

НУБІП України

НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.07 – МКР. 216 «С». 2023.15.02. 2 ПЗ

НУБІП України

**КИКОТЬ ДМИТРО ВІКТОРОВИЧ**

**2023 р.**

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

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

# НУБІП України

УДК 57.085.23

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

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

# НУБІП України

# НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
на тему «Мікроклональне розмноження високорослих сортів лохини  
*Vaccinium sp.*»

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)

# НУБІП України

Гарант освітньої програми  
д. с.-г. наук, професор  
(науковий ступінь та вчене звання) Лісовий М.М.  
(підпис) (ІПБ)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи  
к. біол. наук, доцент  
(науковий ступінь та вчене звання) Лобова О.В.  
(підпис) (ІПБ)

# НУБІП України

Виконав Кикоть Д.В.  
(підпис) (ІПБ студента)

# НУБІП України

ЗАВДАННЯ  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ  
Кикотя Дмитра Вікторовича  
(прізвище, ім'я, по батькові)  
Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»  
(назва)  
Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)  
Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікроклональне розмноження високорослих сортів лохини *Vaccinium sp.*»

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. Введення в культуру *in vitro* *Vaccinium sp.*
2. Регенерація пагонів *Vaccinium sp.* на середовищі AN
3. Мікроклональне розмноження сортів лохини *Vaccinium sp.* в *in vitro*
4. Метаболізм глутатіону та аскорбату в сортах лохини за розмноження *in vitro* та *ex vitro*

Перелік графічного матеріалу: таблиці, рисунки  
Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи  
Завдання прийняв до виконання

## Реферат

Робота виконана на 55 сторінках, містить 3 розділи, 5 рисунків, 4 таблиці, 67 використаних джерел.

Мета нашого дослідження полягала в тому, щоб одержати рослин-регенеранти лохини в умовах *in vitro* та порівняти антиоксидантні ферменти, відновлений і окислений аскорбат і глутатіон, вміст розчинних фенолів, флавоноїди в трьох сортах лохини.

Середовище Мурасіге та Скуга (MS) і модифіковане середовище Андерсон Рододендрон (mAN) порівнювали для розмноження пагонів *in vitro* трьох сортів лохини висококущової «Берклі», «Блюкроп» і «Спартан». Усі середовища містили 0,5 мг/л зеатину, застосованого окремо або в поєднанні з 0,1, 1 та 5 мг/л ІМК. Укорінення *in vitro* спостерігали на середовищі mAN з додаванням 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активованого вугілля. Отримані результати

показали, що середовище mAN є більш придатним для розмноження *in vitro* відібраних висококущових сортів лохини, ніж середовище MS. Низька концентрація ІМК ( $\leq 1$  мг/л), додана в середовище mAN з додаванням зеатину, підвищує ефективність розмноження пагонів лохини високої кущової *in vitro* і може бути рекомендована для широкомасштабного розмноження рослин

високої якості. Середовище MS викликало частковий або повний некроз стебел і листя, який був більш вираженим на середовищах, що містять зеатин, у поєднанні зі збільшенням концентрації ІМК. У випробовуваних сортів лохини укорінюваність пагонів сильно варіювала. Найвищий рівень укорінення та акліматизації досягнуто у сорту Спартан (82,8 та 91,8% відповідно), а найнижчий (10 та 66,7% відповідно) у сорту Берклі.

Сорти лохини були отримані звичайними живцями (взятими за контроль), проліферацією пагонів *in vitro* із вузлових сегментів та адвентивною регенерацією пагонів з листків мікророзмножених пагонів. У рослинах, розмножених *in vitro*, загальний вміст аскорбату та глутатіону збільшився. Листя рослин, отриманих з культури *in vitro*, показали значно вищу антиоксидантну ферментну активність, за винятком

дегідраскорбатредуктази, яка була на однаковому рівні у всіх рослин.

Загальний вміст розчинних фенольних речовин, дубильних речовин і флавоноїдів був підвищений у плодах рослин, розмножених *in vitro*, тоді як у

листках рівні цих метаболітів (крім флавоноїдів) були вищими в рослинах,

отриманих *ex vitro*. Потенціал відновлення глутатіону є найважливішим

параметром, який визначає закономірності росту та диференціювання досліджуваних рослин.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

# Вступ НУБІП України 7

Розділ 1. Огляд літератури ..... 10

1.1. Характеристика лохини роду *Vaccinium* 10

# сп. НУБІП України 11

1.2. Фенольні речовини в ягодах *Vaccinium sp.* ..... 11

1.3. Розмноження *Vaccinium sp.* ..... 14

1.3.1. Статеве розмноження 14

# 1.3.2. Безстатеве розмноження 15

1.3.3. Розмноження сегментами 15

# 1.3.4. Розмноження *in vitro* 17

Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень 21

# 2.1. Вихідний рослинний матеріал 21

2.2. Підбір умов стерилізації експлантів 21

# 2.3. Вплив живильних середовищ та гормонального складу на розмноження пагонів 27

Розділ 3. Результати досліджень 33

# 3.1. Введення в культуру *in vitro* *Vaccinium sp.* ..... 33

3.2. Регенерація пагонів *Vaccinium sp.* на середовищі AN ..... 34

3.3. Мікроклональне розмноження сортів лохини *Vaccinium sp. in vitro*

# НУБІП України 38

3.4. Метаболізм глутатіону та аскорбату в сортах лохини за

розмноження *in vitro* та *ex vitro* ..... 41

# НУБІП України 48

Висновки

Список використаних джерел

49

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВСТУП

Біотехнологія рослин – є одною з найбільших перспективних сучасних напрямів біології взагалі та сільськогосподарського зокрема. Надзвичайно широкий спектр біотехнологічних досліджень щодо рослин вимагає розподілу їх за напрями використання, предметами та об'єктами, методами залучення в експеримент.

Одним із підходів, які широко використовуються в сільськогосподарському, декоративному, лісовому та інших виробництвах, є МКРР. Цей метод успішно поєднується з іншими, наприклад, з оздоровлення рослин від патогенних мікроорганізмів, зокрема вірусів. Крім цього, широке теоретичне та практичне значення мають створення генетично змінених форм, збереження генетичних банків рослин *in vitro*, підтримання колекційних оздоровлених сортів, гібридів із використанням штучних живильних середовищ.

Пошук шляхів прискореного розмноження рослин було завжди актуальним, а тому дослідження в цьому напрямку продовжуються й досі. Основою для проведення досліджень було бажання мати як найбільшу кількість рослин, ідентичність клону, який виділився за комплексом агрономічних ознак в природних умовах.

Зазвичай для швидкого розмноження рослин використовують їхні частини, які, звичайно, мають точку росту.

Переваги прискореного розмноження рослин *in vitro* нині зводять до таких можливостей:

1. Використання мінімальної кількості вихідного матеріалу;
2. Отримання генетично одноманітного матеріалу;
3. Накопичення садивного матеріалу у рослин, які мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному середовищі;
4. Підтримання генотипів, які в свою чергу характеризуються генетичною стерильністю;



5. Збереження в штучних умовах видів рослин, для яких складаються несприятливі зовнішні умови в процесі вирощування, тобто які зникають із лиця планети;

6. Підтримання нормальних умов і збереження колекційних зразків впродовж тривалого часу;

7. Швидкого збільшення площі, зайнятих новими сортами та гібридами;

8. Накопичення садового матеріалу, впродовж року і планування необхідного обсягу до певного строку використання;

9. Отримання великої кількості рослинного матеріалу на малій лабораторній площі;

10. Переривання періоду спокою органів рослин;

11. автоматизація процесів вирощування рослин;

12. виділення форм із зміненою спадковістю;

13. із залученням інших методів отримання оздоровленого садивного матеріалу від патогенної інфекції тощо.

Мікроканальне розмноження рослин (МКРР)- це спосіб безстатевого розмноження багатоклітинних частин рослин, основу якого становить прискорене отримання численних генетично ідентичних форм вихідній частині із застосуванням біотехнологічних методів.

Оснoву МКРР становить можливість утворення повноцінних рослин з окремих органів або частин рослин, які обов'язково повинні мати зачаток пагона. Можна регенерувати рослини *in vitro* з вегетативних органів і навіть, з окремих клітин (тотипотентність рослинних клітин).

Цінність МКРР полягає в можливості поєднання з іншими методами, наприклад, з оздоровленням рослин від інфекцій, зокрема вірусної, позбутися якої іншими методами до тепер не вдавалося, а втрати врожаю від її поширення надзвичайно великі.

Стерильність культури *in vitro* дозволяє використовувати пробірковий матеріал для біотехнологічних, генетичних, фізіологічних, мікробіологічних та інших досліджень.

Крім дотримання загальних біотехнологічних вимог, успіх МКРР залежить і від специфічних чинників: фізіолого-біохімічного стану експланта, складу живильного середовища, умов культивування та інших.

Мета дипломної роботи - підібрати оптимальний склад середовища та умови культивування *Vaccinium sp.* для отримання рослин *in vitro*.

Практичне значення отриманих результатів – отриманні результати можуть бути підґрунтям для подальших досліджень та вивчень щодо вирощування лохини роду *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro* у промислових масштабах.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Характеристика лохини роду *Vaccinium sp.*

Лохина – ягоди які забарвлені в колір індиго з сизуватим нальотом.

Рослина відноситься до розділу *Suapococcus* роду *Vaccinium*. Тривалий час чорниця була відома як «Європейська лохина», оскільки вона не вирощувалася в Європі до 1930-х р. Лохину відрізнити від схожої на вигляд чорниці просто, поділити ягоду навпіл. У лохини світло-зелена середина, в той час як на чорниці червона або ж фіолетова. На відміну від чорниці, ягоди лохини ніжніші по смаковим якостям.

Лохина росте на кущах від 10 см до 4 м заввишки. У виробництві нижчі кущі лохини мають назву «лохина низькоросла» або ж «лохина дика». Високі кущі називають «лохиною високорослою».

Лохина відноситься до роду *Vaccinium*, що також включає інші поширені дикоростуні ягідні культури (зокрема бруслицю і журавлину). На території України в дикому вигляді росте лохина звичайна (*Vaccinium myrtillus*) та лохина (*Vaccinium uliginosum*). Дикоростуча лохина (*Vaccinium myrtillus*) в культуру не введена.

На північно-американському континенті ще на початку минулого століття розпочалася селекційна робота з лохиною високорослою (*Vaccinium corybosum*), в результаті якої з'явилися культурні сорти, що вирізнялись покращеними господарськими ознаками та підвищеною продуктивністю.

найчастіше окультурену лохину називають, великоплідною американською чорницею, що призводить до непорозумінь і суперечок [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

На даний момент в культуру введено широкий асортимент сортів декількох видів лохини, а саме:

Лохина високоросла (*Vaccinium corybosum*) – найбільш розповсюджений вид – сорти цієї лохини достатньо морозостійкі і культивуються практично на

всій території США, а також в Австралії, Новій Зеландії, Китаї та європейських країн, зокрема Польщі, яка стала одним із лідерів цієї культури за останнє десятиліття.

Лохина низькоросла (*Vaccinium angustifolium*) – цей вид має підвищену морозостійкість і придатний для вирощування у більш сурових регіонах (північ США, Канада та континентальний Китай).

Лохина заяча (*Vaccinium ashei*) – сорти цього виду не потребують тривалого періоду понижених температур для яровизації та мають понижену зимостійкість, а тому вирощують в основному у південній частині США.

Останнім часом з'явилися також міжвидові гібриди лохини, які поєднують господарчоцінні ознаки: високу продуктивність, зимостійкість, меншу вибагливість до умов зволоження та ширшу адаптацію до ґрунтових умов [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

## 1.2. Фенольні речовини в ягодах *Vaccinium* sp.

Ягоди лохини в основному популярні завдяки своїм антиоксидантним фітохімічним речовинам, особливо фенольним метаболітам, які відіграють важливу роль не тільки в захисному механізмі рослин, але й у користі для

здоров'я людини.

Найбільша категорія фітохімічних речовин, поліфенольні сполуки, широко поширені в листі, плодах, насінні та квітах. Їхня структура коливається від простих фрагментів, що містять одне гідроксильоване ароматичне кільце, до дуже складних полімерних сполук.

Більшість рослинних фенольних речовин класифікуються на флавоноїди та нефлавоноїди [8]. Хімічна структура флавоноїдних сполук заснована на двох ароматичних бензойних циклах, з'єднаних містком, що складається з трьох атомів вуглецю ( $C_6-C_3-C_6$ ) [9].

