме цей метод є часто застосованим у лабораторіях клонального мікророзмноження промислового типу. Найбільш оптимальним та надійним

застосуванням методу проліферації пазушних меристем є для плодкових та ягідних рослин, оскільки має мінімальний ступінь ризику отримання

неоднорідних нащадків з вихідного матеріалу. Разом з тим, частота появи мутантних рослин за цього методу не перевищує частоту їх появи за

традиційного розмноження.

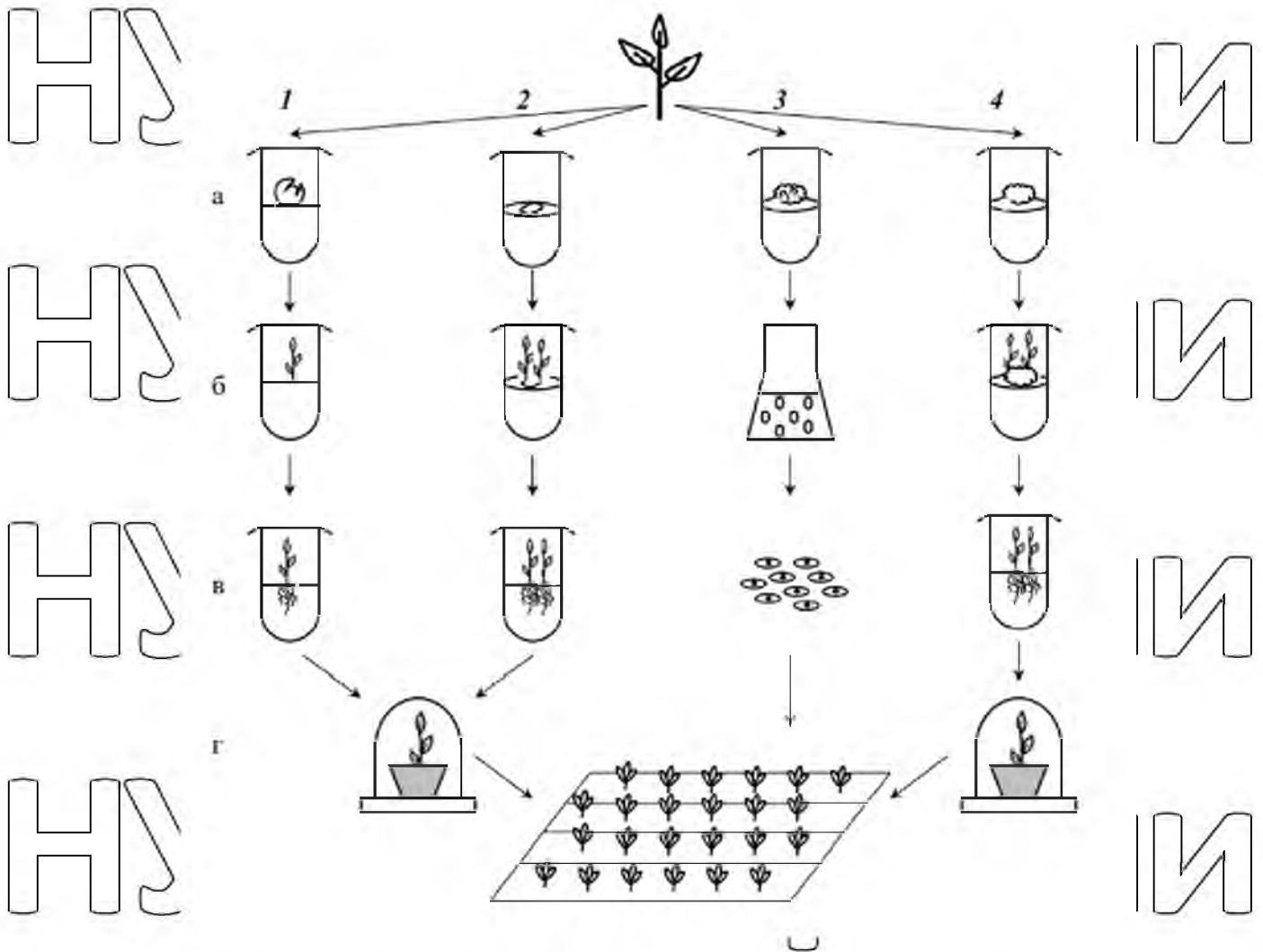


Рис. 1.9. Схема клонального мікророзмноження рослин [6]: 1 – активація розвитку меристеми; 2 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експланті; 3 – індукція соматичного ембріогенезу калюсу та суспензійної культури; 4 – утворення адвентивних бруньок у калюсній тканині: а – одержання стерильної культури; б – формування мікропагонів та розвиток соматичних ембріоїдів; в – укорінення мікропагонів та утворення штучного насіння; г – переведення рослин-регенерантів у тепличні умови з наступною висадкою в польових умовах

Розмноження рослин через суспензійну культуру чи культуру калюсних клітин вважають більш ефективними методами, оскільки за такого способу кожна клітина експланту потенційно може стати рослиною. Проте, внаслідок підвищеного ризику поліплоїдії або анеуплоїдії при диференціації клітин,

зростає ризик утворення регенерантів з відмінними від вихідного експлантату формами.

Клональне мікросрозмноження винограду *in vitro* є перспективним способом репродукції цієї культури, що забезпечує високий коефіцієнт розмноження і можливість отримати рослини, вільні від вірусних інфекцій [32]. Отримані методом культури тканин рослини з легкістю можна піддавати живцюванню. Зазвичай, процент укорінення таких живців сягає близько 100%. Так, у дослідженнях відмічено успішне укорінення живців, отриманих з елементів рослин винограду [34].

Спосіб розмноження через формування адвентивних бруньок з тканин експлантів різного походження є досить ефективним, але ймовірність отримання неоднорідних рослин-регенерантів залишається, враховуючи те, що в тканинах експланту можуть знаходитися клітини зі змінною плідністю.

Такий метод набув поширення при розмноженні декоративних культур, а також в досліджах генетичної та клітинної інженерії [8].

Найбільшу генетичну стабільність культури забезпечує утворення одиночного пагону достатньої довжини з первинного експланту та подальше його живцювання для отримання довшого пагону для повторного живцювання. Саме в такий спосіб розмножують досліджувану культуру – виноград, а також картоплю та гвоздику [2].

За соматичного ембріогенезу відбувається формування зародкоподібних структур (ембріодів) із соматичних клітин, які здатні розвиватися у цілу рослину при перенесенні їх на відповідне поживне середовище в умовах *in vitro*.

Традиційно процес мікроклонального розмноження складається з 4 етапів:

1 етап – введення експланту в культуру (вибір рослини-донора, яка вільна від інфекції, ізолювання та стерилізація експланту, утворення відповідних умов для вирощування в умовах *in vitro*);

2 етап – власне мікророзмноження (одержання пагонів та отримання максимальної їх кількості);

3 етап – укорінення мікропагонів, їх збереження та наступна адаптація до ґрунтових умов;

4 етап – адаптація до польових умов та вирощування рослин-регенерантів у відкритому ґрунті.

1.6 Умови синтезу фенольних сполук у рослин *Vitis Vinifera*

Фенольні сполуки характеризуються широким спектром речовин рослин, які мають спільне ароматичне кільце з одним або кількома гідроксильними радикалами. Часто вони поєднуються з цукром у вигляді глікозидів, що надає їм здатність розчинятися у воді. Існує декілька способів класифікації фенольних речовин, але найпоширеніша з них базується на кількості фенольних кілець у молекулі.

Залежно від кількості фенольних кілець та структурних елементів, які поєднуються до цих кілець, феноли можуть бути поділені на декілька підкласів. Згідно з цим принципом, до класу фенолів належать різні речовини, включаючи прості феноли та бензохінони (катехол), фенольні кислоти (такі як розмаринова та кавава кислоти), антоціани, кумарини, стильбеноїди (такі як ресвератрол), фенілпропени (як, наприклад, евгенол), антрахінони, флавоноїди (кверцетин), флаванони, лігнани, лігніни, поліфеноли (як, наприклад, дубильні речовини) [27].

Різноманітні фенольні сполуки мають великий вплив на колір, смак і структуру рослин, і тому вони відіграють важливу роль у їхній екологічній взаємодії з навколишнім середовищем [18]. Ці сполуки мають значення у фізіології рослин через їхню здатність захищати рослину від мікроорганізмів і комах, впливати на пігментацію та надавати органолептичні характеристики, такі як запах і аромат. Проте синтез цих сполук часто є обмеженим (менше 1% від загального вмісту сировини) і суттєво залежить від фізіологічного стану і стадії розвитку рослин.

Фенольні сполуки мають антимікробну, антиоксидантну та протирадикальну дію [25].

Флавоноїди представляють собою групу вторинних метаболітів, що синтезуються з амінокислоти фенілаланіну [26].

Останнім часом увагу зосереджують на антоціанах як класі флавоноїдних сполук, через їх потенційні переваги для здоров'я як дієтичних антиоксидантів [46]. Антоціани представляють собою водорозчинні пігменти, які надають різним частинам рослин, особливо листкам і плодам, їхнє забарвлення. У рослин вони виконують численні функції, включаючи захист

від ультрафіолетового випромінювання, боротьбу з вільними радикалами та виконують функцію приваблення рослин для запилення та розповсюдження насіння тваринами. Початково ці сполуки відомі були лише як природні барвники, стійкість яких залежала від рівня рН, впливу світла, умов зберігання

[42].

За рахунок збільшення експериментальних досліджень та епідеміологічних досліджень антоціани наразі розглядають як потенційні фармацевтичні сполуки, які можуть позитивно впливати на здоров'я людини:

на роботу серцево-судинної та нервової систем, підшлункової залози та нирок

[45].

Антиоксидантні властивості флавоноїдів залежать від їх структури. Дані літературних досліджень свідчать, що флавоноїди посідають важливе місце у профілактиці захворювань раку, у запобіганні нейрогенеративних захворювань та розладів шлунково-кишкового тракту.

Варто відзначити, що флавоноїди та антоціани чинять противірусну дію до COVID-19 в умовах *in vitro* [35].

