

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА
РОБОТА**

06.07 – МКР. 1998 «С» 2023.11.01. 10 ПЗ

САМОЛЮКА АНДРІЯ АНДРІЙОВИЧА

2024 р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет (ННІ) Захисту рослин, біотехнології та екології

УДК 606:57.085:577.1

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

« ____ » _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

« ____ » _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Особливості культивування *Daucus carota* in vitro для одержання пігментів і фітонцидів»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Спеціалізація _____
(назва)

Магістерська програма екологічна біотехнології та біоенергетика
(назва)

Програма підготовки освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

д.с.-г.н., професор
(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Лісовий М.М.
(ПІБ)

Керівник магістерської роботи

д. с.-г. наук, професор
(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Коломієць Ю.В.
(ПІБ)

Виконав

_____ (підпис)

Самолук А. А.
(ПІБ студента)

КИЇВ – 2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет(НИ) Захисту рослин, біотехнології та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

к.б.н. Кваско Олена Юріївна

(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)

“ _____ ” _____ 2024 р.

ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Самолюку Андрію Андрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Спеціалізація _____

(назва)

Магістерська програма екологічна біотехнології та біоенергетика

(назва)

Програма підготовки освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської роботи «Особливості культивування *Daucus carota in vitro* для одержання пігментів і фітонцидів»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “1” Листопада 2023р. № 1998С

Термін подання завершеної роботи на кафедру 10 Листопада 2024

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської роботи _____

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Одержання калюсної культури моркви посівної

2. Одержання калюсної культури моркви посівної

3. Виділення каротиноїдів з калюсної культури

Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____

Дата видачі завдання “01 ” вересня 2023 р.

Керівник магістерської роботи _____ Коломієць Ю.В.

(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____ Самолюк А.А.

(підпис) (прізвище та ініціали студента)

РЕФЕРАТ

Бакалаврська робота виконана на 47 сторінках формату А4 та містить 1 таблицю та 7 рисунків, 3 додатки. Список літератури нараховує 40 літературних джерел, 38 з яких іноземними мовами, складається з таких розділів:

- Вступ
- Огляд літератури
- Матеріали і методи
- Результати та їх обговорення
- Висновки
- Список використаної літератури

Об'єкт дослідження: *Daucus carota subsp. Sativus*

Предмет дослідження: Впровадження оптимальних умов культивування *Daucus carota in vitro*.

Методи дослідження: фізіологічні, хімічні, лабораторні, морфологічно-описові

Мета роботи: визначення оптимальних умов культивування рослин *Daucus carota in vitro* для максимізації ефективності отримання пігментів, зокрема бета-каротину, та біологічно активних сполук, таких як фітонциди.

Зміст

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Характеристика виду <i>Daucus carota</i>	8
1.2 Характеристика основних пігментів і фітонцидів <i>Daucus carota</i>	12
1.3 Мікророзмноження рослин виду <i>Daucus carota</i>	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	25
2.1 Об'єкт дослідження	25
2.2 Стерилізація посівного матеріалу	26
2.3 Калюсогенез моркви	27
2.4 Екстракція бета-каротину	28
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
3.1 Калюсогенез моркви і особливості росту калюсу	31
3.2 Вплив складу живильного середовища на ріст калюсу	38
3.3 Виділення каротиноїдів з калюсної культури.....	39
ВИСНОВКИ.....	42
СПИСКИ ЛІТЕРАТУРИ.....	43

ВСТУП

Морква (*Daucus carota*) є одним з найкращих джерел бета-каротину, або ж провітаміну А що має значну біологічну цінність для людини. Деякі сорти моркви можуть містити від 60-120 мг каротину на грам маси, а в окремих випадках до 300 мг каротину на грам. Незважаючи на існування методів хімічного синтезу, досі переважаючим методом отримання каротину залишається його екстракція з природної сировини. Однак використання природної сировини в якості джерела каротину має ряд суттєвих обмежень серед яких: сезонність виробництва, залежність від екологічних характеристик ґрунтів та врожайності рослин, вплив фітопатогенів і вірусних захворювань, що можуть суттєво знизити врожайність і запаси рослинного матеріалу, крім того для вирощування достатніх обсягів рослин для промислового отримання каротину потрібні великі посівні площі сільськогосподарських угідь. Для вирішення цих проблем перспективним є застосування методів мікроклонального розмноження рослин *in vitro* що дозволяє отримувати генетично однорідний стійкій до хвороб і шкідників рослинний матеріал що здатний зберігати високу врожайність, отримувати високу кількість рослин за короткий час і не залежати від кліматичних, екологічних, і погодних умов що забезпечує стабільність виробництва.