Флавоноїди – це сполуки з низькою молекулярною масою, зазвичай зв'язані з молекулами цукру. Вони поділяються на антоціани та антоксантини. Антоціани – це червоні, сині та фіолетові молекули пігменту, а

антоксантини, які включають флавоноли, флавони, флавоноли та ізофлавоноли, є безбарвними або білими або жовтими молекулами [10]. До нефлавоноїдів належать фенольні кислоти (гідроксибензойна  $C_6-C_1$  і гідроксикорична  $C_6-C_3$ ), лігнани  $(C_6-C_3)_2$  і стилбени  $(C_6-C_2-C_6)$ .

Фенольні кислоти та флавоноїди становлять 60% та 30% від загальної кількості рослинних фітохімічних речовин [8]. Інші два підкласи нефлавоноїдів - це танін і лігнін, які є полімерами певної фенольної сполуки та мають високу молекулярну масу з унікальною структурою [1].

Конденсовані дубильні речовини, підклас флавоноїдів, є полімерами катехинів і епікатехинів і містяться в основному у фруктах, зернових і бобових. Шляхи біосинтезу фенольних речовин у рослинах переважно контролюються ендогенними процесами під час диференціації розвитку [3]. Рослинні фенольні сполуки синтезуються з обмеженого пулу біосинтетичних прекурсорів, таких як піруват, ацетат, ацетилкоензим А (КоА), малоніл КоА та кілька амінокислот [3], дотримуючись метаболічних шляхів пентозофосфату, шикімату та фенілпропанойду [32].

Певні похідні гідроксибензойної або гідроксикоричної кислот, такі як хлорогенова, кавава, *p*-кумарова, елагова та ванілова кислоти, широко поширені в листі та плодах ягід *Vaccinium* як природні антиоксиданти [31]. Важливою групою флавоноїдів, які містяться в чорниці, журавлині, брусниці та чорниці, є флавоноли (похідні кверіцетину), антоціанідини, проантоціанідини, катехіни та їх глікозиди [31].

Серед понад 300 різних антоціанідинів, які містяться в рослинах, цїанідин, дельфінідин, петунідин, пеонідин і похідні мальвідину найбільш поширені в цих ягодах [21, 31]. Антоціани, глікозидні форми антоціанідинів, є основними пігментами темних і яскравих фруктів, таких як чорниця, журавлина, брусниця і чорниця. Проантоціанідини, які відрізняються від інших фенольних сполук своєю полімерною структурою, переважно розподілені в чорниці на зелених стадіях і листі [9, 10].

Проантоціанідини можуть міцно зв'язуватися з вуглеводами та білками

та діяти як потужні поглиначі вільних радикалів. Вважається, що вони принаймні в 15-25 разів сильніші за антиоксидантну здатність порівняно з вітаміном E та демонструють широкий спектр фармакологічної активності [11].

Фенольні та флавоноїдні сполуки мають значний внесок у захисні механізми рослин, розвиток плодів та розповсюдження насіння. Флавоноїди, особливо проантоціанідини або конденсовані дубильні речовини, містяться в незрілих фруктах, де їх терпкість і гіркота допомагають стримувати плодюдних від споживання фруктів до того, як вони дозріють [12]. Фенольні

сполуки, такі як лігнін, кутин, суберин, є невід'ємними частинами клітинної стінки рослин, що служить механічною опорою [13]. Ці метаболіти накопичуються для захисту рослин від інфекції [14], механічних пошкоджень [15], харчового стресу [16], холодного стресу [17, 18], світлового та теплового

стресу [19]. Більш тривалий фотоперіод (24 год) посилює синтез антоціану, його похідних і хлорогенової кислоти порівняно з коротким фотоперіодом (12 год) у *V. myrtillus*, вирощеного у Фінляндії [20]. Конститутивні феноли дикої чорниці демонструють різну стійкість до атаки попелиці всередині та між популяціями чорниці [21].

Інвазія трав'янистих членистоногих, борошнистого червця та кліща, вплинула на накопичення фенольних сполук у листі орхідеї та полуниці як захисних механізмів [22]. Важливою функцією антоціанів разом із флавонами

та флавонолами є пігментація квітів і плодів [23], яка приваблює комах і птахів до рослини для запилення та розповсюдження насіння [24]. Крім того, дефіцит

заліза, фосфору та азоту в ґрунті, умови посухи, надмірне застосування гербицидів також можуть викликати виробництво фенольних сполук у рослинах як засіб толерантності [8, 9, 25]. Фенольні речовини впливають на

явище конкуренції під назвою «алелопатія» серед рослин і бур'янів [26, 27]. На додаток до знайомих летких терпеноїдів, прості феноли, такі як

гідроксибензойна кислота та гідроксикорична кислота, впливають на ріст і розвиток сільськогосподарської та біологічної системи [26].

### 1.3. Розмноження *Vaccinium sp.*

Завдяки усвідомленню корисних властивостей ягід *Vaccinium* протягом останніх двох десятиліть у Канаді, Китаї та Туреччині різко зріс ринковий попит і площі вирощування спеціально розроблених сортів чорниці та журавлини [20, 39, 28]. Щоб впоратися з високим попитом на ці ягоди для створення нових ферм, потрібні численні посадкові матеріали. Хоча брусниця, журавлина та чорниця кушова, вирощена з диких насаджень, потребують мінімальної практики вирощування, кількість культивованих господарств зростає. На природно вирощеному промисловому полі низькокушової лохини є багато голих ділянок, які утворилися внаслідок застосування гербіцидів або механічного видалення скальпу, що призвело до низької продуктивності. Щоб прикрити ці неповні площі, зазвичай використовуються посадкові матеріали, розмножені за допомогою звичайного розмноження SC. Розмноження відрізками стебла або кореневища є простим, але займає багато часу для великомасштабного розмноження. Технологія тканинної культури стає привабливим методом розмноження для власників розплідників, а також для виробників ягід завдяки своїй здатності до швидкого розповсюдження завдяки створенню великої кількості стебел, кореневищ (підземних стебел) і гілок [32, 29, 30].

#### 1.3.1. Статеве розмноження

Низькокушова лохина, як правило, сама по собі несумісна, але також повідомлялося про значно вищий рівень самоплідності в кількох генотипах [31, 32]. Справжнє насіння, що виникло із запліднених яйцеклітин у перехресно запилених квітках чорниці та журавлини, використовуються як засіб статевого розмноження. Брусниця є самозапильним видом, але при перехресному запиленні утворюється більший розмір плодів. Перехресне запилення цих ягідних квітів відбувається в основному за допомогою комах-запилювачів, таких як орендовані медоносні бджоли та місцеві бджоли, яких, як вважають, приваблюють рослини яскравим кольором і ароматичним

запахом квітів [24]. Генетичні матеріали двох батьків поєднуються в потомство статевого розмноження, яке має новий генетичний склад, який не ідентичний материнській рослині. Незважаючи на те, що статеве розмноження є легким і численні саджанці можуть бути вирощені з однієї рослини-джерела, потомство саджанців виробляє <50% плодів своїх батьківських клонів низькокушової лохини [133]. При статевому розмноженні рослини чорниці низькокушової зазвичай цвітуть і розвивають кореневища через 3–4 роки після проростання насіння.

### 1.3.2. Безстатеве розмноження

Нестатеве розмноження відбувається природним чином у дикої чорниці, коли її кореневища обрізають або воливають вогнем, затіненням, зариванням або морозом [34]. Інші ягоди *Vaccinium* вегетативно розмножуються стебловими або кореневими живцями та шляхом мікророзмноження, що зберігає бажані генетичні характеристики вихідних матеріалів і досягає швидкого плодоношення [45].

### 1.3.3. Розмноження сегментами

Вегетативне розмноження видів *Vaccinium* вже давно успішно практикується з використанням вузлових сегментів м'якої деревини, напівтвердої деревини, стебел листяної деревини, окремого вузла, поділу підземних кореневищ або навіть живців листових бруньок як пропагул для відтворення генетично ідентичних рослин, які називаються клонами, які зберігають генетичну структуру та однорідність вихідної рослини. Найбільш поширеною практикою є зрізання хвойних порід з використанням молодих пагонів або верхівок пагонів, що містять меристему (рис. 1.1). Кінчики пагонів довжиною приблизно 4–6 см обрізають у материнської рослини та висаджують у ґрунт для гершиків, який можна доповнити гормонами росту, або безпосередньо в полі [35]. СК відрощують пагони та розвивають додаткові корені (рис. 1.1) протягом кількох тижнів за підтримки належної родючості



грунту, температури, вологості та інтенсивності та тривалості освітлення.

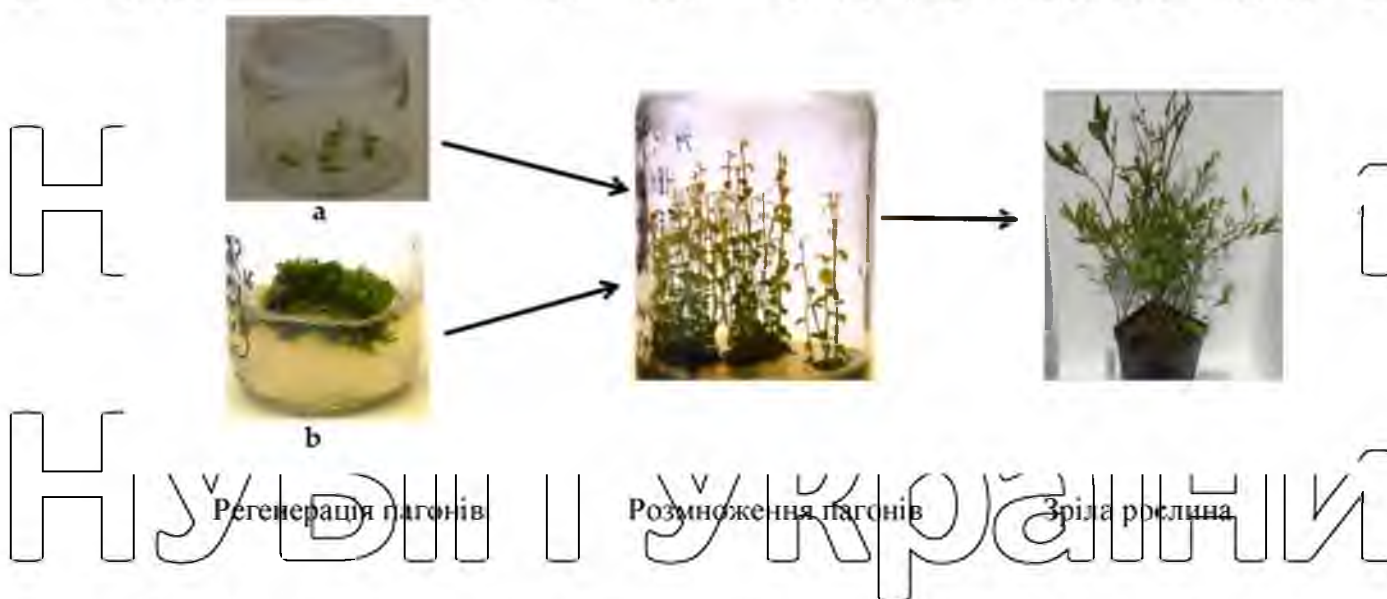


Рис. 1.1. Розмноження живцями м'якої деревини (верхня панель) і мікророзмноження (нижня панель) лохнини [30].

Альтернативною живцям хвойних порід є живці листяних порід, які відносяться до живців, отриманих після того, як рослинна тканина здерев'яніла, як правило, на стадії спокою рослин. Напівтверду деревину та сегменти кореневища вдривають від дорослих рослин і поміщають у ґрунтове середовище для вкорінення. Розмноження SC займає багато часу для великомасштабного розмноження видів *Vaccinium*, оскільки обмежена кількість пропагул може бути отримана з однієї вихідної рослини. Інша складність звичайного розмноження полягає в тому, що SCs мають обмежений потенціал для розвитку нових і наступних кореневищ, які сповільнюють тенденцію до поширення, і вони зазвичай стикаються з проблемами в

здатності до вкорінення [36, 37]. Оскільки ягідні культури *Vaccinium* є гетерогенними видами через включення численних диких клонів з різними клонowymi характеристиками, це є критичною проблемою для комерційного розмноження та створення відібраних клонів. У міру зростання попиту на ці фрукти з боку промисловості та світових споживачів, важливість комерційного розмноження також зростає. Недоліки розмноження SC можна подолати за допомогою методів *in vitro* [38], які могли б задовольнити світовий попит на пропозицію лохини.