Оскільки вторинні метаболіти служать захистом рослин від зовнішніх впливів навколишнього середовища, одним із способів стимулювання їх синтезу є застосування негативних факторів, таких як імітація атаки патогенів, травоядних тварин, вплив важких металів, ультрафіолетове опромінення і т. д.

Еліситори, які зазвичай природно містяться в компонентах грибів або стінках клітин рослин, визначаються як сполуки, які можуть стимулювати вторинний метаболізм рослин. Для рослин вони наслідують стан стресу, активуючи біохімічні системи захисту і викликаючи кількісні та якісні зміни у складі метаболітів у клітинах рослин та їх виділеннях [29].

Фенольні сполуки представляють собою біохімічні адаптації рослин до негативних факторів навколишнього середовища. При введенні еліситорів у культури рослин *in vitro* спостерігається виникнення фізіологічних та морфологічних змін, що може сприяти активізації синтезу фенольних сполук

[38].
Зазвичай флавоноїди, які входять до складу рослинної клітини, зв'язані з цукрами. Посуха, спека, низька температура, солоність, та наявність у ґрунті

важких металів мають пригнічувальний вплив на ріст рослин і знижує їх врожайність. Відповідь рослин на стрес включає утворення активних форм кисню, які в подальшому використовуються як сигнальні молекули для активації механізмів стресостійкості. Проте в умовах екстремального стресу активні форми кисню можуть вироблятися надмірно, що призводить до порушень метаболічних процесів у рослин. У таких ситуаціях активується транскрипція генів, що кодують біосинтез антоціанів, які виступають як антиоксиданти для боротьби з вільними радикалами [19].

У рослин винограду *Vitis Vinifera* синтез антоціанів посилюється за дії УФ-опромінення. Цей ефект пов'язаний з підвищеною активністю генів, що відповідають за біосинтез цих речовин [47].

Ресвератрол є природним фітоалексином, який синтезується деякими рослинами сперматофітами, включаючи *Vitis Vinifera* та інших представників *Vitaceae*. Такий синтез спостерігається відповідно до реакції на бактеріальну або грибкову інфекцію, вплив ультрафіолетового випромінювання.

Ресвератрол і його похідні відзначаються високою активністю, включаючи протигрибкову та антибактеріальну активність, мають властивості,

моделювання дії естрогенів та використовуються для запобігання захворювань серцево-судинної системи.

Проведені дослідження показують, що ресвератрол та його похідні сповільнюють ріст ракових клітин молочної залози та легень; він впливає на обмін ліпідів, запобігаючи окисленню ліпопротеїдів низької щільності та агрегації тромбоцитів. Зауважено, що у культурі *V. vinifera* спостерігається збільшення синтезу ресвератролу відповідно до інфекції або стресового впливу [17].

Досліджено, що вміст ресвератролу, який був виявлений у культурі винограду, можна збільшити за рахунок додавання Co, Ag, Cd [23].

1.7 Використання фенольних сполук винограду

Vitis vinifera є однією з основних плодкових культур у всьому світі та має великий економічний інтерес. Рослини винограду, вирощені в умовах *ex vitro*, виявляють підвищену чутливість до мікробних та грибкових інфекцій. Використання пестицидів та фунгіцидів має негативний вплив на навколишнє середовище [30]. Виноград є значущим джерелом біоактивних вторинних метаболітів, зокрема поліфенольних сполук, таких як антоціани, фенольні кислоти, флавоноли та катехіни [42]. Виноград цінується не лише як одна з ключових сільськогосподарських культур, але й через високий вміст фенольних сполук, серед яких важливі кон'югати флавонолів, такі як кверцетин і мірицетин, флаваноли, такі як катехін та епікатехін, а також антоціани.

Виноград вирізняється значним вмістом фенольних кислот, зокрема гідроксибензойної, галової, кавової, ванільної, p-кумаринової, а також стибенів, зокрема ресвератролу [46]. Саме ці фенольні сполуки визначають фізико-хімічні та сенсорні властивості винограду. Багато зовнішніх і внутрішніх чинників, таких як сорт винограду, регіони вирощування, методи сільськогосподарства, кліматичні умови, рельєф, ґрунтовий склад та стадія дозрівання, можуть впливати на склад і кількість фенольних сполук винограду, а отже, на їхню антиоксидантну та антирадикальну активність.

Фенольні сполуки розглядаються як природні антиоксиданти, і їх здатність в поглинати вільні радикали залежить від хімічної структури цих сполук. Особливо важливими антиоксидантами є флаван-3-оли, включаючи проантоціанідини, флавоноли та антоціани, оскільки вони сприяють підвищенню антиоксидантної активності винограду.

Фенольні сполуки, одержані з винограду, знаходять широке застосування у медицині, як компоненти лікарських засобів, у харчовій промисловості, як ароматизатори та нутрицевтики, а також пігменти та ароматичні речовини. Останнім часом велика увага фенольним сполукам приділяється через їх особливості смаку, запаху, антиоксидантного потенціалу та кольору. Тому, наразі є великий інтерес до використання поліфенольних сполук у виробників продуктів харчування.

Дослідження в галузі фармації свідчать, що завдяки вираженим антиоксидантним властивостям поліфеноли, отримані з екстрактів *V. vinifera*, можуть мати потенціал в застосуванні для запобігання розвитку ракових захворювань, серцево-судинних захворювань і нейродегенеративних розладів, які спричинені окислювальним стресом.

Вміст фенольних сполук у рослинах *Vitis vinifera* може коливатися залежно від умов їх вирощування, наявності хвороб та під впливом абіотичного стресу [42]. Вирощування рослинних культур *in vitro* може стати потенційною альтернативою для отримання поліфенолів, які характерні для *Vitis vinifera*. Культивування *in vitro* культур *V. vinifera* має численні переваги, включаючи відсутність обмежуючих факторів навколишнього середовища.

Культивовані рослини *Vitis vinifera* завжди були об'єктом досліджень за рахунок синтезу ним фенольних сполук. Наприклад, антоціани, відіграють важливу роль у біологічних процесах рослин, беручи участь у захисних механізмах від різних стресових факторів. Ці сполуки мають багато функцій, включаючи роль пігментів у формуванні кольору рослин та у передачі сигналів між рослинами та бактеріями. Крім того, вони відіграють роль у реакції на наявність поживних речовин, мають антимікробні властивості,

впливають на транспорт ауксину та забезпечують захист від ультрафіолетових променів.

НУБІП України

Антоціани викликають особливий інтерес у виробників продуктів харчування та лікарських засобів, оскільки їх можна використовувати як природні барвники, а також для запобігання та лікування різних захворювань.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Розділ 2. Матеріали і методи

Основним традиційним вегетативним розмноженням винограду є розмноження зимніми живцями (чубуками). Оскільки цей метод є доступним, простим та забезпечує високий вихід посадкового матеріалу. Аналізуючи дані, можна дійти висновку, що з однієї маточної рослини отримують близько 300 зелених живців, укорінення яких залежить від сорту, регуляторів росту та умов зовнішнього середовища та коливається від 60 до 100%, при цьому вихід стандартних саджанців сягає 50-60%. За найкращих умов, за два роки можна отримати близько 150 саджанців з однієї маточної рослини. Однак, важливо відмітити, що цей спосіб розмноження значно поступається технологіям клонального мікророзмноження.

Основною клонального мікророзмноження винограду є базовий посадковий безвірусний матеріал, вільний від шкідників та хвороб.

Вирощування такого посадкового матеріалу можливе тільки у спеціальних, оснащених відповідним обладнанням лабораторіях, де використовують новітні методи біотехнології.

Отже, спосіб мікроклонального розмноження є найбільш ефективним для отримання достатньої кількості сертифікованого посадкового матеріалу винограду в короткі терміни.

Основні етапи мікроклонального розмноження винограду, які використовувалися в даній роботі в умовах *in vitro* включають наступні етапи:

- 1) стерилізація експланту та висадка його на штучне живильне середовище;
- 2) культивування експланту в культуральній кімнаті з контролюючими температурними і світловим режимами;
- 3) розмноження *in vitro*;
- 4) укорінення рослин-регенерантів.

Дослідження виконано на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБіП України.

Матеріалом для дослідження слугували рослини винограду *Vitis vinifera* L. сортів Сапераві, Подарунок, Од Чорний, Рошфор Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» НААН України.

Рошфор – гібридний столовий сорт європейського винограду *Vitis vinifera* раннього терміну дозрівання. Виведений селекціонерами у результаті схрещування сортів (Талісман – батьківська форма) x Кардинал+сумші пилку. Вегетаційний період від появи перших бруньок до дозрівання плодів становить 95-100 днів. Ранньостиглий сорт.

Сорт *Рошфор* володіє сильним ростом кущів, що активно формують деревину. Листя винограду цього сорту велике, має округлу форму з п'ятьма лопатями та багряну зелену барву. Поверхня листка має характерний січасто-зморшкуватий вигляд, зворотний бік покритий легким павутинистим опушенням. Перші листки на пагоні майже цілі, пізніше з'являються середнього розміру. Квіти цього сорту є двоєстатевими і, як правило, добре запилюються власним пилком. Однак при негативних погодних умовах під час цвітіння можуть виникнути проблеми з недостатнім запиленням, що призводить до розрідженості грон та загорошених ягід. Молоді пагони мають світло-зелене забарвлення, яке з часом починає темнішати, набуваючи коричневого відтінку.

Майже не вразливий до сірої та білої гнилі, відіуму (стійкість – 3 бали), мільдю (стійкість – 2,5 бали). Добре адаптований до зниження температури до -21 °С. Вихід чубуків, придатних до розмноження, складає близько 70%.



Рис. 21. Винград сортів: а – Рошфор, б – Од чорний

Фото з мережі Інтернет

Од чорний – столовий сорт винограду українських селекціонерів Інституту виноградарства ім. Таїрова. Батьківські форми: Алікант Буше x Каберне Совіньйон [3]. Вегетаційний період складає 160-165 діб днів. Пагони середньої сили росту. Формує велику кількість плодоносних пагонів. Морозостійкість – підвищена. Сорт здатний переносити пониження температури до $-25..-30^{\circ}\text{C}$.

Відносно стійкий до хвороб оїдуму та мільдю.