Метою роботи є: визначення оптимальних умов культивування рослин *Daucus carota in vitro* для максимізації ефективності отримання пігментів, зокрема бета-каротину, та біологічно активних сполук, таких як фітонциди. Виявлення оптимальних параметрів культивування дозволить створити основи для промислового виробництва пігментів і фітонцидів з використанням біотехнологічних методів.

Мета дослідження: Вивчення найбільш ефективного способу отримання цінних вторинних метаболітів шляхом оптимізації умов культивування *Daucus carota in vitro*.

Об'єкт дослідження: рослина *Daucus carota* (морква) у процесі її культивування *in vitro*.

Предмет дослідження: Впровадження оптимальних умов культивування *Daucus carota in vitro*.

Публікації. Матеріали роботи опубліковані у вигляді тез наступних конференцій: III Всеукраїнська науково-практична конференція здобувачів вищої освіти «Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин», Київ, 2024; Міжнародна науково-практична конференція «Екологія - філософія існування людства», Київ, 2024; X Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», Київ, 2024

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика виду *Daucus carota*

Морква — дворічна рослина сімейства *Ariaceae*, яка цінується за яскраві соковиті коренеплоди. Її відтінки варіюються від темно- червоного до темно- фіолетового, а також білого, жовтого, оранжевого та світло-фіолетового. У помірних зонах моркву часто вирощують навесні, влітку та восени; в тропічному і субтропічному кліматі вирощують взимку.

Однорічна або дворічна прямостояча трав'яниста рослина висотою 20-50 см на стадії зрілого вегетативного розвитку і до 120-150 см під час цвітіння. Має стрижневий м'ясистий корінь, прямий, конічної або циліндричної форми, довжиною від 5 до 50 см і діаметром 2-5 см у верхній частині. Забарвлення кореня частіше за все помаранчеве, але також може бути червонувато-фіолетове, жовте або біле; серцевина (ксилема) зрілих коренеплодів зазвичай світліша за флоему, а верхня частина кореня часто має зеленуватий відтінок. Листя (8-12 штук) утворюють розетку, голі, зеленого кольору, з довгими черешками, часто покритими біля основи; пластинка листя дво- або тричіпериста, з сегментами, розділеними на тонкі лінійні частки. Квітконосні стебла гіллясті, кожна гілка закінчується складним суцвіттям (зонтиком), яке може мати понад 50 зонтичних суцвіть, а кожне суцвіття може містити до 50 квіток. Обгорткові листки приквітків розсічені; головні промені зонтика сягають 2-25 см, вторинні 1-6 см, квітконіжки 0,5-1,5 см. Квітки переважно двостатеві у первинних суцвіттях, а в суцвіттях вищого порядку може збільшуватись кількість чоловічих квіток. У центральних зонтиках, особливо у диких рослин, іноді з'являються кілька пурпурно-червоних стерильних квіток. Квітки дрібні, 2 мм в діаметрі, п'ятипелюсткові, з двома плодолистками. Плід — видовжений шизокарпій завдовжки 2-4 мм, який при дозріванні розпадається на два мерикарпія. Насіння всередині мерикарпія має довгий зародок, оточений ендоспермом. Молоді рослини мають довгий тонкий стрижневий корінь, серцеподібні сім'ядолі і перисті перші справжні листки. [7]

Таксономія моркви з Інтегрованої системи таксономічної інформації (2022) така:

Царство: *Plantae*.

Підцарство: *Viridiplantae*.

Відділ: *Tracheophyta*.

Підвідділ: *Spermatophytina*.

Клас: *Magnoliopsida*.

Порядок: *Apiales*.

Родина: *Apiaceae*.