#### 1.3.4. Розмноження *in vitro*

Розмноження *in vitro*, яке також називають мікророзмноженням, здійснюється в контрольних середовищах з використанням клітин, тканин або органів рослини як експлантів. Експланти вирощують на штучному середовищі, що складається з води, макроелементів і мікроелементів, деякого джерела вуглецю (зазвичай вуглеводів у формі сахарози або глюкози), вітамінів, регуляторів росту (ауксини, цитокініни та гібереліни) і желатного агента (у разі твердого середовища). В асептичних умовах усі ці компоненти середовища діють разом, щоб забезпечити оптимальні поживні речовини, які забезпечують ріст рослин [46]. Вся процедура проводиться в асептичних умовах, а середовище для вирощування регулярно змінюється для поповнення елементів для продовження росту тканин. Розмноження *in vitro* засноване на посиленні проліферації пазушних бруньок і на здатності рослинних клітин диференціюватися та розвивати нові меристематичні центри, які здатні регенерувати повністю нормальні рослини [39]. Регенерація меристеми, пагона чи кореня здійснюється трьома різними морфогенними шляхами [44]: (1) проліферація пазушного пагона з уже існуючих апікальних або пазушних бруньок, (2) органогенез шляхом утворення однополярного органу або регенерації пагона та (3) соматичний ембріогенез через розвиток біполярних структур, соматичних ембріонів як з кореневими, так і з пагоновими меристемами [40]. Вибір вихідного матеріалу або експлантату в культурі

тканини визначає шлях, який пройде експлант для отримання нових пагонів і рослин.

Регенерація рослин через культуру тканин ґрунтується на дві основні концепції: тотипотентність і пластичність розвитку. Тотипотентність — це здатність клітини диференціюватися, проліферувати і згодом перетворюватися на зрілу рослину за відповідних умов культивування гормонозалежним способом [41]. Загалом тотипотентність є характеристикою клітин у молодих тканинах і меристемах, але вона також може проявлятися

деякими диференційованими клітинами [44]. Хоча цілу рослину можна відновити лише з однієї клітини, практично це складний процес. Коли експлант забезпечений правильним стимулюючим гормоном(ами) і відповідним середовищем, він розвивається в рослину, ідентичну вихідній рослині або клону. Культура тканини може швидко та в асептичних умовах

виробляти велику кількість рослинного матеріалу, одночасно відбираючи та клонуєчи кращі зародкові плазми, які є стійкими до хвороб і забезпечують підвищений рівень вегетативного росту. Техніка тканинної культури є дуже ефективним методом розмноження рослин *Vaccinium*.

Головною перевагою мікророзмноження є те, що воно забезпечує швидке та безперервне постачання масового виробництва здорових, генетично ідентичних та вільних від патогенів рослин протягом усього року [42]. Це безцінна допомога в розмноженні ліній чоловічої стерильності, ліній, що

підтримують і відновлюють фертильність. У програмах селекції багаторічних рослин мікророзмноження може прискорити процес селекції за допомогою селекції *in vitro* та повторного випробування нових випусків [44]. Технологія *in vitro* також пропонує кілька переваг у порівнянні з природними рослинами у виробництві біоактивних сполук [43, 44], таких як (1) умови виробництва

можна оптимізувати та контролювати для отримання бажаного вмісту чистого продукту; (2) біологічні фактори, такі як мікроорганізми, комахи та кліматичні та географічні умови, не можуть впливати на виробництво вторинних метаболітів; і (3) автоматизований контроль росту клітин зменшить витрати

праці на виробництво біоактивних сполук. Однак мікророзмноження є складною процедурою і вимагає складного обладнання, яке включає дороге обладнання та реагенти. Це вимагає висококваліфікованої робочої сили для обробки та обслуговування культур. Процедура культивування тканин, склад середовищ і регулятори росту змінювалися залежно від виду рослин і навіть від різних генотипів одного виду [45], що також збільшувало вартість методу. Укорінення мікроживців *in vitro* є дорогим і навіть може подвоїти ціну живця [46]. Іноді рослини не виробляють регенеранти, що відповідають типу, що обмежує мету комерційного мікророзмноження.

Культивування чорниці *in vitro* було розпочато на початку 70-х років Баркером і Коялінзом [47], які вирощували іматочки кореневища на середовищі Уайта [48] без додавання регуляторів росту. Voxus [49] і Anderson [50] були засновниками комерційного мікророзмноження ягідних культур. Незважаючи на те, що культура тканин висококушової та напіввисокої лохини регулярно використовується більше ніж тридцять років [51], мікророзмноження низькокушової лохини знаходиться на стадії розробки. Перше утворення калюсу було викликано *in vitro* в чорниці низькокушової з використанням міжвузлів стебла Нікерсоном і Холлом [52] на середовищі Мурасіге та Скуга [53] з додаванням гормону росту 2,4-дихлорфеноксіацетової кислоти (2,4-Д). Через два роки Нікерсон [54] індукував сходи з експлантатів саджанців лохини, і автор розвинув калюс у тих самих генотипах, використовуючи експлант плодів [55]. Нині методи культивування тканин практикуються шляхом проліферації пазушних пагонів та формування адвентивних пагонів з використанням напівтвердих і рідких середовищ для лохини низькокушової [38, 56, 57, 58, 59] та її міжвидових гібридів напіввисокої [60, 61, 62] лохини. Найновішим прогресом у мікророзмноженні лохини є розвиток соматичного ембріогенезу [63] у сортів лохини та використання автоматизованих біореакторних систем з рідкими середовищами для розмноження мікропагонів низькокушової та напіввисокої чорниці, отриманих або через проліферацію пагонів, або за допомогою

адвентивної регенерації пагонів [62, 64, 65]. Добре налагоджено мікророзмноження видів журавлини та брусниці з пазушних меристем, а також органогенез пагонів з листових експлантів з різними регуляторами росту рослин [35, 39, 66]. Біореакторна система економічно ефективна для комерційного розмноження. Однак рідка культура, як правило, обмежена

низьким вмістом кисню та гіпергідрогенністю регенерантів [16]. Іншою проблемою при мікророзмноженні дохини з експлантатом пагона є утворення небажаного калюсу біля основи експлантату та поява спонтанних адвентивних пагонів. Відповідний гормон росту, особливо ауксин і оптимальне

співвідношення цитокініну ауксину, допомагають подолати цю проблему. Литвинчук і Вадас [16] повідомили, що використання індол-3-масляної кислоти (ІМК) замість індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) і зниження концентрації N6-(2-ізопентеніл) аденіну (2iP) покращує здоровий пазушний пагін з відносно довгими міжвузлями та жорсткістю, добре розвинене листя у

дохини висококущової та пригнічені до основи несподівані пагони, які були тонкими та крихкими, здебільшого захованими з короткими міжвузлями, меншими та розгорнутими листками.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

### 2.1. Вихідний рослинний матеріал

Метою дослідження було оцінити три сорти похити «Блекроп», «Спартан», «Блекбері», щодо їхньої поведінки в *in vitro*. Відібрані сорти відрізняються хорошим пагоноутворенням, помірним і сильним зростанням, дуже хорошою врожайністю та пристосованістю в різних природно-кліматичних умовах від середнього до великого розміру плодів. Від однорічних пагонів відокремлювали пазушні бруньки. Рослини-донори культивували в ізоляторах, де їх вирощували в індивідуальних контейнерах, стерильному ґрунтовому субстраті, покритому дрібною сіткою для запобігання подальшого зараження переносниками [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

Мікророзмножені рослини вирощували в ростових камерах з контрольованими умовами. Підтримувана температура становила  $22 \pm 25^\circ\text{C}$ , фотоперіод 16/8 день/ніч та освітленістю 2000-3000 лк. Період субкультивування становив 30 днів. Адаптацію вкорієних рослин проводили в стерильному кислому торф'яному субстраті, під поліетиленом, при високій вологості повітря, яку поступово знижували, і температурі  $20-22^\circ\text{C}$ . Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *in vivo* пройшло успішно.

Близько 80-90% з них вижили. Дані оброблялися варіаційно-статистичним методом [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

### 2.2. Підбір умов стерилізації експлантів

Знизити ризик потрапляння вірусів в здорові тканини можна шляхом застосування попередньої термотерапії або хіміотерапії вихідних рослин. Цей метод термотерапії застосовується як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*, передбачає використання гарячого сухого повітря. Для пояснення механізму звільнення

рослин від вірусів в процесі термотерапії існуює багато гіпотез. Згідно з однією з них при високих температурах руйнуються білкова оболонка та нуклеїнова кислота вірусу. Друга гіпотеза припускає дію високих температур на віруси через метаболізм рослин. При такій температурі починає переважати

деградація вірусних частинок, а їх синтез, навпаки, зменшується. Рослини, котрі піддаються термотерапії, поміщають в термокамери, де температура протягом першого тижня підвищується від 25 до 37°C шляхом щоденного збільшення температури на 2°C. Всі інші режими обов'язково підтримуються

в оптимальному стані: освітленість, висока відносна вологість повітря та певний фотоперіод. Тривалість проведення термостатування залежить від складу вірусів та їх термостійкості. Наприклад, якщо для гвоздики досить лише 10-12 тижневого впливу теплом, то для хризантеми цей період перевищує 12 тижнів [Ошибка! Источник ссылки не найден].

Крім позитивної дії високих температур для звільнення від вірусів, виявлено аналогічне вплив їх на точку росту та процеси морфогенезу деяких квіткових культур в умовах *in vitro*. Високі температури збільшують коефіцієнт розмноження на 50 – 60%, підвищують адаптацію пробіркових рослин до ґрунтових умов та дозволяють отримати більше безвірусних

маточних рослин. Інший спосіб оздоровлення - це хіміотерапія. У живильне середовище, на якій культивують апікальні меристеми, додають препарат вірозол, в концентрації 20 – 50 мг/л, але не більше. Це противірусний препарат широкого спектра дії. Застосування його дозволяє збільшити число безвірусних рослин з 40% до 80 – 100%.

Метод передбачає використання хімічних сполук – інгібіторів вірусів, які додаються до складу живильних середовищ. Найбільш часто для цих цілей застосовують 1 β-Д-рибофуранізол-1,2,4 - триазол - 3 карбоксимід. Вірозол зтерилізується шляхом фільтрації та додається у охолоджене середовище. Концентрація препарату залежить саме від виду рослин (1100 мг/л) а тривалість обробки підбирається емпірично. У міру зростання концентрації



посилюється процес елімінації вірусів, однак при концентрації вище 20-50 мг/л зменшується темп зростання і може відбуватися фітотоксичний ефект. Віразол показує високу ефективність при оздоровленні картоплі, черешні, сливи, малини та декоративних рослин.

З метою отримання експлантів для калусних та пухлинних культур, мікроклонального розмноження, вивчення гормональної регуляції використовують стерильні проростки. Насіння для пророщування висівають або на воду, або на живильні середовища. Рослинні об'єкти перед стерелізацією ретельно відмивають водою, іноді з миючими засобами, очищають від зайвих тканин. Рослинні експланти стерелізують розчинами речовин, що містять активний хлор, бром, пероксид водню, спирт, нітратом срібла, діацідом, антибіотиками. Слід підібрати такі концентрації стерелізують агентів, що не пошкоджували б саме насіння, не змінювали їх схожість і забезпечували максимальну стерильність. Етиловий спирт часто застосовують для попередньої обробки, протираючи їм поверхню матеріалу або занурюючи матеріал на кілька секунд в абсолютний спирт. Іноді такої стерелізації досить, її використовують при роботі з плодами, насінням, пагонами та зав'язі.

Гіпохлорит кальцію використовується у вигляді 5 – 7% розчину для обробки зав'язей, квіток, насіння а пагонів протягом 5 – 8 хвилин. Гіпохлорид натрію використовується у вигляді 0,5-5% розчину для обробки будь-яких експлантів протягом 1-2 хвилин. Ця речовина є клітинною отрутою, тому час стерелізації і концентрацію підбирають експериментально. Наприклад: для ізольованих зародків використовують 23% розчин протягом 10-15 хвилин, а для сухого насіння 3-5% розчин протягом години. Залишки гіпохлориду натрію спочатку видаляють 0,01н HCl, а потім 8 разів промивають автоклавуватися дистильованою водою. Хлорамін застосовують в концентрації 1-6%. Молоді зародки обробляють протягом 1-3 хвилин, сухе насіння - 30-60 хвилин, потім промивають стерильною дистильованою водою 2-3 рази. Сулема – токсична речовина і вимагає особливої ретельності, як при



зберіганні, так і при підборі концентрації для окремих об'єктів. Для стерелізації зародків використовують 0,1% розчин від 1 до 3 хвилин, для коренів і бульбоплодів – до 10 - 20 хвилин. Розчини, що містять активний хлор використовуються 1 раз і готують їх безпосередньо саме перед роботою.