Подарунок – гібридний столовий сорт європейського винограду *Vitis vinifera*. Виведений українськими селекціонерами Інституту виноградарства ім. Таїрова у результаті схрещування сортів Молдова x Кардинал [3]. Сорт відносять до ранньостиглих: період вегетації – 115-125 днів. Середньо- або сильнорослий. Вихід плодоносних пагонів сягає до 75%. Цей сорт рекордмен по урожайності. Стійкий до мільдю (стійкість – 3,5 бали), до оїдуму потребує звичайної обробки, відносно стійкий до грибних захворювань.

Сатрапі – столовий сорт винограду природної селекції європейської лози *Vitis vinifera* x *Vitis Lamrusci*. Пагони традиційної сили росту. Пізньостиглий сорт. Має тривалий період вегетації (150-160 діб).

Морозостійкий сорт: стійкий до пониження температури до 28°C . Широко застосований у виноградарстві. Відносно стійкий до грибкових захворювань.

2.1. Введення в культуру

Головним при роботі в умовах *in vitro* є дотримання асептичних умов.

Це стосується приміщення, в якому культивується матеріал, інструментів, які застосовуються під час цього процесу, і, звичайно, вихідного матеріалу.

Послідовність етапів отримання стерильних експлантів й подальшу з ними роботу в асептичних умовах включає: миття лабораторного посуду, його

сушіння та стерилізація; приготування штучного поживного середовища, його

автоклавування; введення рослинного матеріалу в умови *in vitro*, і, відповідно,

його вирощування в асептичних умовах. У даній роботі введення в культуру проводили за стандартною технологією в ламінарному боксі.

Верхівкові меристеми та одновічкові зелені чубуки, які містять пазушну

бруньку, вирізали за допомогою скальпеля у ламінарному боксі. Для цього

ламінар, руки та інструменти були належним чином освітлені та простерилізовані. Перед початком весь лабораторний посуд, руки та ламінар

стерилізували спиртом, також проводили стерилізацію інструменту перед

початком роботи в сухожаровій шафі, а безпосередньо перед кожною

маніпуляцією, занурюючи в спирт та подальшим обпалюванням в полум'ї

спиртівки. Висадку експлантів проводили на базове безгормональне поживне середовище – Мурасіге і Скута, яке за відповідних умов було простерилізовано

в автоклаві: при 121°C (1 атм.) протягом 20 хвилин. Розмір апексу, що вводили

в культуру, сягає близько $1\pm 0,5$ см.

2.1.1. Підготовка рослинного матеріалу

Рослинним матеріалом для роботи були чубуки, заготовлені в осінній період на виділених кущах винограду, що ростуть на власній присадибній

ділянці. Під час заготівлі вирізали недовгі, від 20 до 30 см чубуки. Зріз

обов'язково повинен бути рівним та сухим, тому операцію проводили чистим

гострим ножем задля недопущення потрапляння інфекції. Верхній зріз робили на відстані близько 2-2,5 см вище вузла, нижній – під вузлом. Після цього,

промивали матеріал спочатку в холодній воді, потім поставили у ємність з водою з додаванням таблеток активованого вугілля у розрахунку 7 таблеток на 1 л проточної води задля знезараження нижньої частини живців та ініціації проростання коренів. Ємність поставили на підвіконня та обробили фунгіцидом задля знезараження верхньої частини живців. Обробку фунгіцидом здійснювали періодично. Надалі слідкували за рівнем води. Спочатку розпустилися бруньки, надалі – з'явилися перші корінці. Після того, як кількість вихідної рослини винограду стала достатньою, почали безпосередньо процес введення експлантів в культуру *in vitro*. Таким чином, у якості вихідного матеріалу були молоді, зелені пагони пророщеної лози винограду (до 20 см), які послідовно обробляли у розчинах дезінфікуючих речовин.

У даній роботі нами було використано широко застосований варіант стерилізації рослинного матеріалу з трьома варіаціями. Для цього ми використали такі розчини: мийучий розчин, 70-% розчин етанолу, 0,1% розчин сулеми (HgCl_2), стерильна дистильована вода (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Варіанти стерилізації експлантів

Варіант	Мийучий розчин	70-% розчин етанолу ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	0,1% розчин сулеми (HgCl_2)	Стерильна дистильована вода (x3)
I	30 хв	2 хв	6 хв	10 хв
II	30 хв	1 хв	7 хв	10 хв
III	30 хв	1 хв	8 хв	10 хв

Для зручності стерилізації пагони винограду поміщали в марлеві мішечки. В першому варіанті стерилізації вихідний матеріал промивали в мильному розчині протягом 30 хв, потім стерилізували в розчині етанолу (70%) – 2 хв, сулеми (0,1%), з подальшим трикратним промиванням рослинного матеріалу автоклавованою дистильованою водою протягом 10 хвилин кожний.

У другому варіанті стерилізації рослинний матеріал промивали у мильному розчині протягом 30 хв, надалі протягом 1 хв. В етиловому спирті (70%), 7 хвилин у розчині $HgCl_2$ (0,1%), і, відповідно, триразовим промиванням стерильною дистильованою водою по 10 хвилин кожного разу.

У третьому варіанті досліду, в порівнянні з другим, змінився час експозиції розчину дихлориду ртуті, що становив 8 хв. Всі етапи стерилізації проводили у спеціально підготовленому ламінарному боксі.

2.1.2. Власне мікророзмноження

Наступним кроком даного дослідження було проведення клонального мікророзмноження отриманих рослин-регенерантів. Основна задача при цьому – отримання необхідної кількості посадкового матеріалу та подальше його укорінення. Під час мікророзмноження регенеранти культивували на середовищі з додаванням регулятора росту цитокиніну, який блокує явище апікального домінування та сприяє проліферації. Через 30 днів, отримані під час першого етапу МКР, вільні від інфекції пагони розділяли на вузлові сегменти 0,5-1,5 см, кожен з яких містив пазушну бруньку. Сегменти переносили в культуральні банки, що містили середовище МС з додаванням БАП у концентраціях 0,5; 1,5 та 2 мг/л; контрольне середовище не містило регулятора росту. Рослини-регенеранти культивували протягом 30 днів. Традиційно, у якості джерела вуглецю використовували сахарозу в розрахунку 30 г/л та у якості желуючого агенту – агар (у концентрації 6,8 г/л).

Культивування проводили в культуральній кімнаті при температурі 25-27 °С та відносній вологості повітря в межах 60-70%. Дані про кількість і довжину утворених пагонів реєстрували через 4 тижні культивування. Надалі експланти піддали живцюванню та перенесли на поживне середовище, що містить 6-БАП у концентрації 1,5 мг/л для подальшого культивування.

Проаналізовано 4 сорти рослин *Vitis Vinifera* L. по 20 експлантів на кожне поживне середовище. Оцінку впливу регуляторів росту здійснювали за показниками загальної кількості пагонів, які формуються в експланта.

2.1.3. Укорінення рослин-регенерантів

Під час укорінення мікропагонів в умовах *in vitro* були задіяні всі досліджувані сорти винограду. У якості поживного середовища використали МС з половинною концентрацією мікро-, макроелементів, повноцінною концентрацією вітамінів (10 мг/л) та з додаванням фітогормону ауксину – ІОК у концентрації 0,5, 1,5 та 2,5 мг/л. Для контролю використовувалося поживне середовище $\frac{1}{2}$ МС. Укорінення проводили за стандартних, для даного дослідження, умов освітлення, температури та вологості.

2.2. Одержання калюсної тканини

Отримавши стерильну культуру рослин-регенерантів, проводили культивування калюсної тканини. У якості експлантів використовували листки, частини стебла та верхівкові меристеми. Враховуючи те, що на етапі мікронального розмноження найбільшу кількість утворених пагонів спостерігали у сортів Од чорний та Рошфор, то саме дані асептичні рослини були використані для отримання та культивування калюсу.

Асептичні частини листків (площею 0,5 см²), верхівки пагонів, вузлові та міжвузлові сегменти стебла культивували на середовищі МС з додаванням ауксину НОК та цитокіну 6-БАП у якості регуляторів росту (таблиця 2.2).

Оскільки з часом компоненти поживного середовища стають менш активними за рахунок використання їх рослиною, проводили процес пасирування калюсної тканини та перенесення її на свіже поживне середовище відповідного складу. Усі експланти для культивування витримували в темряві в культуральній кімнаті при 25±2 °С та відносній вологості в межах 70%. Спостереження за калюсоутворенням реєстрували через 4, і, відповідно, 6 тижнів культивування.

2.3. Підбір поживного середовища для мікророзмноження

Після вибору метода стерилізації, експланти винограду (верхівкові меристеми та одновічкові зелені чубуки, які містять пазушну бруньку) висаджували на автоклавоване універсальне поживне середовище Мурасіге і Скуга.

Експланти культивували у культуральних банках, що містили 20-25 мл середовища МС без додавання будь-яких регуляторів росту традиційного складу (у розрахунку концентрацій речовин мг/л):

- Макросолі МС – 100
- Мікросолі МС – 10
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 100
- Вітаміни МС – 10
- Fe-хелат – 5
- Інозитол – 1

Сахароза – 30 г

Культивування проводили на твердому поживному середовищі. У якості ущільнювача застосували агар у кількості 6,8 г/л. Показник рН до автоклавування – 5,6-5,8.

Поживне середовище для власне мікророзмноження складалося з МС універсального складу з аналогічними концентраціями компонентів першого етапу – введення в культуру, з додаванням різних концентрацій регулятора росту БАП – 0,5; 1,5 та 2 мг/л.

На етапі укорінення культивованих *in vitro* мікрочубуків винограду, використовували поживне середовище $\frac{1}{2}$ МС з додаванням різних концентрацій ауксину:

I варіант (контроль): $\frac{1}{2}$ мінеральної основи МС, вітаміни – 10 мг/л; інозитол – 1 мг/л; сахароза – 30 г; агар – 6,8 г; рН до автоклавування – 5,6-5,8.

II варіант: $\frac{1}{2}$ мінеральної основи МС, вітаміни – 10 мг/л; інозитол – 1 мг/л; ІОК – 0,5 мг/л; сахароза – 30 г; агар – 6,8 г; рН до автоклавування – 5,6-5,8.