Рід: *Daucus L.*

Вид: *Daucus carota L.*

Афганістан вважається місцем походження через найвищу концентрацію диких видів. Вважається, що вторинні вогнища різноманітності дикого типу та одомашнення знаходяться в регіонах Східного Середземномор'я та південно - західної Азії. Сорти моркви з фіолетовими і жовтими відтінками спочатку були завезені в Європу, а потім в Індію, Китай і Японію. Дика морква має походження з Євразії, і вважається, що її одомашнили в Центральній Азії приблизно в 1000 році н.е. Під час археологічних розкопок були виявлені доісторичні насінини, які свідчать про використання рослини в медичних цілях ще до того, як її їстівний корінь було одомашнено. Морква почала вирощуватися в Китаї та північно-західній Європі до XIII століття, а дика морква невідомо поширилася в США як бур'ян під час європейської колонізації. [1]

Морква є цікавим джерелом каротиноїдів, вітамінів і харчових волокон; і, крім того, є гарним джерелом мінералів і антиоксидантів.

Крім безпосереднього споживання, сирі або вареної, морква також є сировиною для багатьох промислових харчових продуктів, таких як пюре, консерви, соки та дитяче харчування, серед багатьох інших. [3]

Моркву можна поділити на два основні типи: (1) помірні або європейські сорти, які є дворічними, мають помаранчевий колір, однорідну товщину та маленьку серцевину; та (2) тропічні або азіатські сорти, які є однорічними,

відрізняються червоним кольором, більшою соковитістю, збільшеною серцевиною та важчою верхівкою. У США основними сортами моркви для пучків є Імператор, Голд Спайк та Голд Пак, які характеризуються довгими тонкими коренеплодами з гладкою поверхнею. Натомість сорти з червоною серцевиною, такі як Шантеней, Королівський Шантеней і Осінній король, відзначаються гарним кольором та є популярними для промислової переробки.

Рослини потребують прохолодних або помірних температур, тому їх не вирощують у теплі літні місяці в жарких регіонах. Для успішного вирощування їм потрібен глибокий, родючий і добре дренований ґрунт. Сучасне обладнання висіває насіння у розріджені смуги, щоб рослини мали достатньо простору для розвитку без необхідності подальшого проріджування. Першого сезону над землею формується розетка подвійно складних, дрібно розсічених листків. Їстівний коренеплід утворюється під землею. Якщо врожай не зібрано, рослина зимує, і наступного року утворює великі розгалужені квітконоси. Дрібні білі або рожеві квіти зібрані у великі складні суцвіття (парасольки) на кінцях стебел та гілок. Після цвітіння утворюються колючі насінини, зібрані в сегментовані плоди, які називаються шизокарпами. Насіння, призначене для посіву, попередньо очищається від колючок. Свіжа морква має бути твердою та хрусткою, з гладкою та бездоганною шкіркою. Яскраво-оранжевий колір свідчить про високий вміст каротину ; менші типи є найбільш ніжними. Морква використовується в салатах і як приправа, подається як варені овочі, тушковані страви і супи. [5]

Основна причина продажу моркви з бадиллям полягає в демонстрації її свіжості, оскільки листя зазвичай не споживаються та викидаються. Морква в пучках коштує дорожче через додаткові зусилля, необхідні для підтримання свіжості бадилля, щоб воно не в'януло. На сьогодні більшу частину пучкової моркви замінила морква, що продається в поліетиленових пакетах. Під час цвітіння моркви пильовики дозрівають і опадають ще до того, як маточки стануть здатними до запліднення. Для успішного запилення пилок повинен потрапити з іншої рослини або з пізніших парасольок на тій самій рослині. Таким чином,

насіння моркви є результатом як самозапилення, так і перехресного запилення, що збільшує генетичну мінливість. Існує більше варіацій у формах і розмірах коренеплодів моркви, ніж зазвичай можна побачити на комерційних ринках. У різних регіонах уподобання щодо форми та кольору моркви можуть відрізнятись. [6]