Діацид використовується в 0,2% розчині для стерелізації коренів, насіння, шматочків тканин, верхівкових меристем, ізолюваних зародків та циляків.

Діацид готують, розчиняючи окремо 330 мг етанолмеркурхлориду і 660 мг цетилпіридинію хлориду в гарячій воді а потім їх змішують і доводять об'єм рідини до 1л, додають кілька крапель детергента твін-80; зберігають в щільно закритій колбі в темному місці [Ошибка! Источник ссылки не найден].

Антибіотики застосовують для стерилізації рослинних матеріалів, інфікованого бактеріями. Найбільш часто застосовують стрептоміцин та тетраміцин 10-80 мг/л, ампіцилін 200-400 мг/л, левоміцетин, каноміцин та інші. Як стерелізуючого агента застосовують також перокис водню, яка найменше пошкоджує експланти і після якої не потрібно відмивання в стерильній воді, так як вона швидко розкладається. Стерелізацію експлантів необхідно проводити в стерильних умовах: в ламінарному боксі. Колби з експлантів потім поміщаються в абсолютну темряву при кімнатній температурі на один тиждень для виявлення ступеня стерильності. Ті колби, в яких почалося зараження, слід відразу ж видаляти.

Перекись водню – безбарвна прозора злегка в'язка рідина зі слабким своєрідним запахом та «металевим» смаком, необмежено розчиняється у воді, спирті та ефірі. Перекис водню – негорюча, пожежо вибухо-небезпечна рідина, є дуже сильним окиснювачем, енергійно вступає у реакції з багатьма речовинами. Ця рідина здатна мимовільно розкладатися на воду та кисень, змішується з водою у будь яких співвідношеннях . Концентровані водні розчини є вибухонебезпечні.

Пероксид водню є гарним розчинником. Температура плавлення – мінус 0,432°C, температура кипіння – 150,2°C. Основний промисловий спосіб (більше 80% світового виробництва) - це окиснення антрагідрохінону. Також

застосовують анодне окиснення сульфатної кислоти в розведеному розчині.

Промисловий продукт – водний розчин із вмістом  $\text{H}_2\text{O}_2$  від 30 % до 90 %.

Пергідроль – це 30% (35%) розчин пероксиду водню, що містить стабілізуючі добавки [Ошибка! Источник ссылки не найден].

У біологічних системах є токсичний, оскільки утворює вільні радикали.

Знешкоджується за допомогою ферментів антиоксидативного захисту у цитоплазмі клітини та деяких органелах, зокрема мітохондріях та пероксисомах.

Більш концентровані розчини спричиняють серйозні опіки шкіри, слизових оболонок та дихальних шляхів; ГДК в повітрі встановлено на рівні  $1,4 \text{ мг м}^{-3}$ . Білий колір опіку пояснюється окисненням ліпідів, як наслідок епідермальний шар шкіри стає мало прозорим. Через декілька днів ліпідні оболонки оновлюється, опік пергідролем проходить безслідно.

Окисник у складі ракетних палив. Дезінфекційний засіб для знешкодження побутових і промислових стічних вод. В хімічному синтезі: для добування органічних і неорганічних пероксидів, також епоксидів, та гліколіз.

Гіпохлорид натрію – неорганічна сполука, сіль гіпохлоритної кислоти складу  $\text{NaClO}$ . Тривіальна (історична) назва водного розчину солі – «лабораторна вода»

Володіє антисептичними і дезінфікуючими властивостями. Використовується як побутовий та промисловий відбілювач і дезінфектор, засіб очищення та знезараження води, окисник для деяких процесів промислового хімічного виробництва. Як бактерицидний і стерелізуючий засіб застосовується він в медицині, харчовій промисловості та сільському господарстві.

Сполука у вільному стані дуже нестійка, зазвичай використовується у вигляді стабільного пентагідрату  $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  або водного розчину, має характерний запах хлору та високі корозійні властивості. Сполука є сильним окисником, містить 95,2% активного хлору. Під «активним хлором» розуміється та кількість хлору, що виділяється при взаємодії із  $\text{HCl}$ . У

чистому хлорі має 100% «активного хлору». Вміст «активного хлору» у відсотках розраховується як відношення маси одного моля хлору (70,9г) до маси шуканої речовини, здатної при реакції з HCl виділити один моль хлору (74,5 г для NaOCl).

Гіпохлорит натрію, як і більшість інших гіпохлоритів, застосовується в целюлозній промисловості. Перевагою використання саме NaClO<sub>2</sub> є тому, що більша міцність та яскравість обробленої целюлози.

Гіпохлорит натрію знаходить широке застосування в побутовій хімії та входить як активний інгредієнт до численних засобів, призначених для відбілювання, очищення та дезінфекції поверхонь та матеріалів. Серед них найбільш відомим відбілювачем є «Білізна». Засіб являє собою розчин гіпохлориту натрію, який призначається для відбілювання й видалення плям з білих бавовняних та лляних тканин, для миття та дезінфекції посуду, облицювальної плитки та сантехніки.

Може застосовуватися для дезінфекції акваріумів та обладнання. Зазвичай фасується в поліетиленові пляшки.

Етанол є найдавнішим антисептиком який відомий людству. Його здатність знезаражувати поранення була відзначена ще давньогрецьким лікарем Клавдієм Галеном, а пізніше також і середньовічним французьким хірургом Пі де Шоляком.

Етанол є активною складовою спиртних напоїв, які зазвичай виготовляються ферментацією вуглеводів. Саме для промислових потреб етиловий спирт часто синтезують з нафтової та газової сировини реакцією каталітичної гідратації етилену. Окрім виготовлення харчових продуктів етанол застосовується у великих кількостях як паливо, розчинник, антисептик та сировина для отримання інших промислово важливих речовин.

Етанол проявляє свої бактерицидні дії при концентрації 30% і вище, у залежності від типу бактерій, вмісту води та часу дії. Згідно з дослідженнями найбільш ефективною є дію етанолу при його концентрації 60-70% як у

присутності води а також за її відсутності. Саме такий вміст етанолу мають побутові антисептики для рук [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

Використання вищої концентрації (наприклад, 90% розчину) для дезінфекції шкіри не є доцільним, оскільки при таких концентраціях етанол проявляє свої дубильні властивості, в той час як антисептичні властивості спадають.

Принцип дії етанолу на мікроорганізми, ймовірно, полягає у впливі на їхні мембрани та швидкість денатурації білків. Що призводить до порушення метаболізму бактерій та подальшого руйнування клітин. Етанол демонструє

дуже високу біоцидну дію проти вегетативних бактерій (включно з мікобактеріями), вірусів, грибів але не спор.

Через відсутність спороцидної дії етанол не може бути використаний для стерилізації, проте його властивостей достатньо для профілактики знезаражування поверхонь, обробки шкіри [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

### 2.3. Вплив живильних середовищ та гормонального складу на розмноження пагонів

Для фази розмноження були випробувані два базових живильних середовища MS (Murashige and Skoog) та модифіковане середовище Андерсона (mAN).

Середовище Андерсона – середовище AN (Anderson) було модифіковано таким чином: замість 73,40 мг/л Na-EDTA (динатрієва сіль) використовували 37,3 мг/л Na-EDTA і 27,8 мг/л FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O. Середовище містить 0,5 мг/л зеатину, нанесеного окремо або в поєднанні з різними концентраціями (0,1, 1 і 5 мг/л) індол-3-масляної кислоти (ІМК). Усі середовища містили 30 г/л сахарози та 8 г/л агару, а значення рН було доведено до 4,8 перед автоклавуванням. Зеатин стерилізували фільтром (фільтр Milipore, 0,22 мкм) і додавали до середовища після автоклавування [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

У дослідах по розмноженню використовували однорідні поодинокі пагони, вирізані із встановлених культур. Пагони пересівали двічі на кожне середовище, а параметри розмноження визначили при другій субкультурі (35-денний інтервал субкультури). Контрольовані параметри розмноження включили: індекс розмноження та довжину осевих і бічних пагонів. Індекс розмноження визначили як кількість новоутворених пагонів ( $\geq 0,5$  см) на початкову верхівку пагона, зареєстровану після зазначеного інтервалу під культури.

Культури зберігали в камері для вирощування при  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , протягом 16-годинного фотоперіоду. Інтенсивність світла від холодних білих люмінесцентних трубок становила  $54 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Агар-агар один є одним із основних компонентів поживного середовища Мурасіге-Скуга. Агар-агар – це нерозгалужені полісахариди, що містяться в деяких червоних морських водоростях родів *Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*, які ростуть в Чорному, Білому морі і Тихому океані; продукт який одержаний з морських водоростей (бурих, червоних, анфельцій або фуцеллярій).

В залежності від виду водоростів склад виділених полісахаридів може змінюватись. Вуглеводи агару є сумішшю сульфатованих полісахаридів: лінійного полісахариду – агарози та гетерогенної суміші молекул меншого розміру, яку називають агаропектином.

Хімічно агар-агар є полімером який є складеним із частин цукрової галактози та компонентом стінок клітин деяких водоростей (*Sphaerococcus euchema*). У промислових масштабах видобувають із *Gelidium amansii*.

До складу агару входять вуглеводи (до 70%), сполуки білкової природи (1-2%), сліди олії і значна кількість іонів кальцію. Суміш вуглеводів, містить азот, сірку. Агар був вперше використаний в мікробіології в 1892 році німецьким мікробіологом Вальтером Гессеном який був помічником в Роберта Коха. Він виявив, що агар-агар був більш корисним, ніж желатин [Ошибка! **Источник ссылки не найден.**].

Агар-агар незначно рочиняється в холодній воді і набуває в ній. При розчиненні у гарячій воді і подальшому охолодженні агар стає желеподібним.

Агар-агар в гарячій воді утворює колоїдний розчин, який при охолодженні дає хороший і міцний гель, який володіє склоподібним зламом. При нагріванні в присутності кислоти властивість до желеутворення знижується. Гелі стабільні при рН вище 4,5. желеутворююча здатність агар-агар у 10 разів вища, ніж у желатину.

Фітогормони – хімічні речовини, що виробляються в рослинах та регулюють їх ріст і розвиток. Утворюються головним чином в тканинах, що активно ростуть, на верхівках коренів та стебел. До фітогормонів звичайно відносять ауксини, гібереліни і цитокініни а іноді ще й інгібітори росту, наприклад, абсцизову кислоту. На відміну тваринних гормонів, фітогормони менш специфічні та часто діють в тій же ділянці рослини, де утворюються.

Багато синтетичних речовин володіють такою ж дією, як природні фітогормони [Ошибка! Источник ссылки не найден].

Фітогормони (гормони рослин) органічні речовини невеликої молекулярної маси, утворюються в малих кількостях в одних частинах багатоклітинних рослин і діють на інші їх частини як регулятори та координатори росту і розвитку. Гормони з'являються у складних багатоклітинних організмів, у тому числі рослин, як спеціалізовані регуляторні молекули для здійснення найважливіших фізіологічних програм, які вимагають координованої роботи різних клітин, тканин і органів, нерідко значно віддалених один від одного.

Фітогормони здійснюють біохімічну регуляцію – найважливішу систему регуляції онтогенезу у багатоклітинних рослин. У порівнянні з гормонами тварин специфічність фітогормонів виражена слабше, а діючі концентрації як правило в них вищі. На відміну від тварин, у рослин немає спеціалізованих органів (залоз), що виробляють

гормони [Ошибка! Источник ссылки не найден]. Можна характеризувати антагоністичний вплив різних фітогормонів на проходження певних процесів у рослинному організмі. Наприклад, гібереліни сприяють проростанню. В

пивоварній промисловості доведеним є той факт, що при обробці зерен ячменю гібередіном, спостерігається пришвидження проростання для отримання високоякісного солоду. Обробка позитивно впливає на швидкість росту та рівномірність розвитку паростків. Затримує процес проростання абсцизова кислота.

Цитокініни сприяють утворенню листових зачатків а також ауксини стримують цей процес. Закладанню та росту листя, пагонів і колоса також перешкоджає абсцизова кислота. Вплинути на цей процес можна, наприклад, за допомогою цитокінінів або гальмування дії азолі, стробілурину, азоту. Але

чи завжди це буде доцільним - залишити рослину беззахисною перед стресовими умовами? Коли стресові періоди надійно обмежені у часі, такі дії можуть дати бажаний результат підвищення продуктивності, але перед довготривалим стресом це може знизити шанси рослини на подальший розвиток та виживання.