III варіант: $\frac{1}{2}$ мінеральної основи МС, вітаміни – 10 мг/л; інозитол – 1 мг/л; ІОК – 1,5 мг/л; сахароза – 30 г; агар – 6,8 г; рН до автоклавування – 5,6-5,8.

III варіант: $\frac{1}{2}$ мінеральної основи МС, вітаміни – 10 мг/л, інозитол – 1 мг/л, ЦОК – 2,5 мг/л, сахароза – 30 г, агар – 6,8 г; рН до автоклавовання – 5,6-5,8.

Отримані в ході мікроклонального розмноження, асептичні рослини сортів винограду, використовували для культивування калюсної тканини. Для цього процесу використовували три варіанти поживних середовищ.

Таблиця 2.2

Варіанти поживних середовищ для калюсогенезу

Компоненти середовища	Варіанти		
	I	II	III
Мікросолі МС, мг/л	10	10	10
Макросолі МС, мг/л	100	100	100
Fe-хелат, мл	5	5	5
Вітаміни МС, мг/л	2	1	1
Інозитол, мг/л	0,1	0,1	1
БАП, мг/л	2	0,5	2,0
ЦОК, мг/л	0,5	10	0,5
рН до автоклавовання	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8

Усі варіанти середовища доповнювали сахарозою у концентрації 30 г/л, у якості ущільнювача застосовували агар – 6,8 г/л.

2.4. Визначення якісного та кількісного вмісту фенольних сполук

Для визначення впливу фенольних кислот на мікроклональне розмноження винограду у культурі *in vitro*, культивовані сорти рослин були перенесені на середовище МС, збагачене феруловою кислотою у кількості 1 мкМ.

Культивування мікропагонів здійснювали в умовах стандартного фотоперіоду 16/8 (день – 16 годин, ніч – 8 годин), освітленості 2500-3000 люкс, температурі $+25^{\circ}\text{C}$ і вологості 50-60%. Результати культивування спостерігали на 21 день.

Для приготування метанольних екстрактів використовували співвідношення 1:10 (наважка листків:метанол).

Для якісного аналізу пластидних пігментів та фенольних сполук застосовували метод високоефективної тонкешарової хроматографії на сорбенті Silicagel G60 (Merck) у системі розчинників: хлороформ/оцтова кислота/метанол/вода ($v = 60/32/12/8$) [41].

Для визначення вмісту пігментів, фенольних сполук та антиоксидантної активності в досліджуваних метанольних екстрактах листків використовували спектрофотометричний метод.

Речовини були розділені за допомогою обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на системі Agilent 1260, яка включає в себе 4-канальний насос, вакуумний дегазатор, автосамплер, термостат для колонок і діодно-матричний детектор. Перед аналізом зразки були профільтовані через шприцевий фільтр 0,2-0,5 мкм.

Для хроматографії використовували двохрановентну систему: елюент I – 5 г/л водний розчин H_3PO_4 , елюент II – ацетонітрил. Колонка Agilent Zorbax SB-C18, 5 мкм, розмір 4,6x250 мм. Об'єм зразка становить 5 мкл, колонку термостатували при 20°C, швидкість потоку складала 1,0 мл/хв, тривалість аналізу – 35 хвилин.

Профіль елюювання включав ізократичну частину, де 15% елюенту II додавався до елюенту I протягом 5 хвилин, а потім лінійний градієнт від 15% до 35% елюенту II в елюент I протягом наступних 20 хвилин. В кінці аналізу залишалася ізократична частина з 35% елюенту II в елюенті I протягом 7 хвилин і більше. Для детектування використовували дві фазові довжини хвиль – 209 і 254 нм, додаткові хвилі використовували за необхідності – 350 нм для флавоноїдів.

Загальний вміст фенольних сполук аналізували за допомогою реактиву Фоліна-Чокальтеу [31]. До 200 мкл отриманого метанольного екстракту листя додавали 1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу. Після 4 хвилин додавали 800 мікролітрів насиченого розчину Na_2CO_3 . Поглинання реакційної суміші

вимірювали при 760 нм за допомогою спектрофотометра Optizen Pop. Час експозиції – 2 години. Калібрувальний графік будували за галовою кислотою.

Визначення кількісного вмісту флавоноїдів у листках виконували за допомогою спектрофотометричного методу. Використання даного методу допомагає визначити суму флавоноїдів у присутності інших поліфенольних сполук, які не створюють комплекс з $AlCl_3$ в середовищі з ацетатом натрію.

В якості стандартного розчину використовують флавоноїд, в якого максимум поглинання комплексу з $AlCl_3$ найбільш відповідає максимуму поглинання даного комплексу досліджуваного екстракту. Такими флавоноїдами можуть бути рутин, кверцетин, гесперетин тощо. В даному дослідженні в якості стандарту ми використовували кверцетин (Sigma, Німеччина).

Реакційна суміш складається з: 200 мкл 0,1 М розчину хлориду алюмінію ($AlCl_3$), 300 скл 1М ацетату натрію (CH_3COONa).

Дослідження концентрації фенольних антиоксидантів екстрактів проводили згідно методики Brand-Williams на основі активності поглинання стабільног вільного радикала ДФПГ (2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу) [22].

Поглинання розчину вимірювали за 517 нм за допомогою спектрофотометра Optizen Pop (Південна Корея).

В якості стандарту для побудови калібрувального графіку використовували водерозчинний вітамін Е ($M_{ролок} = 250,29$). Приготування розчину включає: вітамін Е у кількості 6 г перенесли у мірну колбу, додали 2,4 мл 80% етанолу.

Кількість 96% етилового спирту для отримання необхідного об'єму 80% етанолу розраховували за формулою:

$$V_{96\%} = (V_{80\%} \cdot 80) / 96, \quad \text{де}$$

$V_{96\%}$ - об'єм 96% етанолу, необхідного для отримання потрібного об'єму 80% спирту;

$V_{80\%}$ - необхідний об'єм 80% етанолу.

Реакційна суміш для визначення антиоксидантної активності фенолів містила: 0,25 мл досліджуваного екстракту, 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ та 1,75 мл 80% етилового спирту.

Контрольний зразок містив 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ та 2 мл 80% етанолу.

Реакція відбувається за додавання розчину ДФПГ. Ефект поглинання ДФПГ ($I_{ДФПГ}$) розраховували за формулою:

$$I_{ДФПГ} = (D_K - D_D) / D_K \cdot 100\%,$$

де D_K – оптична густина контрольного зразку (за відсутності антиоксидантів);

D_D – оптична густина за наявності антиоксидантів.

2.5 Кількісне визначення пігментів

Визначення кількісного вмісту хлорофілів (C_a , C_b) та каротиноїдів (C_{x+c}) було виконане в метанольних екстрактах за допомогою спектрофотометричного методу. Оптичну густина дослідних екстрактів вимірювали за допомогою сканувального спектрофотометра Optizen Pop (Південна Корея) при довжині хвилі 665,2 нм для хлорофілу a та 652,4 нм для хлорофілу b .

В якості референсного розчину використовували 70% розчин етилового спирту.

Визначення концентрації даних хлорофілів в загальній суміші пігментів за формулами:

$$C_a = 16,72 \cdot A_{665,2} - 9,16 \cdot A_{652,4} \text{ (мг/мл);}$$

$$C_b = 34,09 \cdot A_{652,4} - 15,28 \cdot A_{665,2} \text{ (мг/мл);}$$

$$C_{x+c} = (100 \cdot A_{700} - 1,63 \cdot C_a - 104,96 \cdot C_b) / 221 \text{ (мг/мл) [44]}$$

2.6 Статистичний аналіз результатів

Дані представлені у вигляді середніх значень \pm SE (стандартної похибки) трьох повторюєтей. Статистичний аналіз даних (двосторонній дисперсійний аналіз) та побудова графіків були проведені у Microsoft Excel 2010. Відмінності вважалися статистично значущими при значенні $p \leq 0,05$.

Розділ 3. Результати та обговорення

3.1. Визначення ефективного методу стерилізації

За результатами дослідження (таблиця 3.1) виявлено, що вже через 5 днів після введення експлантів в культуру, у першому варіанті стерилізації (миючий розчин: експозиція 30 хв, 70% розчин C_2H_5OH – 2 хв та в розчині 0,1% сулему протягом 6 хвилин) було видалено 60% культуральних експлантів.

Таблиця 3.1

Вплив часу ініціації дезінфікуючих речовин на вихід асептичних експлантів

Варіант стерилізації	Вихід стерильних експлантів		Приживлюваність стерильних експлантів на 10 добу	
	шт.	%	шт.	%
I	19±0,64	40	7±0,88	36
II	39±0,62	82	35±0,24	90
III	14±0,58	30	4±0,57	26

Під час використання третього варіанту стерилізації, згідно з яким використовувалися стандартні для всіх варіантів розчини, а час експозиції було змінено (миючий розчин – 30 хв, 70% C_2H_5OH – 1 хв та 0,1% розчин сулему – 8 хвилин), через 7 днів було відбраковано 70% досліджуваних експлантів. За другого варіанту стерилізації було видалено лише 20% експлантів. Це вказує на те, що стерилізація рослинного матеріалу винограду в стерилізуючих розчинах високої концентрації під час тривалого періоду експозиції згубно впливає на тканини експлантів, пошкоджуючи їх і викликаючи почорніння. Однак, деякі експланти (здебільшого ті, що мали великі розміри) повністю не відмерли, але в них загальмовувався процес ініціації росту пазушної бруньки.

Таким чином, найбільш оптимальним варіантом стерилізації експлантів винограду сортів Роліфор, Сапераві, Одчорний та Подарунок, є другий. Даний варіант складався з наступних етапів: експланти промивали під проточною водою з мильним розчином протягом 30 хвилин, потім обробили 70%

етиловим спиртом протягом 1 хвилини, 0,1% розчином H_2SO_4 протягом 7 хвилин з наступним триразовим промиванням автоклавованою дистильованою водою протягом 10 хвилин кожного промивання.