Сорти моркви умовно поділяють на два основні класи: східні (азіатські) та західні (європейські). Європейські сорти характеризуються твердістю, солодкістю, насиченим смаком, кольором від жовто-оранжевого до яскраво-оранжевого, а також адаптацією до низьких температур і стійкістю до повільного розкручування. Азіатські сорти зазвичай мають м'якшу текстуру, менш солодкі та ароматні, пристосовані до високих температур, легко лущаться і можуть бути червоного або червоно-оранжевого кольору. Загальноприйнято вважати, що фіолетова морква, яка містить антоціани, походить з Афганістану, з району, де зливаються гірські системи Гімалаїв і Гіндукуша. Її одомашнили в Афганістані та прилеглих регіонах, таких як Росія, Іран, Індія, Пакистан і Анатолія. Фіолетова морква разом із жовтим різновидом поширилася в Середземномор'ї та Західній Європі між XI і XIV століттями, а також у Китай, Індію та Японію в XIV-XVII століттях. Помаранчева морква, багата каротином, ймовірно, виникла в Європі або в західній частині Середземномор'я шляхом селекції серед жовтих популяцій. Голландські сорти Long Orange і дрібніші сорти Horn стали основою сучасних сортів помаранчевої моркви, які сьогодні вирощують по всьому світу. В Азії помаранчева морква здебільшого замінила фіолетову та жовту через її високу врожайність і зміни в уподобаннях. [8]

Морква має низьку калорійність і є чудовим джерелом β -каротину (від 41 до 475 мкг/г свіжої ваги), який є попередником вітаміну А та позитивно впливає на зір. Порція вагою 78 г забезпечує 270% рекомендованої добової норми (RDA) вітаміну А, 10% вітаміну С та 2% кальцію. Коренеплоди моркви багаті каротиноїдами, до складу яких входять різні форми каротину, зокрема β -каротин (45–80%), α -каротин (15–40%), γ -каротин (2–10%) та інші (3–6%). Морква також

містить значну кількість тіаміну, рибофлавіну, ніацину, фолієвої кислоти та вітаміну С.

Дистильована олія моркви містить леткі компоненти, такі як α -пінен, камфен, β -пінен, мірцен, α -терпінен, цимен, лімонен, γ -терпінен, терпінолен, каріофілен, β -бісаболен, γ -бізаболен, гептенол, дедоценол, міристицин і фалакарінол.

Смак моркви формується під впливом різних речовин: глюкоза, фруктоза та сахароза надають солодкість; леткі моно- і сесквітерпеноїди додають гостроти; 2-ноненал забезпечує аромат приготовленої моркви; ізокумарин та інші фенольні сполуки додають гіркоти; 2-метокси-3-бутилпіразин формує характерний морквяний аромат; вільні амінокислоти сприяють ніжності смаку, а іонони додають квіткові нотки. Коренеплоди моркви містять сахарозу в кілька разів більше, ніж глюкозу та фруктозу. [2]

Морква синтезує широкий спектр фітохімічних сполук, включаючи α -токоферол, каротиноїди, фенольні сполуки та поліацетилени, багато з яких мають антиоксидантні властивості та інші корисні ефекти. Вона є надзвичайно поживним продуктом, багатим на провітамін А, а також містить вітаміни С, D, Е, К, В1, В6 і біотин. Крім того, морква містить важливі мінерали, такі як магній, кальцій, калій, фосфор, органічний натрій, а також безліч інших мікроелементів. [4]

1.2 Характеристика основних пігментів і фітонцидів *Daucus carota*

Морква є унікальним коренеплодом завдяки наявності каротиноїдів у її тканинах. Ці сполуки, що є попередниками вітаміну А, значно підвищують цінність моркви серед інших овочів. Крім того, вона є багатим джерелом клітковини, калію, фосфору та натрію, що є корисним для підтримки нормального функціонування людини. Антиоксидантні властивості моркви зумовлені наявними біологічно активними речовинами, такими як аскорбінова кислота та каротиноїди. Темні сорти моркви також містять значну кількість

рослинних фенолів, зокрема антоціанів. Відомо, що каротинні пігменти захищають рослинні клітини від фотосенсибілізації, виступаючи своєрідними акумуляторами світлової енергії. Пігменти в моркві надають коренеплодам різноманітні кольори, зокрема жовтий, помаранчевий, чорний, червоний, фіолетовий та білий, що зумовлено присутністю основних сполук, таких як каротиноїди та антоціани. Каротиноїди поділяються на вуглеводневі ізопреноїдні одиниці, відомі як каротини, та їх оксигеновані форми, що називаються ксантофілами. Антоціани є найбільшою групою водорозчинних пігментів, що забезпечують фіолетовий, червоний, чорний або синій колір багатьом сільськогосподарським продуктам, таким як фрукти, і основна структура складається з антоціанідинів, які разом із молекулою цукру розпізнаються як антоціани. [9]