Гетероауксин ( $\beta$  – індолілоцтова кислота) – речовина групи ауксинів, фітогормон, стимулятор росту рослин. Належать до речовин високої фізіологічної активності, що утворюються в рослинах і впливає на ростові процеси (у т. ч. на гормон росту); є одним з найбільш широко поширених

ауксинів.

Вперше був виділений в 1934 році з культури пліснявілих грибів та інших мікроорганізмів голандським хіміком Ф. Кегелем, пізніше виявлений і у вищих рослин, утворюється з амінокислоти триптофану в листках а також потім переміщується у зростаючі стебла та коріння рослин, де окислюється і переходить у діяльний стан.

Гетероауксини можна отримати синтетично шляхом взаємодії індолу та глікогенової кислоти, в присутності луку під дією високої температури.

Також його можна отримати синтетично шляхом взаємодії індолу та гліколевої кислоти в присутності луку під дією високої температури. Ще його можна отримати гідролізом індол-3-ацетонітрилу.

Порівняльна простота його синтезу сприяла вивченню дії гетероауксину на рослинний організм, а також застосування в рослинництві, наприклад, для прискорення утворення коренів при розмноженні рослин живцями. В залежності від виду і ступеня одеревяніння рослини, що черенкуються, дози гетероауксину коливаються від 50 до 200 мг/л. Фізіологічна роль гетероауксину в рослинах настільки різноманітна, що й донині не з'ясована у всіх деталях. Крім стимуляції розтягування клітин рослин, гетероауксин впливає і на інші процеси. Під його дією збільшується поділ клітин. Відомо, що процес опадання листя контролюється гетероауксином: перед опаданням його приплив з листа у черешок сильно скорочується. Обробка черешка гетероауксином є запобіжником опадінню. Особливо складними здаються механізми регуляції гетероауксином процесів цвітіння і плодоношення. Він впливає на стать утворюваної квітки, на ріст плодів, стимулюється гетероауксином, що утворюється в насінні і надходять звідти в тканину плоду. Якщо насіння видалити, зростання плоду призупиняється, однак він знову відновиться після того, як плодова тканина почне отримувати гетероауксин штучним шляхом.

Гетероауксин, в малих концентраціях стимулює ріст рослин, а у більших виявляється його інгібітором [Ошибка! Источник ссылки не найден].

Загалом регулюванню з боку фітогормонів піддаються такі процеси як проростання рослин, утворення і диференціація органів, проходження відповідних стадій розвитку, пригнічення або стимулювання апікальної домінанти, перерозподіл асимілянтів, старіння рослини та дозрівання плоду, період спокою зародка перед проростанням. Різні фітогормони мають відповідний спосіб хімічної дії, утворюються в різних місцях у рослині, а також характеризується різними механізмами перенесення їх у рослині.

Фітогормони - органічні сполуки різної хімічної природи, які продукують спеціалізовані тканини вищих рослин і в низьких концентраціях проявляють регуляторний вплив на процеси онтогенезу, регулюють ріст та розвиток рослин.



Утворюються, головним чином, в меристемах, що активно ростуть, в зонах апексів коренів та стебел.

Для росту та диференціації будь-яких рослинних клітин необхідні ауксини і цитотокініни. Гібереліни використовують дуже рідко. Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автоматичного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, то їхній ріст в значній мірі залежить від постачання екзогенних регуляторів росту [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Відмінності у потребі в екзогенних ауксинах і цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин: тканин, які ростуть на середовищі з ауксинами (експланти топінамбура, корені цикорію);

- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура кінчика корінця білого турнепса);

- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експланти ботюону), тканини кореня моркви;

- тканини, які ростуть на складних за вістом компонентів середовища без регуляторів росту.

Для отримання та підтримання культур тканин використовують: ауксини, індолилцтову кислоту в концентрації 1-30 мг/л,  $\alpha$ -нафтилцтову кислоту в концентрації 0,1-0,2 мг/л та 2,4-дихлорфеноксцтову кислоту в концентрації меншій, ніж 1 мг/л [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Для індукції утворення калусу, як правило, використовують вищі концентрації ауксинів а при наступних пересадках тканина може рости при зменшеному у 10 разів вмісті ауксинів.

Для росту клітин та органів рослин в культурі *in vitro* як цитокініни використовують: кінетин 6-бензиламінопурин, зеатин та інші.

Ауксини нагромаджуються в ростучих частинах рослин і сприяють надходженню в них поживних речовин та води. Найбільш вивченим ауксином, який одержано також синтетичним шляхом, є гетероауксин (індел-3-оцтова

кислота  $C_{10}H_9O_2N$ ). Гетероауксин та його хімічні аналоги застосовують в рослинництві для посилення коренеутворення в живців деревних порід [Опшибка! Источник ссылки не найден].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Введення в культуру *in vitro* *Vaccinium sp.*

Оптимальні умови стерилізації поверхні експлантів підбирають залежно від типу та ефективності використовуваних дезінфікуючих засобів.

Здатність до регенерації рослин в умовах *in vitro* багато в чому залежить від ефективності використовуваних дезінфекційних засобів.

Для стерилізації використовують доступні та відносно недорогі дезінфікуючі речовини, у тому числі 70% етанол, розчин хлориду ртуті та відбілювач.

Під дією хлористої ртуті (0,01% і 10% - і 15% розчину відбілювача, спостерігалось забруднення рослинної сировини майже на 70-75% (табл. 3.1).

У випадках використання хлориду ртуті результати показали пошкодження тканин рослин та наявність грибкових і бактеріальних інфекцій при стерилізації експлантів у 70% етанолі (1 хв) і 0,01% хлориду ртуті (1 хв).

Перші ознаки забруднення *Vaccinium sp.* експлантів після впливу 70% етанолу (1 хв) та розчинів з низькими концентрації відбілювача (10 хв) експонувалися на 5-ий день культивування – 75% рослин було заражено.

В результаті підбору умов експериментальної стерилізації ці умови були визначені як оптимальні: 70% етанол (1 хв) і 20% розчин «Білізна» (20 хв).

Це призвело до отримання до 90 – 100% життєздатних експлантів. Відсутність бактеріальної та грибової інфекції на 14-15 добу і пізніше дало підставу вважати культуру дошки асептичною.

Такі умови стерелізації експлантів були використані й надалі. Згідно з літературними даними, NaOCI є менш токсичним для експлантів рослинної тканини порівняно зі сполуками ртуті та досить ефективним для видалення патогенів рослин.

Таблиця 3.1.

Вплив стерелізуючих розчинів на життєздатність експлантів

Експозиція стерелізуючих розчинів, хв	Асептичні експланти, %	Життєздатні експланти, %	Забарвлення експлантатів
70% етанол (1 хв) + 0,01% хлорид ртуті (1 хв)	0	10	Зелено-коричневий
70% етанол (1 хв) + 0,1% хлорид ртуті (2 хв)	0	35	Коричневий
70% етанол (1 хв) + 10% «Відбілювач» (40 хв)	5	15	Зелений
70% етанол (1 хв) + 15% «Відбілювач» (15 хв)	0	75	Світло-зелений
70% етанол (1 хв) + 20% «Відбілювач» (20 хв)	7	90	Світло-зелений

### 3.2. Регенерація пагонів *Vaccinium sp.* на середовищі AN

Отримані результати показали, що модифіковане середовище AN є більш придатним для розмноження *in vitro* відібраних сортів лохини, ніж середовище MS (табл. 3.2). Пагони, розмножені на MS, демонстрували нижчу швидкість розмноження та слабший ріст, ніж пагони на модифікованих середовищах AN з таким же гормональним складом. Також було доведено, що середовища з низькою титною концентрацією придатні для культивування *Vaccinium sp.* Середовищем, що найчастіше використовується для розмноження лохини є середовище AN.

Модифіковане середовище AN було кращим за розмноження пагонів, подовженням та якістю пагонів у всіх сортів (рис. 3.1.). Суттєві відмінності в параметрах розмноження також спостерігалися серед середовищ з різним гормональним складом (табл. 3.2). Що стосується Блюкроп, Берклі, середовище, що містить зеатин у поєднанні з 0,1 мг/л ІМК, дало вищу швидкість розмноження пагонів, ніж середовище для розмноження лише із зеатином. Розмножувальна здатність Spartan на середовищі, що містить зеатин у поєднанні з 0,1 і 1 мг/л ІМК, значно збільшило довжину осьових пагонів в усіх сортів. Крім того, додавання 0,1 і 1 мг/л ІМК значно збільшило довжину осьових пагонів у всіх сортів.

Ці результати свідчать про те, що середовище AN, що містить зеатин 0,5 мг/л у поєднанні з низькою концентрацією ІМК, може бути успішно використане для мікророзмноження трьох сортів лохини. Численні дослідження показали, що зеатин є важливим регулятором росту рослин для ефективного розмноження та росту *Vaccinium sp.*

Результати вкорінення *in vitro* представлені в (табл. 3.3). Укорінення пагонів у досліджених сортів лохини сильно різнилося. Модифіковане середовище AN, доповнене 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активного вугілля, було найбільш ефективним для індукції коренів «Spartan». Показник укорінення у цьому сорті (81,8%), поряд з більшістю інших параметрів укорінення, було значно вищим, ніж у сортів Берклі, Блюкроп і становив 10% та 39,1% відповідно.

Таблиця 3.2

Вплив базового середовища та гормонального складу на параметри розмноження у різних сортів лохини після 35 днів культивування

Сорт	Базальне середовище	Комбінація регуляторів росту (мг/л)	Індекс множення	Довжина осьового відростка (см)	Довжина бічних пагонів (см)
Беркли	mAN	зеатин (0,5)	2,60	2,01	0,98
		зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	2,21	2,32	1,14
		зеатин (0,5) + ІМК (1)	1,92	2,23	1,61
		зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,60	1,75	-
		зеатин (0,5)	1,42	1,38	0,81
	MS	зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	1,22	1,33	0,85
		зеатин (0,5) + ІМК (1)	1,09	1,51	0,70
		зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,00	1,46	-
		зеатин (0,5)	2,12	1,77	1,04
		зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	2,50	1,69	0,89
mAN	зеатин (0,5) + ІМК (1)	1,62	2,08	1,20	
	зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,25	1,77	0,77	
	зеатин (0,5)	1,88	1,29	0,91	
	зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	1,79	1,36	0,95	
	зеатин (0,5) + ІМК (1)	1,26	1,46	0,83	
Блюкроп	MS	зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,00	1,37	-
Спартан	mAN	зеатин (0,5)	2,37	1,77	0,96
		зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	2,21	2,30	1,19

НУБІП України	зеатин (0,5) + ІМК (1)	2,42	2,41	1,31
	зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,70	2,03	1,22
НУБІП України	зеатин (0,5)	2,05	1,77	1,04
	зеатин (0,5) + ІМК (0,1)	1,50	1,54	0,88
	зеатин (0,5) + ІМК (1)	1,00	1,50	-
	зеатин (0,5) + ІМК (5)	1,00	1,32	-
MS				

# НУБІП України

Таблиця 3.3

Параметри вкорінення різних сортів чорниці на модифікованому середовищі AN, доповненому 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активованого вугілля

Сорт	% вкорінення	Середня кількість коренів на вкорінений пагін	Середня довжина коренів (см)	Середня висота вкорінених пагонів (см)
Берклі	10,0	1,0	1,15	2,35
Блюкроп	39,1	1,3	1,04	2,87
Спартан	81,8	2,6	1,06	2,37



Рис. 3.1 Пагони сортів лохини в стадії розмноження на двох прикореневих живильних середовищах середовище MS, що містить 0,5 мг/л зеатину в поєднанні з ІМК при 0,1 мг/л (ліворуч), 1 мг/л (посередині) і 5 мг/л (праворуч).

(Модифіковане середовище AN, що містить 0,5 мг/л зеатину окремо (ліворуч) або в поєднанні з ІМК при 0,1 мг/л (посередині) і 1 мг/л (праворуч).

Отже, середовище MS не можна використовувати для мікророзмноження лохини через низьке розмноження та високу частоту

некрозу пагонів. Низька концентрація ІМК ( $\leq 1$  мг/л), додана в середовище

AN, доповнена зеатином, підвищує ефективність розмноження пагонів лохини *in vitro* і може бути рекомендована для широкомасштабного розмноження високоякісних рослин.