Застосування таких концентрацій розчинів забезпечило найбільше стерильних експлантів винограду (в межах 82%) з подальшим активним їх розвитком на відповідному поживному середовищі вже на 10 день дослідження. Отже, в ході дослідження визначено, що головним правилом при стерилізації є підбір оптимального часу експозиції стерилізуючих розчинів. Це допомагає зменшити відсоток інфікованих ініціальних експлантів (у нашому випадку до 20%) і, відповідно, отримати їх приживлюваність на рівні 90%.

3.2. Введення в культуру *in vitro*

При введенні в культуру (рис. 3.1) було використано універсальне базове поживне середовище Мурасіге і Скуга без додавання гормонів. У якості желуючого агенту використовували агар, джерело вуглеводів – сахароза. У ході дослідження, вже через 10 діб спостерігали активний розвиток пазушних меристем та, відповідно, формування рослин-регенерантів в усіх досліджуваних сортів. Експланти культивували протягом 30 діб, протягом яких відбувалась інтенсивна проліферація нижніх пагонів, формування бруньок та мікропагонів.



Рис. 3.1 Введення винограду в культуру *in vitro*

Оскільки кожний сорт винограду має свої індивідуальні особливості генотипу, ріст і розвиток апікальної меристеми на штучному поживному середовищі також буде різнитися (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Ріст меристематичної тканини на базовому середовищі МС

Середовище	Сорт винограду	Середній приріст апікальних меристем, мм	
		15 днів	25 днів
Мурасіге і Скуга без додавання гормонів	Рошфор	8±0,63	11±0,88
	Подарунок	6,5±0,62	8±0,46
	Од чорний	7,5±0,64	11±0,63
	Сапераві	5±0,57	7±0,65

Таким чином, на даному поживному середовищі найбільший приріст тканини спостерігали в сортах винограду Рошфор та Од чорний – 11 мм та в сорту Подарунок – 8 мм. Найменший приріст бачимо у сорту винограду Сапераві, що пояснюється його генотипом.

3.3. Мікроклональне розмноження рослин-регенерантів

На етапі клонального мікророзмноження експланти від кожного сорту були культивовані на поживному середовищі, що складається з твердого базового МС з додаванням різних концентрацій (0,5; 1,5; 2 мг/л) 6-бензиламінопурину. Оскільки регулятор росту цитокінін пригнічує апікальне домінування та ініціює проліферацію, у ході дослідження вивчався вплив концентрації фітогормону на розмноження рослин-регенерантів (таблиця 3.3).

Початок інтенсивного росту спостерігали вже на 7 добу культивування.

Таблиця 3.3

Вплив концентрації БАП на проліферацію пагонів на 28 добу культивування

№	Сорт	Концентрація 6-БАП, мг/л			
		Контроль	0,5	1,5	2,0
		Приріст пагонів, %			
1.	Рошфор	11	16	32	46
2.	Подарунок	10	14	19	15
3.	Од чорний	12	19	25	33
4.	Сапераві	9	12	17	20

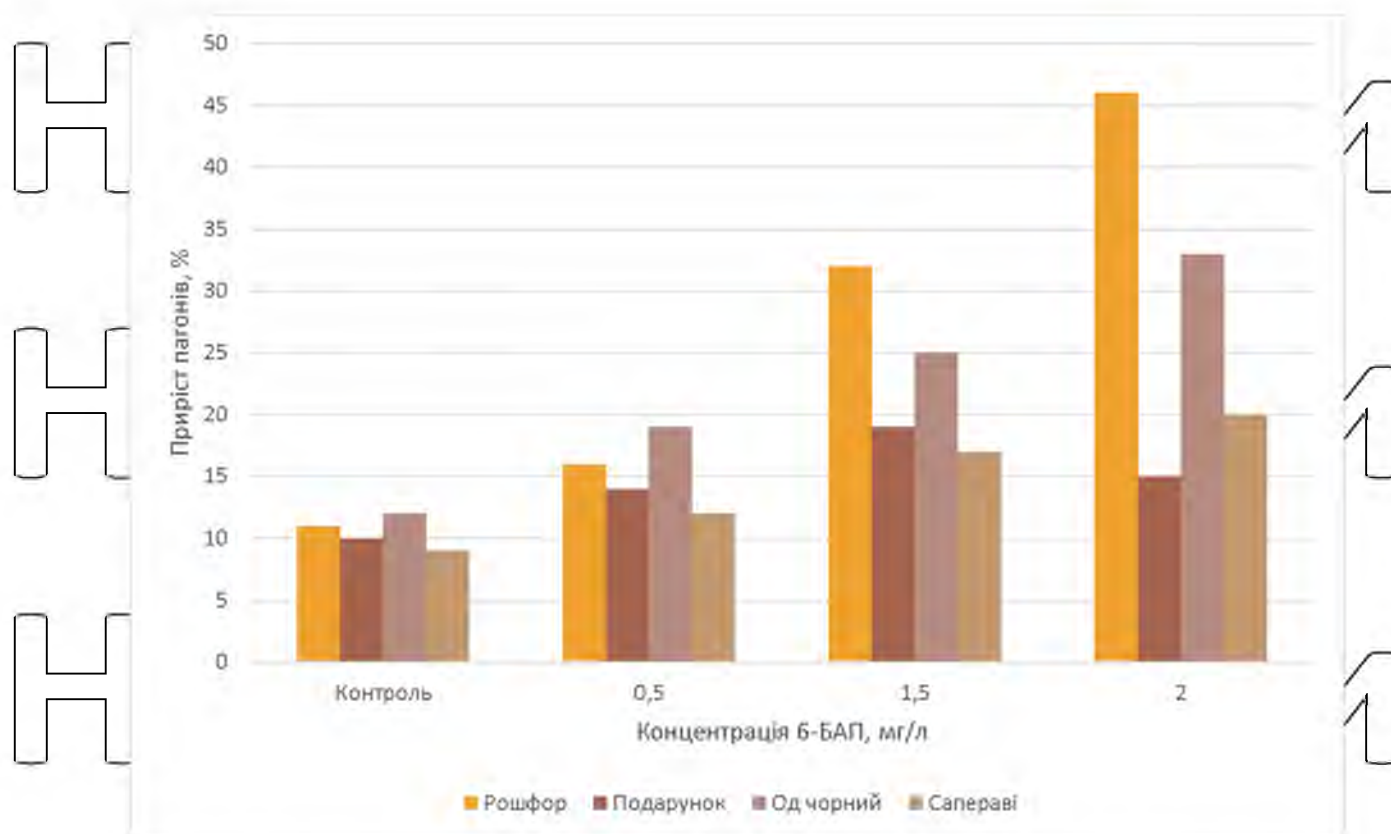


Рис. 3.2. Вплив концентрації БАП на проліферацію пагонів на 28 добу

культивування

Одержані експериментальні дані показують, що найбільший відсоток приросту пагонів у всіх досліджуваних сортів винограду спостерігається на середовищі, що містить БАП у концентрації 1,5 мг/л. Водночас, вплив додавання до МС БАП у кількості 2,0 мг/л є неоднаковим у відповідних сортів. Так, у сорту Рошфор – 32%, Подарунок – 19%, Од чорний – 25%, Сапераві – 17%. Отже, найбільш оптимальним для мікроклонального розмноження винограду, що забезпечує максимальну кількість проліферованих пагонів, є середовище МС з додаванням регулятора росту БАП у концентрації 1,5 мг/л. Найбільшого подовження та проліферації пагонів досягли у сортів Рошфор та Од чорний, які були використані для подальшого живцювання та культивування на визначеному поживному середовищі. Відмінності у реакції культивованого рослинного матеріалу залежали від концентрації цитокініну та генотипу.

Під час проведення етапу укорінення рослин-регенерантів, було досліджено вплив концентрації регулятора росту β-індолилпропіової кислоти на процес укорінення досліджуваних сортів винограду (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4

Залежність росту кореневої системи сортів винограду від концентрації ІОК на 30 добу культивування

№	Сорт	Концентрація ІОК, мг/л			
		Контроль	0,5	1,5	2,5
		Довжина коренів, см			
1.	Рошфор	2,1±1,7	2,3±1,6	4,0±1,04	4,5±0,3
2.	Поларунок	3,0±2,3	3,1±1,2	6,1±0,05	6,6±0,1
3.	Од чорний	2,7±1,2	3,1±0,08	5,8±1,3	6,1±0,8
4.	Сапераві	3,1±0,4	3,2±0,7	3,5±0,4	4,1±0,5

У результаті проведення дослідів встановлено, що найбільш оптимальним середовищем для укорінення є базове Мурасіге і Скуга з половинним вмістом компонентів макро- та мікросолей з додаванням ІОК у концентрації 2,5 мг/л однак з незначною відмінністю від концентрації ауксину в 2,5 мг/л. Додавання ауксину сприяє подовженню кореня. За даних умов процес процес ризогенезу, культивованих *in vitro* однорічкових чубуків, у сортів Рошфор та Сапераві розпочинався на 12 добу, в той час як у сортів Од чорний та Поларунок на 17 та 15 добу відповідно.

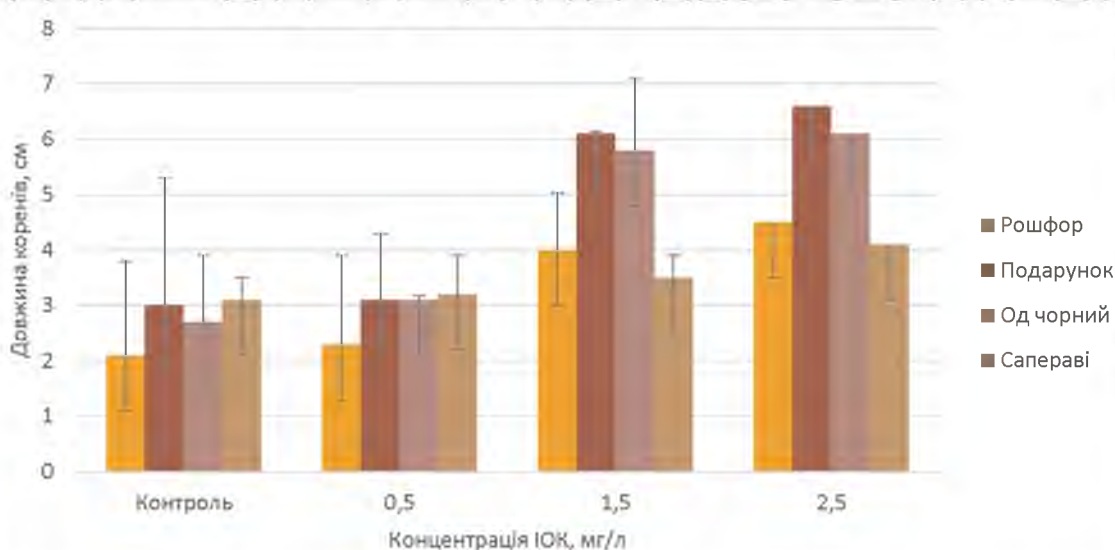


Рис. 3.3. Залежність росту кореневої системи сортів винограду від концентрації ІОК на 30 добу культивування

Позитивний вплив збільшення концентрації фітогормону на укорінення сортів спостерігався у всіх сортів, окрім сорту Сапераві. Отже, для даного сорту оптимальним варіантом для укорінення є універсальне середовище $1/2$ MS.