Каротиноїди — це група ізопреноїдних сполук, які синтезуються всіма фотосинтезуючими організмами, такими як рослини, а також деякими нефотосинтезуючими грибами та бактеріями. Ці яскраво забарвлені молекули впливають на жовті, оранжеві та червоні відтінки багатьох рослин. Більшість із 40-50 каротиноїдів, що входять до раціону людини, походять із фруктів та овочів. Найпоширенішими харчовими каротиноїдами є α -каротин, β -каротин, β -криптоксантин, лютеїн, зеаксантин і лікопін. Каротиноїди α -каротин, β -каротин і β -криптоксантин є провітаміними А, тому що організм може перетворювати їх на ретинол. Лютеїн, зеаксантин і лікопін не належать до провітамінних каротиноїдів оскільки не можуть перетворюватися на вітамін А в організмі людини. [14] Вітамін А необхідний для нормального росту, розвитку, підтримки імунної системи та зору. На сьогодні в основному відому функцію каротиноїдів у людини є їх здатність діяти як провітаміни А. таким, α -каротин, β -каротин і β -криптоксантин утворюють джерела джерел вітаміну А для організму. Каротиноїди провітаміну А засвоюються менш ефективно, ніж уже сформований вітамін А, оскільки організм повинен перетворити їх на ретинол та інші ретиноїди. Ступінь цього перетворення значно залежить від ряду факторів, таких

як склад продуктів, спосіб приготування їжі, а також індивідуальна здатність людини до травлення та всмоктування поживних елементів. [15]

Останній міжнародний стандарт вимірювання вітаміну А – це еквівалент активності ретинолу (RAE), який оцінює активність вітаміну А у формі ретинолу. Було визначено, що 2 мікрограми (мкг) β -каротину в масляній добавці перетворюються на 1 мкг ретинолу, що відповідає співвідношенню RAE 2:1. Проте для отримання 1 мкг ретинолу з їжі необхідно 12 мкг β -каротину, що дає співвідношення 12:1. Інші каротиноїди провітаміну А засвоюються ще гірше, з RAE 24:1. [16]

У рослинах каротиноїди відіграють важливу роль як антиоксиданти, дезактивуючи синглетний кисень — потужний окислювач, що утворюється під час фотосинтезу. Дослідження показали, що лікопін є одним із найефективніших каротиноїдів у процесі гасіння синглетного кисню. Вони також припускають, що каротиноїди можуть пригнічувати окислення жирів (перекисне окислення ліпідів) за певних умов, хоча їхній вплив на організм людини є більш складним. [17]

Каротиноїди мають характерне жовте, помаранчеве та червоне забарвлення, що спостерігається через наявність спряжених подвійних зв'язків у полієновому ланцюзі, який виконує роль хромофору. Сьогодні відомі різні каротиноїдні структури, які можна класифікувати на дві основні групи: каротини (ненасичені киснем) та ксантофіли (насичені киснем).

Хоча всі пластиди здатні синтезувати каротиноїди, їх якісні та кількісні характеристики значно відрізняються. У фотосинтезуючих тканинах каротиноїди накопичуються у великих кількостях у хлоропластах, де вони сприяють збору світлової енергії та захищають фотосинтетичний апарат від фотоокислювального пошкодження, викликаного надлишковою кількістю світлової енергії. [10]

Значення каротиноїдів у харчуванні виходить за межі їхньої ролі як природних пігментів та біологічних функцій, і все більше уваги приділяється їх

додатковим властивостям. Каротиноїди присутні в регуляції клітин і впливають на експресію генів і клітинні процеси, такі як інгібування адгезії моноцитів і активація тромбоцитів. Їхні біологічні ефекти не залежать від активності провітаміну А, а зумовлені антиоксидантними властивостями, які полягають у нейтралізації вільних радикалів і гасінні синглетного кисню. Каротиноїди є важливими мікроелементами для підтримки здоров'я людини. Їхній загальний вміст у їстівній частині моркви коливається від 6000 до 54800 мкг/100 г. Основна фізіологічна роль каротиноїдів виникає в тому, що вони є попередниками вітаміну А. Основними каротиноїдами є α - і β -каротин. У міру дорослішання рослин вміст зазначених пігментів збільшується, але змінюється і їх співвідношення. Тому в стиглій оранжевій моркві 60% від загальної кількості каротиноїдів складається з β -каротину, 20% припадає на α -каротин, а решта представлена лікопіном, лютеїном, γ -каротином, ζ -каротином, 3-зеакаротин і ксантофілами. [13] За останні роки каротиноїди, зокрема β -каротин, привернули значну увагу до через можливий ефект захисного впливу проти деяких видів раку. У організмі людини α - і β -каротин мають відповідно 50% і 100% активності провітаміну А, при цьому одна молекула β -каротину перетворюється на дві молекули ретинолу.