### 3.3. Мікроклональне розмноження сортів лохини *Vaccinium sp.* в *in vitro*

Вирощування експлантів проводили на живильному середовищі WPM, оскільки більшість авторів підтверджують, що його мінеральний склад

найкраще збалансований для розмноження та росту в *in vitro* для багатьох

рослин, зокрема лохини. Проте авторські дані про гормональний склад живильного середовища дуже розбіжні та часто суперечливі. Досліджено вплив гормонального та мінерального складу живильного середовища на

введення в культуру експлантів лохини в *in vitro*. Проаналізовано вплив різних

концентрацій 2iP, мінеральних сполук, вітамінів на висоту, кількість пагонів

та кількість повноцінних регенерантів для мікроклонального розмноження

сортів лохини. Регенеративну здатність експлантів оцінювали за мінливістю параметрів росту та коефіцієнтів розмноження регенерантів.

Умови вирощування – освітлення, температура, вологість, а також

концентрація 2iP у культуральному середовищі суттєво впливають на висоту пагонів сортів.



Для сортів Блюкроп та Берклі максимальну висоту пагонів визначали на середовищі з 4 мг/л 2iP. Більша концентрація (6 мг/л) концентрація регулятора росту пригнічує ріст регенерантів на 35 – 40%. Сорти Блюкроп та Берклі у вищих концентраціях регулятора є токсичними.

Для сорту Спартан концентрація 2iP 8мг/л позитивно вплинула на висоту пагонів та швидкість їхнього росту, тоді як мав найбільш ефективний ріст при концентрації регулятора 10 мг/л (рис. 3.2).

Коефіцієнт розмноження (KR) є мірою ефективності мікроклонального розмноження пагонів у *in vitro*, що визначає кількість новоутворених пагонів.

Встановлено, що значення KR аналізованих сортів значною мірою змінювалося залежно від концентрації 2iP у живильному середовищі. Зі збільшенням концентрації 2iP з 4 до 8 мг/л коефіцієнт KR живильного середовища WPM підвищується для сорту Спартан. Для сорту Спартан регенеративна здатність була при максимальній концентрації 8 мг/л 2iP в живильному середовищі, а для Берклі – 10 мг/л.



Рис. 3.2. Вимрювання пагонів сорту Берклі на живильному середовищі WPM з 10 мг/л 2iP

Таблиця 3.4

Висота регенерантів залежно від концентрації 2iP

в живильному середовищі

Концентрація	Висота регенерантів, см
--------------	-------------------------



2iP, мг/л	Спартан	Блюкроп	Берклі
контроль	0,27 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,63 ± 0,03
4	1,22 ± 0,4	3,03 ± 0,9	3,46 ± 1,0
6	2,56 ± 0,8	2,01 ± 0,6	2,11 ± 0,6
8	3,58 ± 1,2	–	–
10	2,92 ± 1,0	–	–

На підставі отриманих результатів встановлено, що для розмноження та розвитку пагонів Блюкроп та Берклі характерна обернена залежність від дози стимулятора росту: максимальна кількість КР зафіксована при найменшій концентрації 2iP в живильному середовищі – 4 мг/л, при збільшенні дози регулятора до 6 мг/л спостерігається помітне зниження його значення КР; концентрація 8 мг/л і 10 мг/л були інгібуючими для дослідження сортів (табл.

3.4).

Додавання в середовище 0,4 мг/л індолилшотової кислоти (ІОК) призвело до появи великої кількості нових пагонів. Спеціально для регенерантів сорту Берклі значення КР зросло до 2,3 (рис. 3.3), але ріст пагонів сповільнився, а пагони з часом побуріли.



Рис. 3.3. Сорт Берклі на WPM з концентрацією 2iP 4 мг/л

Під впливом гіберелінової кислоти (ГК) у тій же концентрації подовження пагонів посилювалося, але їх кількість не збільшувалася, КР у цьому сорту становив 1. Підвищення концентрації гормону до 1 мг/л викликало інтенсивний калусогенез, що пригнічував ріст регенерантів. Для ініціювання росту бруньок сорту «Patriot» при 0,4 і 0,8 мг/л концентрації ІОК у культуральному середовищі були неефективними, прискорення росту бруньок не досягнуто. Лише збільшення концентрації ІОК до 4 мг/л стимулювало ріст пагонів, але середнє значення КР не перевищувало 1. Довге культивування пагонів призводить до руйнування хлорофілу в листках.

Пересадка етіолозованих пагонів на живильне середовище з більшою концентрацією  $2iP$  (6 мг/л або 8 мг/л) сприяло відновлення хлорофілу та більш активному росту.

Розмноження регенерантів сорту Блюкроп було складним і важко було ідентифікувати компоненти живильного середовища. Використання 0,4 мг/л та 4 мг/л ІОК було неефективним для розвитку бруньок. Вплив 0,8 мг/л ІОК покращував їх ріст, але зазвичай один листок активно ріс, а пагони не ставали довгими. Застосування 0,8 мг/л ГК стимулювало фазу натягу пагонів, але не вплинуло на швидкість їх розвитку – вони росли повільно і з часом побуріли.

Таким чином, результати дослідження показують, що ефективність різних фітогормонів та їх концентрації визначаються особливостями кожного генотипу *Vaccinium sp.* різновиду. Узагальнення експериментальних даних дає підстави підтвердити, що для отримання регенерантів з помірною кількістю пагонів визначальної якості в культуральному середовищі WPM визначальною є концентрація регулятора росту дії цитокінінів  $2iP$ .

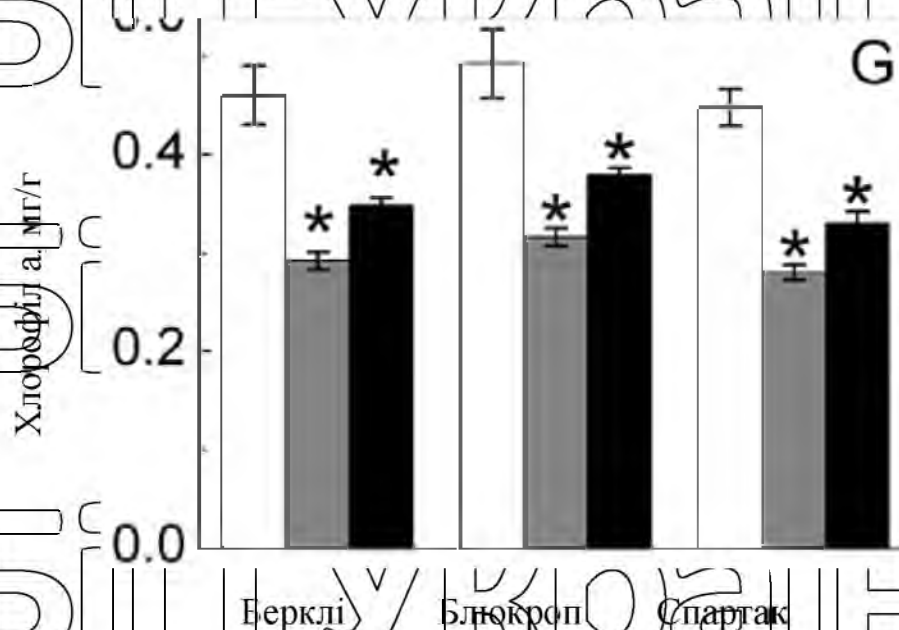
#### **3.4. Метаболізм глутатіону та аскорбату в сортах лохини за розмноження *in vitro* та *ex vitro***

Лохину розмножували трьома різними методами: 1) зрізанням м'якої деревини, що є найбільш поширеним методом вегетативного розмноження, який використовується для комерційного вирощування (SC); 2) шляхом

мікророзмноження вузлових експлантів, отриманих з материнської рослини (NC) і 3) шляхом регенерації з листя, взятих з мікророзмножених пагонів (LC). У всіх сортів рослини, отримані в культурі *in vitro* (NC і LC),

перевершували рослини *ex vitro* SC за кількістю пагонів, розгалуженням і кореневищем, тоді як рослини LC характеризувались більшою кількістю листків на гілці, але меншим вторинним розгалуженням, порівняно з рослинами розмноженими НК *in vitro*. Дані показують мнливність як щодо сорту, так і щодо методу розмноження. Показано, що багато вегетативних

характеристик (так... як висота, кількість кореневищ на рослину та листя на гілку) збільшилися в рослинах, що розмножуються тканиною (більше в LC, ніж у NC), порівняно з рослинами SC. Навпаки, кількість ягід на рослину, середня маса ягід і діаметр ягід були нижчими в рослинах тканинної культури порівняно з такими у рослинах SC, які були найнижчими в рослинах NC. Така ж тенденція спостерігалась у вмісті Chl a і b, який був нижчим у рослинах, розмножених культурою тканин, ніж у рослинах SC (рис. 3.4).



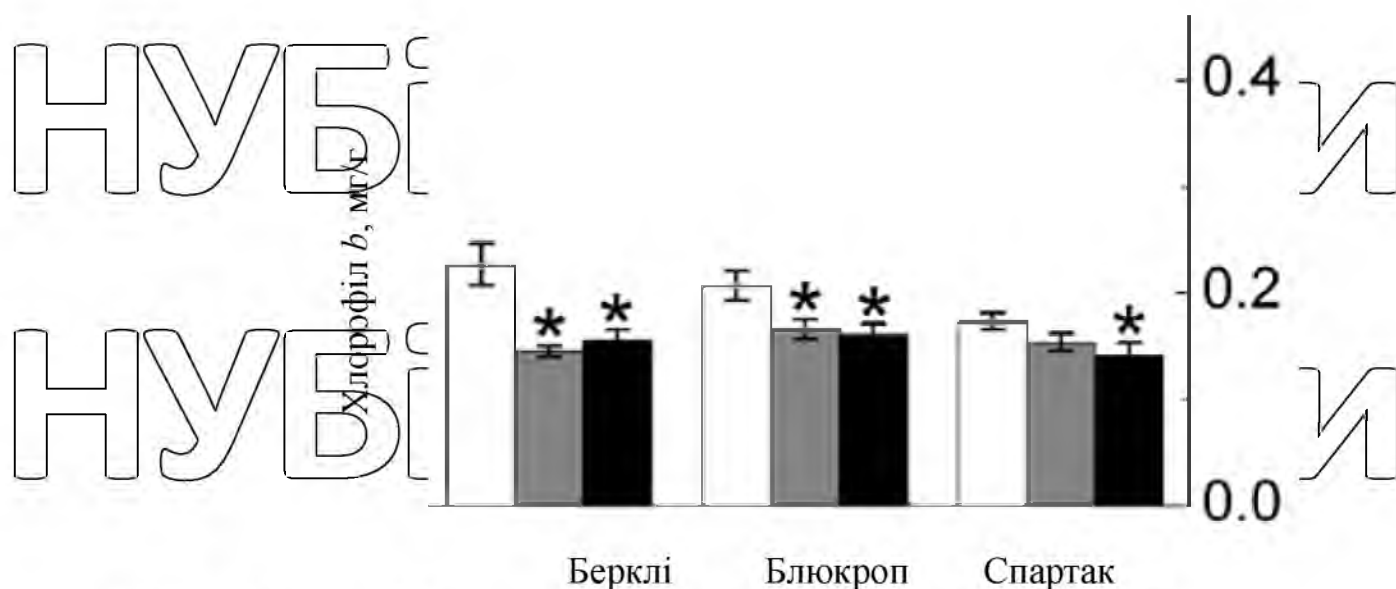


Рис. 3.4. Вміст хлорофілу а і хлорофілу б листя сортів Берклі, Блюкроп, Спартак, отриманих трьома різними методами розмноження: черешком (контрольні рослини, білі смуги), культурою вузлів (сірі смужки) і культурою листя (чорні смуги).

Вміст загального аскорбату (AsA + DHA) і загального глутатіону (GSN + GSSG) в дрізів'язі як залежно від сорту, так і від способу розмноження (рис. 3).

3). Загальний вміст аскорбату був приблизно однаковим у всіх трьох сортах SC і NC, але вищим у тканині листя LC. Це збільшення було найменшим у Берклі, більшим у Блюкроп і понад 30% у Спартак. Серед SC вміст загального аскорбату був найвищим у Блюкроп. Вміст загального аскорбату значно збільшився у всіх сортах LC порівняно з SC, але менше в NC. Вміст загального глутатіону також був майже однаковим у всіх рослинах SC. Він значно збільшився в NC і LC, що також відповідало зниженню загального глутатіону (рис. 3.5).