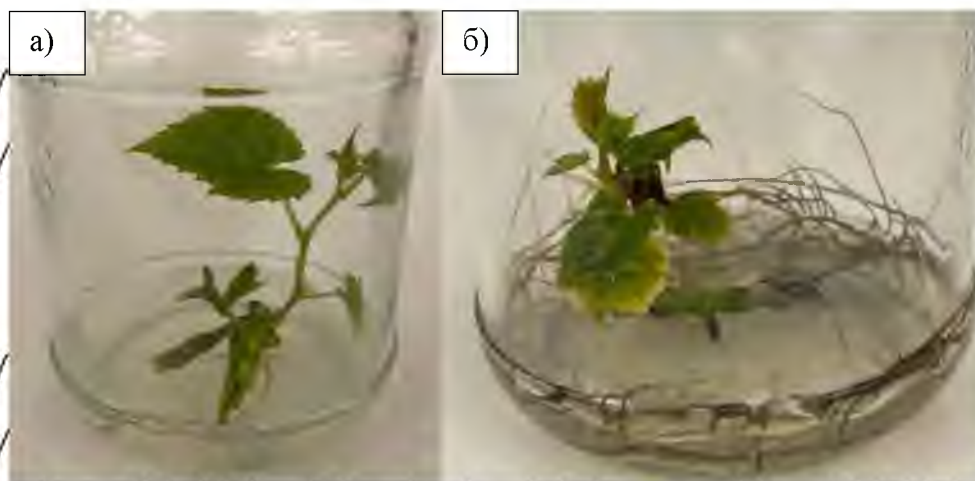


Рис. 3.4. Порівняння укорінення рослин-регенератів додавання до ПС ІОК у концентрації: а) – 0,5 мг/л та б) – 2,5 мг/л

Таким чином, генотип і розміри експлантатів, характер і концентрація регуляторів росту є лімітуючими факторами клонального мікроспроможження виноградної лези.

3.4. Визначення оптимального складу поживного середовища для отримання калюсної культури

Для індукції калюсу використовували культивовані *in vitro* листкові пластинки (рис. 3.5), вузлові та міжвузлові сегменти стебла сортів винограду Од чорний та Рошфор.

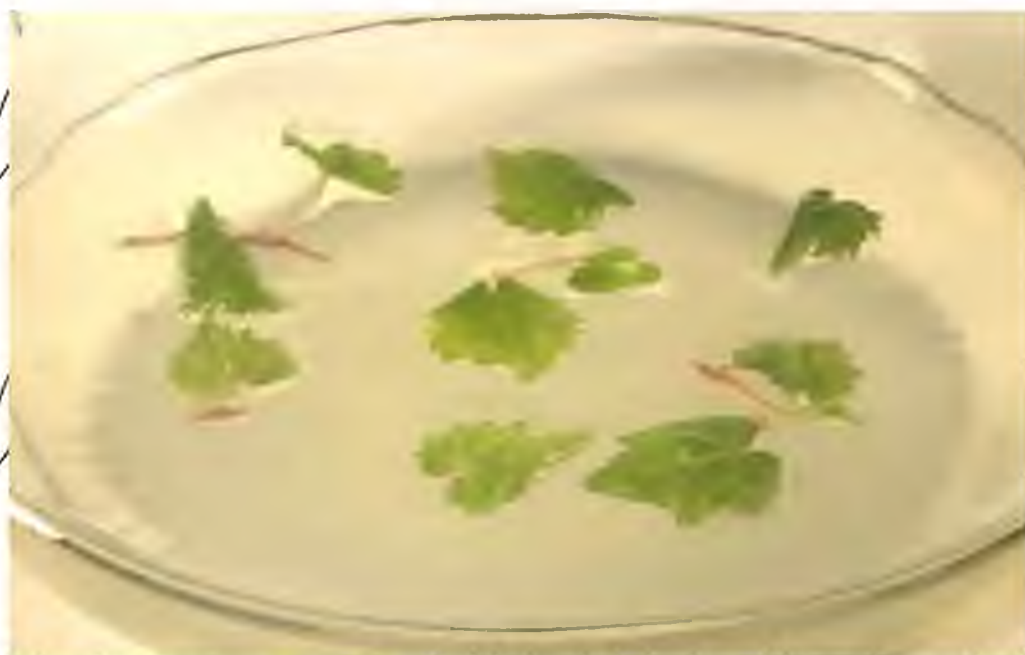


Рис. 3.5. Асептичні листки та частини листків винограду на калюсогенному середовищі

Експланти поміщали на середовище МС, доповнене різними концентраціями регуляторів росту рослин (БАП та НОК). НОК використовували з концентраціями 0,5 та 10 мг/л. Вища концентрація НОК (10 мг/л) у поєднанні з нижчою концентрацією 6-БАП (0,5 мг/л) викликала найбільшу кількість калюсу – 91% (рис.3.6).



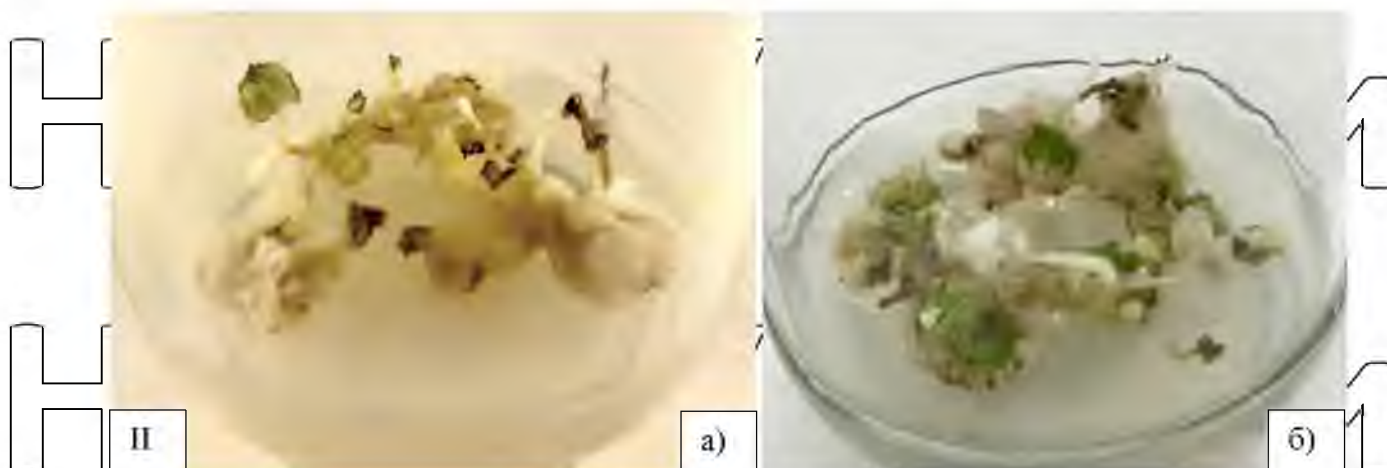


Рис. 3.6. Калюсогенез на середовищі МС з додаванням БАП (0,5 мг/л) та

НОК (10 мг/л): I – листкових пластинок, II – вузлових та міжвузлових

сегментів стебла на: а) 4 тиждень та б) 6 тиждень культивування

Низький рівень утворення калюсу – 17% спостерігали на середовищі такого ж складу регуляторів росту зі збільшеним вмістом інозиту – 1 мг/л

(рис.3.7). Середовище, що містило регулятори росту БАП та НОК у

концентраціях 2 мг/л та 0,5 мг/л відповідно, сприяло морфогенезу пагонів з подальшим утворенням листків (рис. 3.8).



Рис. 3.7. Калюсогенез сегментів стебла на середовищі МС з концентрацією

інозиту 1 мг/л та додаванням БАП (2 мг/л) та НОК (0,5 мг/л) на: а) 4

тиждень та б) 6 тиждень культивування

НУБІП України



Рис. 3.8. Морфогенез калусної тканини на середовищі МС, що містить БАП (2 мг/л) та НОК (0,5 мг/л) на: а) 4 тиждень та б) 6 тиждень

культивування
Таким чином, виявлено, що поєднання високої концентрації ауксину хімічного походження – НОК (10 мг/л) та невеликої кількості цитокініну БАП (0,5 мг/л) позитивно впливають на індукцію калусу. Однак, менш варійовані їх кількості сприяють морфогенезу калусних клітин експлантів.

3.5 Дослідження якісного та кількісного вмісту фенольних сполук

У ході дослідження виявлено, що додавання ферулової кислоти до поживного середовища сприяє накопиченню в листках фенольних сполук. Як показано на рис. 3.9 загальний вміст фенолів у досліджуваних екстрактів листків змінювався між сортами та коливався від $34,8 \pm 0,14$ мг/г у сорту Подарунок до $53,3 \pm 0,16$ мг/г у сорту Од чорний. Сорти Рощфор та Салераві продемонстрували середні значення $44,2 \pm 0,12$ мг/г та $36,5 \pm 0,17$ мг/г відповідно.

Таблиця 3.5

Вплив ферулової кислоти на вміст та співвідношення фенольних сполук у листках *Vitis vinifera* L.

Сорт	Феноли, мг/г	Флавоноїди, мг/г	Відношення феноли/ флавоноїди	Антиоксидантна активність, мкм-екв
Рощфор	$44,2 \pm 0,12$	$2,3 \pm 0,03$	15,0	$7,4 \pm 0,04$

Подарунок	34,8±0,14	2,5±0,07	13,3	8,7±0,05
Од чорний	53,3±0,16	2,8±0,05	15,7	5,8±0,04
Сапераві	36,5±0,17	2,4±0,04	15,4	7,7±0,02

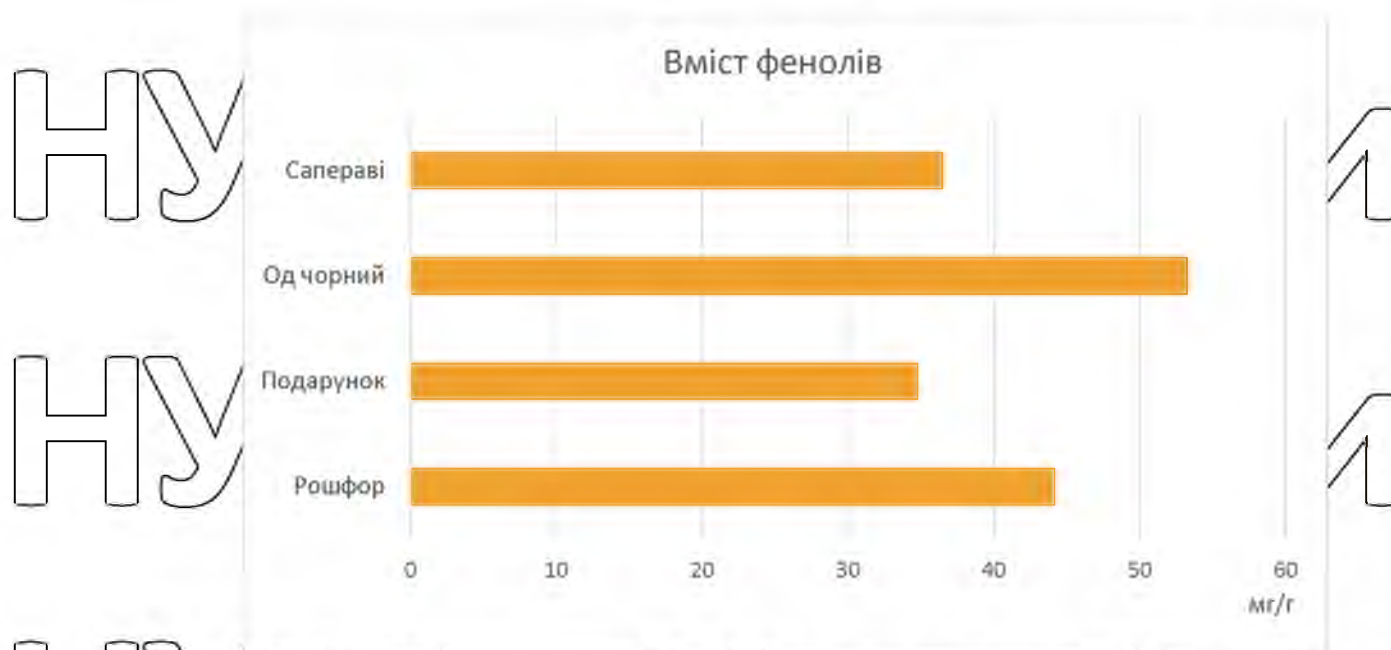


Рис. 3.9. Загальний вміст фенолів у сортах Рошфор, Подарунок, Од Чорний, Сапераві

Під час аналізу хімічного складу вторинних метаболітів у контрольних зразках і в досліджуваних екстарктах листків, що були культивовані на ПС із додаванням ферулової кислоти, за допомогою ВЕРХ були ідентифіковані сполуки, включаючи катехін, епкатехін, сирінгову кислоту, ферулову кислоту, ресвератрол та інші фенольні сполуки.

На основі аналізу хроматографічних піків було визначено сполуки з часом утримання 21,93 хв та 13,8 хв мають УФ-спектри, які властиві ресвератролу та гіцеїду (глікозид ресвератролу) відповідно.

Таблиця 3.6

Якісний склад фенольних сполук у досліджуваних метанольних екстрактах листків винограду (ВЕРХ, ЧУ: час утримання)

Сорт		Рошфор	Подарунок	Од Чорний	Сапераві
Фенольні сполуки	ЧУ	Кількість речовини, %			
Сирінгова кислота	8,14	0,44	1,73	0,018	0,36
Ферулова кислота	12,207	0,13	0,03	0,25	0,08
Ресвератрол	21,93	0,87	0,17	1,52	1,19
Піцеїд	13,8	0,21	0,26	0,18	0,6
Катехін	8,68	4,27	3,83	1,34	4,13
Епікатехін	6,47	5,42	6,00	3,81	3,61
Кверцетин	22,168	0,14	2,17	1,75	0,16
Мірицетин	31,246	0,27	0,2	0,08	0,19

Згідно дослідження, флавоноїди є найпоширенішими фенольними сполуками у всіх досліджуваних екстрактах. Вміст стильбеноїдів (ресверарол, піцеїд) залежить від сорту винограду. Найбільший вміст ресвератролу спостерігали у сорту Од Чорний (1,52% від кількості фенольних сполук).

Разом з тим, серед досліджуваних сортів, вміст ферулової кислоти є найбільшим також у сорту Од Чорний. Також варто відзначити, що загальний вміст ферулової кислоти у контрольних зразках, тобто культивованих рослин-регенерантів на базовому поживному середовищі МС, був вищим.

Активация синтезу ресвератролу та інших стильбеноїдів відбувається через передачу хімічного сигналу під час транспортування ферулової кислоти у низьких концентраціях ксилемою. Після цього фенольна сполука потрапляє в міжклітинний мезофіл від термінальних трахеїд розгалуженої сітки жилок. Ферулова кислота входить до складу клітинних стінок рослин і через ефірний

зв'язок утворює диферулові мости, які сполучають фібрили целюлози. Вихід кон'югатів або диферулових сполук у міжклітинний простір може бути пов'язане з початком деструкції целюлози та геміцелюлози, що часто стається під впливом глюконаз та геміцелюлаз грибів в реальних умовах. Таким чином, існує ймовірність наявності відповідних сенсорних білків в матриці клітинних стінок мезофілу *Vitis vinifera*. Функція цих білків може полягати в захисті під час проникнення целюлозоруйливих грибів у тканини рослини [21]. Виконання цієї функції може активувати відповідні імунні реакції, однією з яких є синтез ресвератролу.

Також слід зазначити, що реакція рослин на екзогенні фенольні кислоти може залежати від того, як ці речовини потрапляють в рослинні тканини. Нами підтверджено, що одноразова обробка поверхні листків рослин-регенерантів винограду 1 мкМ розчином ферулової кислоти протягом 24 годин не призвела до помітного підвищення синтезу ресвератролу в рослині. У таких умовах зовнішні кутикулярні бар'єри, які сповільнюють проникнення ферулової кислоти в тканини листків, були перешкодою для відповідних фізіологічних реакцій рослин.

3.6 Вплив ферулової кислоти на синтез пігментів

Додавання ферулової кислоти до поживного середовища призвело до спостереженого збільшення синтезу хлорофілу *a*. Кількість хлорофілу *a* збільшилася в 12,4 разів, в порівнянні з контролем, в той час як загальна сума хлорофілів зросла у 9,9 рази.

У варіанті контрольних зразків та на середовищі з фенольними кислотами спостерігали максимальні значення поглинання в синьому та фіолетовому спектрах в діапазоні хвиль 470, 445 та 418 нм. Зазвичай це пов'язано із накопиченням великої кількості ксантофілів, включаючи віолаксантин, в листках рослин. Наявність віолаксантину приєє оптимізації фітохімічних комплексів хлоропластів для передачі енергії світла хлорофілам [40]. Це особливо важливо для рослин, які ростуть в умовах обмеженого світла

і штучного освітлення. Загалом, ферулова кислота виявляє позитивний вплив на якість фотосинтетичного апарату рослин.

Таблиця 3.7

Вплив ферулової кислоти на вміст пігментів у листках
винограду *in vitro*

Пластидні пігменти, мг/г	Контроль	Сорти винограду <i>Vitis vinifera</i> L.			
		Рошфор	Подарунок	Од чорний	Сапераві
Хлорофіл <i>a</i>	0,14±0,01	2,4±0,06	1,8±0,04	2,1±0,05	1,76±0,03
Хлорофіл <i>b</i>	0,09±0,01	0,78±0,03	0,27±0,02	0,55±0,03	0,37±0,02
Хлорофіл (Хл) (<i>a</i> + <i>b</i>)	0,23±0,01	3,18±0,09	2,07±0,03	2,65±0,07	2,13±0,02
Хлорофіл <i>a</i> / Хлорофіл <i>b</i>	1,5	3,08	6,67	3,82	4,76
Каротиноїди (Кр)	0,52±0,01	1,18±0,04	0,96±0,06	0,91±0,04	0,95±0,05
Хл (<i>a</i> + <i>b</i>) / Кр	0,44	2,7	2,16	2,9	2,24

Додавання ферулової кислоти до середовища культивування впливає на якісний склад каротиноїдів у листках рослин-регенерантів. В спектрограмах спиртових екстрактів рослин, які розвивалися у присутності екзогенної ферулової кислоти, спостерігається підсилення поглинальної здатності світла в синьому ($\lambda_{\max} = 413$ нм), зеленому ($\lambda_{\max} = 537$ нм) та помаранчевому ($\lambda_{\max} = 607$ нм) частинах спектра. Різниця в цих показниках може бути пов'язана з нагромадженням неоксантину в листках, який утворюється в результаті депоксидації віолаксантину [20]. Накопичення неоксантину в асиміляційних тканинах рослин служить джерелом можливої стійкості рослин до стресових умов, оскільки неоксантин є попередником абсцизової кислоти [39]. Загалом,

можна сказати, що вплив окремих фенольних кислот на пігментний склад листків винограду досліджуваних сортів є досить специфічним.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

Застосування сучасних біотехнологічних методів, таких як мікроклональне розмноження, є досить потужним доповненням до традиційних методів; в основному воно використовується для швидкого масового розмноження, підвищення економічної цінності бажаних генотипів, що гарантує отримання здорових і справжніх материнських рослин. Аналіз літературних джерел свідчить, що калюсні клітини мають здатність до синтезу вторинних метаболітів, що є основою отримання сполук фармакологічних дії.