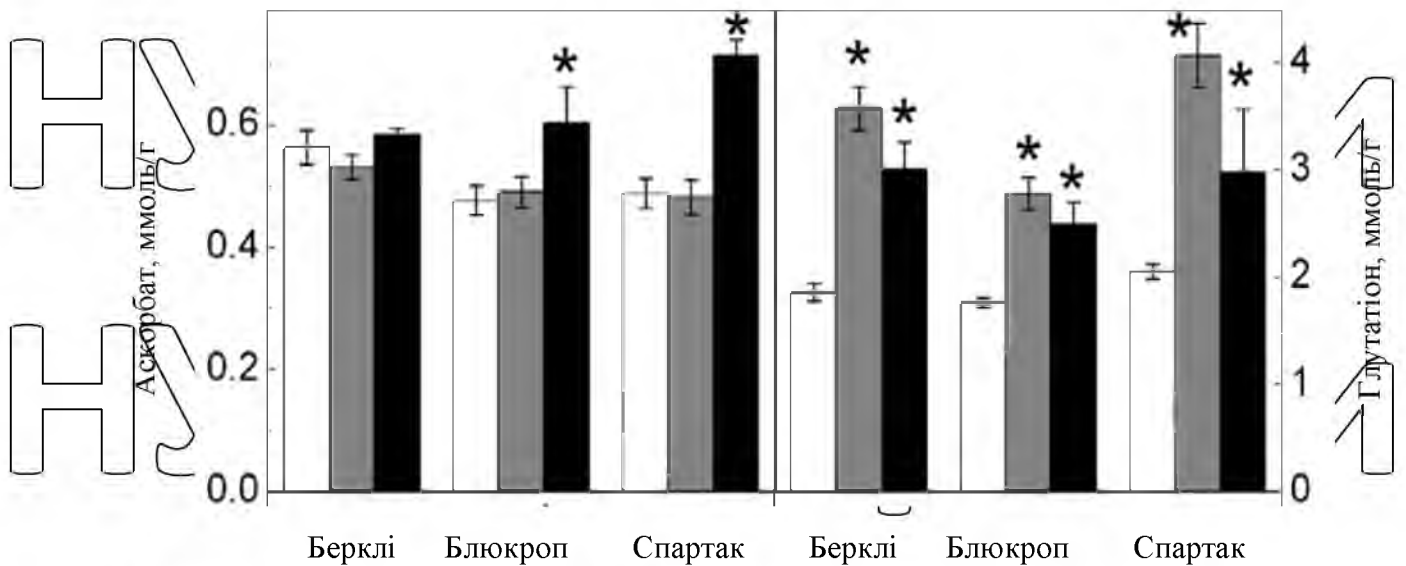


Рис. 3.5. Вміст аскорбату і глутатіону у листі трьох сортів лохини, розмножених трьома різними методами: черешком (контроль, білі смуги), культурою вузлів (сірі смуги), і листової культури (чорні смуги).

Активність ферментів аскорбат-глутатіонового циклу та каталази в листі відрізнялася серед сортів і залежала від способу розмноження (рис. 3.6). У Берклі і Блюкроп активності аскорбат пероксидази в LC були в 5 і 7 разів вищими, ніж у SC, а в NC в 1,5-5 разів вищими, ніж у CS. Активність аскорбат пероксидази в Спартак залишалася однаковою для всіх трьох методів розмноження. Збільшення аскорбат пероксидази загалом відповідає більшому вмісту окислених форм аскорбату. На активність глутатіонредуктази у листках, впливали методи розмноження подібно до аскорбат пероксидази.

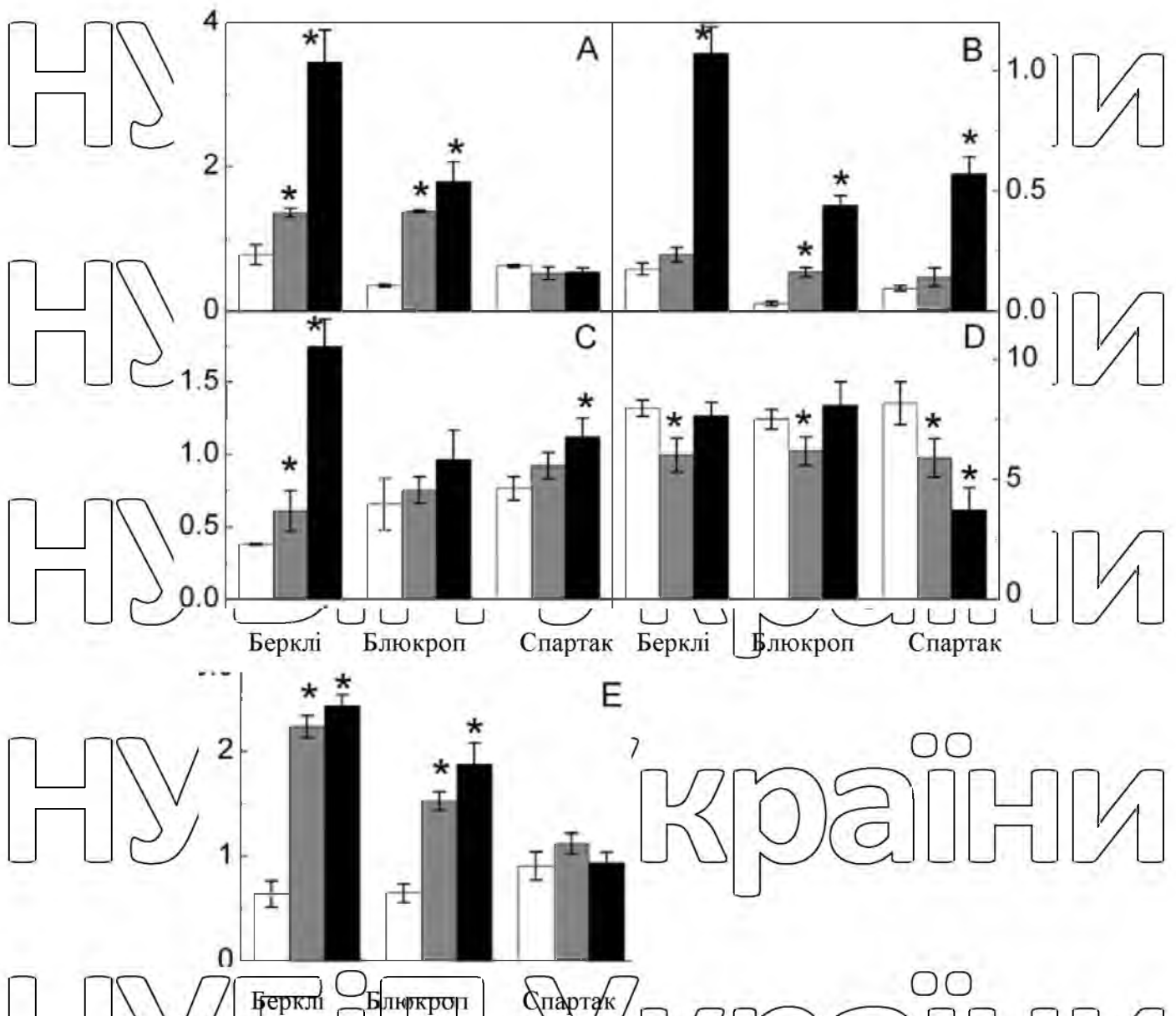


Рис. 4. Активність ферментів аскорбат-глутатіонового циклу (аскорбатпероксидази – А, глутатіонредуктази – В, монодегідроаскорбатредуктази – С, дегідроаскорбатредуктази – Д) та каталази (Е) у листі трьох сортів лохини, розмножуваних обрізанням стебла (контроль, відкриті смуги), культурами вузлів (сірі смуги) та листовими культурами (чорні смуги).

Активність глутатіонредуктази у LC була в 5-10 разів вищою, ніж у SC. Збільшення глутатіонредуктази відповідає зменшенню частки окисленого глутатіону по відношенню до загального вмісту глутатіону. Активність



монодегідроаскорбатредуктази показала подібну картину, як  
глутатіонредуктази, але різниця між LC і SC була найбільш різною в Берклі  
і невеликою в Блюкроп і Спартак. Активність дегідроаскорбатредуктази  
демонструвала зовсім іншу картину порівняно з

монодегідроаскорбатредуктаза, аскорбат пероксидаза і глутатіонредуктази. У  
Берклі і Блюкроп він був трохи нижчим у NC порівняно з SC і LC. У Спартак  
ми спостерігали дуже низьку активність дегідроаскорбатредуктази. Низький  
дегідроаскорбатредуктази разом із високим аскорбат пероксидази фактично

показують узгодженість із вмістом дегідроаскорбата у досліджуваних  
рослинах. Активність каталаза демонструвала подібну картину активності  
аскорбат пероксидази без різниці в Спартак.

Вміст загальних розчинних фенолів та інших антиоксидантних сполук  
демонстрував різні (часто протилежні) закономірності для плодів і листя і

залежав від методів розмноження (рис. 3.7). У плодах він був у 5-10 разів  
меншим, ніж у листі (у розрахунку на одиницю маси свіжого). NC і LC значно  
знизили вміст фенолів порівняно з SC до подібних значень у всіх соргів. У  
плодах спостережувані варіації були меншими, а загальний вміст фенолів, на

відміну від листя, був підвищений шляхом розмноження *in vitro* відповідно до  
попередніх даних Фолі та Дебнага (2007).

Метод розмноження не вплинув на загальний вміст антоціанів, за  
винятком спостережуваного значного зменшення кількості листя рослин

Спартак NC і LC. У плодах вміст антоціанів був майже вдвічі менший, ніж у  
листі. Загальний вміст флавоноїдів був приблизно однаковим у листі та плодах

і був значно вищим у плодах рослин, отриманих *in vitro*, особливо для Спартак.  
Загальний вміст таніну був подібним і був приблизно вдвічі вищим у листі,

ніж у плодах. Загальна здатність поглинати радикали 2,2-дифеніл-1-  
пікрілгідразилу також була вдвічі вищою в листі, ніж у плодах.

Листя

Ягоди

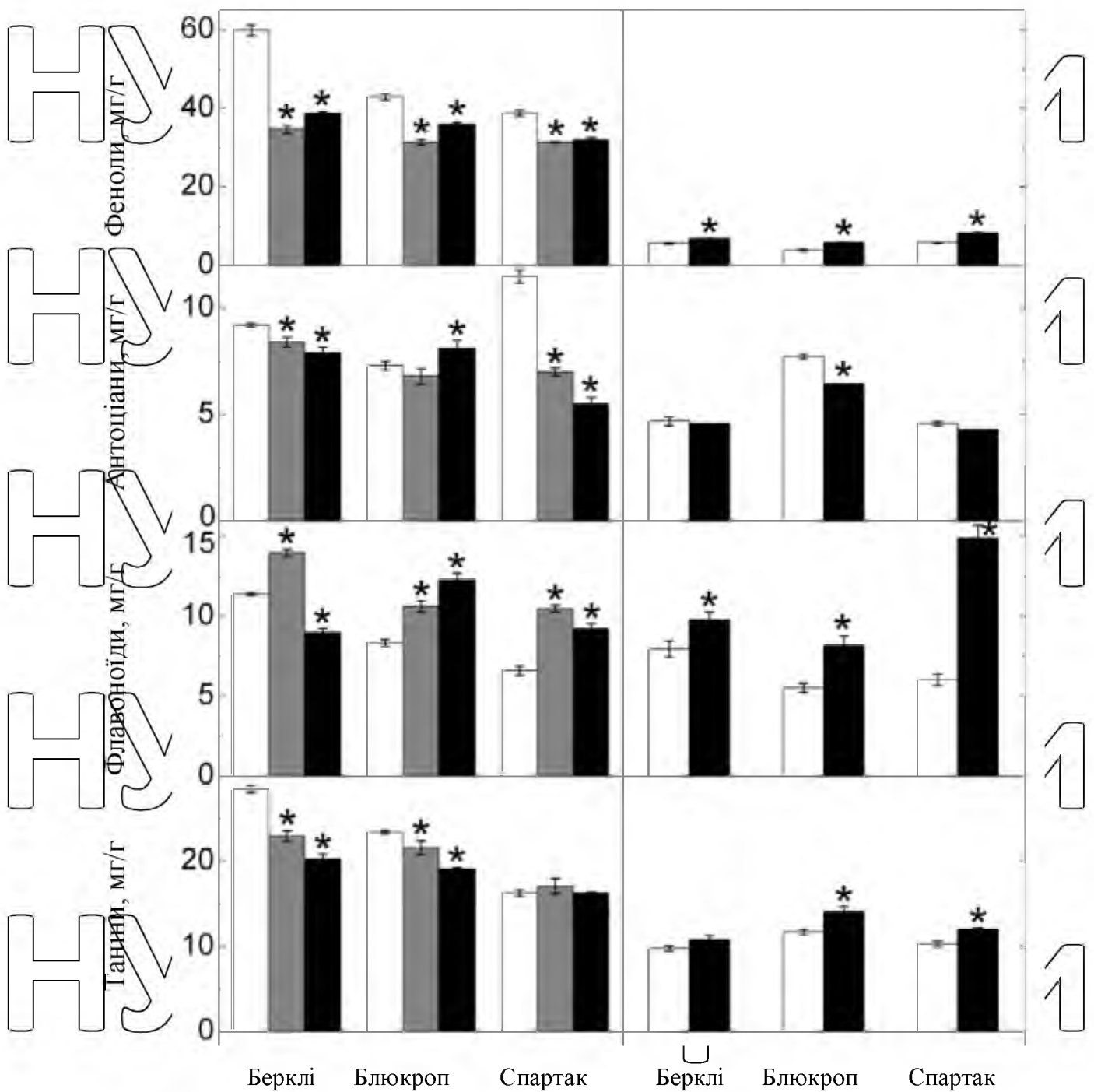


Рис. 5. Вміст загальних фенольних сполук, антоціанів, флавоноїдів і дубильних речовин у листках і плодах трьох сортів лохини, розмножуваних різними способами: черешком (контроль, відкриті смужки), культурами вузлів (сірі смужки), та листових культур (чорні смуги).