У ході магістерської кваліфікаційної роботи були підібрані умови стерилізації експлантів. Установлено, що найбільш оптимальним способом стерилізації вихідного матеріалу є промивання його у мильному розчині протягом 30 хв, потім обробкою 70% етиловим спиртом протягом 1 хвилини, 0,1% розчином HgCl_2 протягом 7 хвилин з наступним триразовим промиванням автоклавованою дистильованою водою протягом 10 хвилин кожного промивання.

Визначено, що оптимальним середовищем для введення в культуру є базове середовище Мурасіге і Скуга без додавання гормонів. Найбільший приріст пагонів під час власне мікроклонального розмноження отримали на середовищі МС з додаванням регулятора росту БАП у концентрації 1,5 мг/л. Тому, це середовище визначили найоптимальнішим. Для укорінення рослин найбільш вдалою виявилось поживне середовище, що містить $\frac{1}{2}$ компонентів МС (що використовувалося у даній роботі) з додаванням ІОК (2,5 мг/л). Для індукції калюсу та культивування калюсної тканини найбільш вдалим МС з переднянням БАП, у концентрації 0,5 мг/л та ІОК – 10 мг/л.

Встановлено, що додавання ферулової кислоти до поживного середовища призвело до спостереженого збільшення синтезу хлорофілу *a*.

Кількість хлорофілу *a* збільшилася в 12,4 разів, в порівнянні з контролем, в той час як загальна сума хлорофілів зросла у 9,9 рази.

У ході дослідження виявлено, що додавання ферулової кислоти до поживного середовища сприяє накопиченню в листках фенольних сполук.

Під час аналізу хімічного складу вторинних метаболітів у контрольних зразках і в досліджуваних екстарктах листків, що були культивовані на ПС із додаванням ферулової кислоти, за допомогою ВЕРХ були ідентифіковані сполуки, включаючи катехін, епікатехін, сирінгову кислоту, ферулову кислоту, ресвератрол та інші фенольні сполуки.

Отже, в ході дипломної магістерської роботи були виконані всі поставлені завдання. Дослідження з рослинами винограду *Vitis vinifera L.* та отриманою калюсною культурою продовжуються й наявні результати будуть використані для подальших досліджень.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бугасенко Л.О. Морфогенез винограду в культурі *in vitro* / Л.О. Бугасенко, Л.В. Іванова-Ханіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». – 2011. – Т. 24(63), №2. – С. 73-82.
2. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений: учебное пособие / Г.Ж. Валиханова. – Павлодар: Кереку, 2009. – 272 с.
3. Виноградарство і виноробство: міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», 2015. – Вип. 52. – 234 с.
4. Дышко В.Н. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве: курс лекций для аспирантов / В.Н. Дышко. – Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 69 с.
5. Гель І.М. Систематика, ампелографія та селекція винограду / І.М. Гель. – Львів, 2015. – 90 с.
6. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 107 с.
7. Клименко В.П., Павлова И.А., Зленко В.А. Биотехнология в селекции и размножении винограда: исторические аспекты и перспективы развития // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. Тр. ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН». – Том XLIX. – Ялта, 2020. – 270 с.
8. Кулуев Б. Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Основы биотехнологий растений: учебное пособие / Б.Р. Кулуев [и др.], по ред. Р.Г. Фархутдинова – Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. – 244 с.
9. Медведева Н.И., Поливара Н.В., Трошин Л.П. Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. 2010. №62.
10. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – К., 2014. – 247 с.
11. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин / М.М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.

12. Рябовол Л.О. Капосна культура та культура клітинних суспензій / Л.О. Рябовол // Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур». – Умань: УНУС, 2020. – 18 с.

13. Сегет О. Л., Авдеенко И.А. Использование биологических методов при микроклональном размножении культурного винограда // Вестник КрасГАУ. 2021. №1. С. 70-76.

14. Фаустов В.В., Тарасов В.М., Прохорова З.А., П.Н. Орлов. Садоводство и цветоводство / под ред. В.В. Фаустова. – М: Колос, 1983. – 335 с.

15. Шевченко І.В. Обирайте сертифіковані саджанці / І.В. Шевченко, В.С. Чісніков, Н.М. Зеленянська // Farmer – 2008. - №11 (20). – С. 38-39.

16. Зеленянська Н.М. Теоретичні та практичні основи окремих прийомів вирощування щеплених саджанців винограду в Україні [Текст]: наук.-метод. Пос. / Н.М. Зеленянська – Варшава: «Diamond trading tour», 2014. – 108 с.

17. Abbott JA, Medina-Bolivar F, Martin EM, Engelberth AS, Villagarcia H, Clausen EC, Carrier DJ. 2010. Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Biotechnol Prog* 26 : 1344–1351

18. Bansal Y, Bharati A. 2021. In vitro production of alkaloids: a review. 10.5958/2455-7218.2020.00050.9. *The Journal of Indian Botanical Society* 100: 145-15

19. Blume Y, Krasnylenko Y, Yemets A. 2017. The role of the plant cytoskeleton in phytohormone signaling under abiotic and biotic stresses. In: Mechanism of plant hormone signaling under stress. 10.1002/9781118889022.ch23

20. Bouvier F., D'Harlingue A., Backhaus R.A., Kumagai M.H., Camara B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Europ. J. of Biochem.* 2000. 267 (21). P. 6346—6352.

21. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol. J.* 1995. 28. P. 25—30

22. Buer C.S., Imin N., Djordjevic M.A. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Biology*. 2010, 52 (1), P. 98–111

23. Cai Zh., Kastell A., Mewis I., Smetanska I. 2011. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9:1-9

24. Chowdhury M.M.H., Ashrafuzzaman M., Begum S.N., Islam M.M., Dhar P. Regeneration of plantlets from grape (*Vitis vinifera* L.) through different explants. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 7(2): 2012, P. 12-18.

25. Erdman JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G and Burrowes J. 2007. Flavonoids and heart health. Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition* 137: 718-737

26. Fadhlina A, Bohari S, Chua L, Adrus N, Rahmat Z, Al-Moalemi H. 2021. Biochemical characterization of *Orthosiphon aristatus* and evaluation of pharmacological activities. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 3: 1-17

27. Gabr AMM, Mabrok HB, Sytar O, Smetanska I. 2021 Recent advances toward development of plant cell culture process for sustainable production of lignans and their health benefits. In: Malik S. (eds) *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58271-5_10

28. Galzy R. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings / R. Galzy, V. Haffner, D. Compan // *Journal of Experimental Botany*. – 1990. – V. 41. – P. 295 – 301.

29. Georgiev MI, Eibl R, Zhong JJ 2013. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. doi: 10.1007/s00253-013-4817-x. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(9):3787-3800

30. Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B, Chong J. 2009. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol* 9: 54-58

31. Li, H. B., K. W. Cheng, C. C. Wong, K. W. Fan, F. Chen and Y. Tian. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102: 771-776

32. Lu M. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through 2005;107:64–9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.014>

33. Marchur V. Y., Marchon N.A. Analytical characteristics of phytoalexin resveratrol. *Farmatsevychnyi Zhurnal* №6:2012, P. 3-10

34. Mostafa FMA, Shaaban MM, Elazab DS, et al. In vitro propagation of four grape cultivars. *Assiut J Agric Sci* 2015;46:65–76. DOI: <https://dx.doi.org/10.21608/ajas.2015.542>

35. Muchtaridi M, Fauzi M, Khairul Ikram NK, Mohd Gazzali A, Wahab HA. 2020. Natural flavonoids as potential angiotensin-converting enzyme 2 inhibitors for Anti-SARS-CoV-2. *Molecules* 25 : 3980

36. Mullins M. G. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixes in vitro / M. G. Mullins, C. Srinivasan // *Journal of Experimental Botany*. 1976 – V. 27. – P. 1022–1030.

37. Nadra K., Maqsood A., Ishfaq H., Nadeem A., Shaghef E., Muhammad A. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *Int. Sci. Vigne Vin*, 2015, P. 37-45.

38. Narayani M, Srivastava S. 2017. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*. 16. 10.1007/s11101-017-9534-0.

39. Parry A.D., Babiano M.J., Horgan R. The role of carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta*. 1990. 182. P. 118–128.

40. Ruban A. V., Phillip D., Young A.J., Horton P. Excited-state energy level does not determine the differential effect of violaxanthin and zeaxanthin on chlorophyll fluorescence quenching in the isolated light-harvesting complex of photosystem II. *Photochemistry and Photobiology*. 1998. 68, N 6. P. 829–834

41. Sibgatullina, G.V., Haertdinova, L.R., Gumerova, E.A., Akulov, A.N., Kostjukova, Yu.A., Nikonorova, N.A. & Rumiantsyeva, N.I. (2011). Methods for determining the redox status of cultivating plant cells. Kazan: Kazanskiy (Privolzhskiy) Federalnyiy universitet, 61 s.

42. Tanaka Y, Sasaki N and Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:733-749

43. Vi Morel G. La culture des meristemes caulinaires // *Bulletin Soc. fr. physiol. Veg.* -1965.-V. 11, № 3. -P.64-67.

44. Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D.M., Sporns P. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavours, Texture, and Bioactive Food Components. Ed. by E. Wrolstad. Pigments and colorants, 2005. F. 4. P. 175–176.

45. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. 2002. Free radical properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6):1619-1624

46. Zapata M, Rincón J, Andrés C. 2021. Kinetics of the thermal degradation of phenolic compounds from achiote leaves (*Bixa orellana* L.) and its effect on the antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 10.1590/fst.30920

47. Zhang ZZ, Li XX, Chu YN, Zhang MX, Wen YQ, Duan CQ, Pan QH. 2012. Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 74-83

НУБІП України

НУБІП України