У листках спосіб розмноження не впливав на нього, тоді як у плодах рослин, отриманих із культури тканин, здатність до поглинання радикалів була на ~10 % вищою порівняно з SC.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВИСНОВКИ

1. Розмноження лохини *Vaccinium sp.* може бути застосовано для її прискореного розмноження і промислового виробництва посадкового матеріалу.

2. Живильні середовища мають вирішальний вплив на розмноження та ріст лохини. Середовище MS (Murashige та Skoog) не можна використовувати для мікророзмноження лохини через низьке розмноження та високу частоту некрозу пагонів.

3. Низька концентрація ІМК ( $\leq 1$  мг/л), додана в середовище AN, доповнена зеатином, підвищує ефективність розмноження пагонів лохини *in vitro* і може бути рекомендована для широкомасштабного розмноження високоякісних рослин.

4. Середовище AN, що містить зеатин 0,5 мг/л у поєднанні з низькою концентрацією ІМК, може бути успішно використане для мікророзмноження трьох сортів лохини.

5. Показано, що досліджувані сорти лохини можна успішно розмножувати за допомогою пазушного органогенезу на культуральному середовищі WMP, збагаченому 3,0 мг/л зеатину, 2-ізопентаніладеніну та pH 4,2. Потенціал розмноження залежить від типу, концентрації цитокініну, культурального середовища, пасажу, сезонності, типу експланту, генетичних характеристик сорту.

6. Листя рослин, отриманих з культури *in vitro*, показали значно вищу антиоксидантну ферментну активність, за винятком дегідроаскорбатредуктази, яка була на однаковому рівні у всіх рослин.

7. Загальний вміст розчинних фенольних речовин, дубильних речовин і флавоноїдів був підвищений у плодах рослин, розмножених *in vitro*, тоді як у листках рівні цих метаболітів (крім флавоноїдів) були вищими в рослинах, отриманих *ex vitro*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Działo, M.; Mierziak, J.; Korzun, U.; Preisner, M.; Szopa, J.; Kulma, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 160.

2. Nichenametla, S.; Taruscio, T.; Barney, D.; Exon, J. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46, 161–183.

3. King, A.M.Y.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 1999, 99, 213–218.

4. Weidner, S.; Amarowicz, R.; Karama'c, M.; Fraczek, E. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains. *Plant Physiol. Biochem.* 2000, 38, 595–602.

5. Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 1999, 66, 401–436.

6. Randhir, R.; Lin, Y.-T.; Shetty, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2004, 13, 295–307.

7. Riihinen, K.; Jaakola, L.; Kärenlampi, S.; Hohtola, A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'Northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem.*

2008, 110, 156–160.

8. Harris, C.S.; Burt, A.J.; Saleem, A.; Le, P.M.; Martineau, L.C.; Haddad, P.S.; Bennett, S.A.L.; Arnason, J.T. Single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochem. Anal.* 2007, 18, 161–169.

9. Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, S.; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J.; Törmänen, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Int.* 1999, 32, 345–353.

10. Gavrilova, V.; Kajdžanoska, M.; Gjamovski, V.; Stefova, M. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 4009–4018.

11. Cardenosa, V.; Girones-Vilaplana, A.; Muriel, J.L.; Moreno, D.A.; Moreno-Rojas, J.M. Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chem.* 2016, 202, 276–283.

12. Percival, D.; MacKenzie, J.L. Use of plant growth regulators to increase polyphenolic compounds in the wild blueberry. *Can. J. Plant. Sci.* 2007, 87, 333–336.

13. Zifkin, M.; Jin, A.; Ozga, J.A.; Zaharia, L.I.; Schernthaner, J.P.; Gesell, A.; Abrams, S.R.; Kennedy, J.A.; Constabel, C.P. Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiol.* 2012, 158, 200–224.

14. Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4076–4082.

15. Sanoner, P.; Guyot, S.; Marnet, N.; Molle, D.; Drilleau, J.F. Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4847–4853.

16. Wallace, G.; Fry, S.C. Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 1994, 151, 229–267.

17. Beckman, C.H. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000, 57, 101–110.

18. Hahlbrock, K.; Scheel, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989, 40, 347–369.

19. Graham, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 1991, 95, 594–603.

20. Taulavuori, E.; Tahkokorpi, M.; Taulavuori, K.; Laine, K. Anthocyanins and glutathione S-transferase activities in response to low temperature

and frost hardening in *Vaccinium myrtillus* (L.). *J. Plant Physiol.* 2004, 161, 903–911.

21. Molecules 2020, 25, 788–822 of 26–118. Christie, P.; Alferito, M.; Walbot, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 1994, 194, 541–549.

22. Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995, 71, 1085–1097.

23. Uleberg, E.; Rohloff, J.; Jaakola, L.; Tröst, K.; Junttila, O.; Häggman, H.; Martinussen, I. Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 10406–10414.

24. Ranger, C.M.; Singh, A.P.; Johnson-Cicalese, J.; Polavarapu, S.; Vorsa, N. Intraspecific variation in aphid resistance and constitutive phenolics exhibited by the wild blueberry *Vaccinium darrowii*. *J. Chem. Ecol.* 2007, 33, 711–729.

25. Golan, K.; Sempruch, C.; Górska-Drabik, E.; Czerniewicz, P.; Łagowska, B.; Kot, I.; Kmiec, K.; Magierowicz, K.; Leszczyński, B. Accumulation of amino acids and phenolic compounds in biochemical plant responses to feeding of two different herbivorous arthropod pests. *Arthropod-Plant Interact.* 2017, 11, 675–682.

26. Strack, D.; Wray, V. The anthocyanins. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, 1st ed.; Harborne, J.B., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1994; pp. 1–22.

27. Hicks, B.J. Pollination of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) in Newfoundland by native and introduced bees. *J. Acad. Entomol. Soc.* 2011, 7, 108–118.

28. Solecka, D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiol. Plant* 1997, 19, 257–268.

29. Strack, D. Phenolic metabolism. In *Plant Biochemistry*; Dey, P.M., Harborne, J.B., Eds.; Academic Press: London, UK, 1997; pp. 387–416.

30. Xuan, T.D.; Shinkichi, T.; Khanh, T.D.; Chung, I.M. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: An overview. *Crop Protect.* 2005, 24, 197–206.

31. Li, Y.; Hong, Y. The current status and future of the blueberry industry in China. *Acta Hortic.* 2009, 810, 445–456.

32. Jamieson, A.R.; Nickerson, N.L. Field performance of the lowbush blueberry propagated by seed, stem cuttings and micropropagation. *Acta Hortic.* 2003, 626, 431–436.

33. Goyal, J.C.; Igamberdiev, A.U.; Debnath, S.C. Morphology, phenolic content and antioxidant capacity of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) plants as affected by in vitro and ex vitro propagation methods. *Can. J. Plant. Sci.* 2013, 93, 1001–1008.

34. Wood, G.W. Self-fertility in the lowbush blueberry. *Can. J. Plant. Sci.* 2018, 48, 431–433.

35. Bell, D.J.; Rowland, L.J.; Drummond, F.A. Does pollen ‘Neighborhood’ affect berry yield in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait)? *Int. J. Fruit Sci.* 2012, 12, 65–74.

36. Aalders, L.E.; Hall, I.V.; Brydon, A.C. A comparison of fruit yields of lowbush blueberry clonal lines and related seedling progenies. *Can. J. Plant. Sci.* 2019, 99, 875–877.

37. Shorthouse, J.D.; Bagatto, G. Potential role of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) in colonizing metal-contaminated ecosystems. In *Restoration and Recovery of an Industrial Region*; Gunn, J.M., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2015; pp. 247–255.

38. Debnath, S.C. Influence of propagation method and indole-3-butyric acid on growth and development of in vitro- and ex vitro-derived lingonberry plants. *Can. J. Plant. Sci.* 2006, 86, 235–243.

39. Meiners, J.; Schwab, M.; Szankowski, I. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007, 89, 169–176.

40. Litwińczuk, W. Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro

axillary shoot proliferation. *Methods Mol. Biol.* 2013, 994, 63–76.

41. Debnath, S.C. Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of in vitro- and ex vitro-derived lowbush blueberry plants. *Plant Growth Regul.* 2007, 51, 245–253.

42. Debnath, S.C.; McRae, K.B. In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Small Fruits Rev.* 2001, 1, 3–19.

43. Steward, F.C.; Ammirato, P.V.; Mapes, M.O. Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures, and perspectives. *Ann. Bot.* 2010, 34, 761–787.

44. Koog, F.; Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 2007, 11, 118–131.

45. Rani, V.; Raina, S. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2000, 36, 319–330.

46. Chattopadhyay, S.; Farkya, S.; Srivastava, A.; Bisaria, V. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002, 7, 138–149.

47. Hussain, M.S.; Fareed, S.; Ansari, S.; Rahman, M.A.; Ahmad, I.; Saeed, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. BioAllied Sci.* 2012, 4, 10–20.

48. Debnath, S.C. Propagation of *Vaccinium* in vitro: A review. *Int. J. Fruit Sci.* 2007, 6, 47–71.

49. Zimmerman, R.H. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. *Acta Hort.* 1988, 227, 489–499.

50. Barker, W.G.; Collins, W.B. The blueberry rhizome: In vitro culture. *Can. J. Bot.* 2003, 41, 1325–1329.

51. White, P.R. *A Handbook of Plant Tissue Culture*; The Jacques Cattell Press: Lancaster, PA, USA, 2003; Volume 56, p. 151.

52. Boxus, P.H. The production of strawberry plants by in vitro micro-

propagation. *J. Hort. Sci.* 2004, 49, 209–210.

53. Anderson, W.C. Propagation of rhododendrons by tissue culture. 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 2005, 25, 129–135.

54. Zhao, X.; Zhan, L.; Zou, X. In vitro high-frequency regeneration of half-highbush ‘Northland’ blueberry. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 2011, 39, 51–59.

55. Nickerson, N.L.; Hall, I.V. Callus formation in stem internode sections of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) cultured on a medium containing plant growth regulators. *Hortic. Res.* 2006, 16, 29–35.

56. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, 15, 473–497.

57. Nickerson, N.L. In vitro shoot formation in lowbush blueberry seedling explants. *HortScience* 2018, 13, 698.

58. Nickerson, N.L. Callus formation in lowbush blueberry fruit explants cultured in vitro. *Hortic. Res.* 2018, 18, 85–91.

59. Frett, J.J.; Smagula, J.M. In vitro shoot production of lowbush blueberry. *Can. J. Plant. Sci.* 1983, 63, 467–472.

60. Debnath, S.C. In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Rev.* 2004, 3, 393–408.

61. Debnath, S.C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2009, 45, 122–128.

62. Cohen, D. Application of micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 2010, 30, 144–146.

63. Grout, J.M.; Read, P.E.; Wildung, D.K. Influence of tissue culture and leaf-bud propagation on the growth habit of ‘Northblue’ blueberry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2016, 111, 372–375.

64. Read, P.E.; Wildung, D.K.; Hanky, C.A. Field performance of in vitro-propagated ‘Northblue’ blueberries. *Acta Hortic.* 2009, 241, 191–194.

65. Debnath, S.C. Temporary immersion and stationary bioreactors for



mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (Vaccinium spp.). J. Hortic. Sci. Biotechnol. 2017, 92, 72–80.

66. Ghosh, A.; Igamberdiev, A.U.; Debnath, S.C. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. Sci. Rep. 2018, 8, 16978.

67. Debnath, S.C. A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. HortScience 2009, 44, 1962–1966.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України