Висока концентрація антиоксидантних каротиноїдів, зокрема β -каротину, може пояснювати біологічні та лікувальні властивості мікроорганізмів. Було міститься, що морква має сечогінну дію, підтримує азотний баланс і сприяє виведенню сечової кислоти. [11]

Багато досліджень на тваринах та епідеміологічних даних свідчать про те, що каротиноїди пригнічують розвиток раку у миші та щурів, а також можуть мати антиканцерогенну дію на людей. У біологічних системах β -каротин діє як поглинач вільних радикалів і нейтралізатор синглетного кисню, виявляючи антимуутагенні, хіміопротективні, фотозахисні та імуномодулюючі властивості. [12]

Бета-каротин, один із найкраще досліджених і важливих каротиноїдів, є попередником вітаміну А. Він переважно міститься в таких продуктах, як

морква, манго, кукурудза, сочевиця, темно-зелене листя, амарант і шпинат. Бета-каротин відомий як потужний антиоксидант, який захищає печінку від токсичних впливів різних ліків і ксенобіотиків. Дослідження на щурах продемонстрували, що додавання бета-каротину в раціон запобігає підвищенню рівня амінотрансфераз у сироватці крові, викликаному етанолом, та пригнічує зниження рівня антиоксиданту GSH у печінці. Крім того, дослідження *in vitro* з гепатоцитами щурів, яких годували етанолом, показали, що бета-каротин покращує життєздатність клітин, підвищує активність каталази та рівень глутатіону. Механістичні дослідження також показали, що бета-каротин знижує окислювальний стрес, посилює антиоксидантну активність та зменшує експресію CYP2E1 і апоптоз. [18]

Цей каротиноїд виступає як антиоксидант, здатний запобігати ушкодженню ДНК, викликаному радикалами. Він також грає роль у процесах клітинної диференціації та апоптозу, а також є важливим імуностимулятором, який підтримує виробництво лімфоцитів і моноцитів.

Бета-каротин має молекулярну масу і формулу 536,888 г/моль і C₄₀H₅₆S відповідно. Його полікарбонатна структура забезпечує високу гідрофобність, що робить його ліпофільним з'єднанням. Він має високу температуру плавлення, що досягає 183°C, що робить його стійким до термічної обробки, але не для смаження. Цей каротин має високу схильність до окислення через наявність кисню, тому його слід зберігати в охолоджених умовах, бажано в скляній упаковці. Бета-каротин надає їжі оранжево-жовтуватий відтінок, а його екстракція та розчинення в метанолі або бензолі призводить до фіолетового забарвлення.

Споживання продуктів, багатих на бета-каротин, які підвищують його концентрацію в плазмі, а також містять інші фітохімічні сполуки з протипухлинними властивостями, можуть діяти в синергії та знижувати ризик розвитку раку. Ще одним важливим аспектом є те, що бета-каротин у низьких дозах (6–15 мг на день) має антиоксидантні, протизапальні та попередницькі властивості щодо вітаміну А, тоді як у високих дозах (>40 мг на день) він може

проявляти прооксидантну активність, збільшуючи експресію ферментів фази I біотрансформації, які активують канцерогенні агенти, що накопичуються в тканинах.

Отже, коли людина перебуває у здоровому стані, споживання низьких доз бета-каротину (з їжею) може зменшити ризик розвитку раку, тоді як вживання високих доз (у вигляді добавок) може збільшити ризик раку у схильних до цього осіб. Визначення адекватної дози є індивідуальним і залежить від наявності вітаміну А в організмі. Проте загальна рекомендація для здорових дорослих становить від 6 до 15 мг на день. [19]

1.3 Мікророзмноження рослин виду *Daucus carota*

Мікророзмноження — це метод клонування рослин у контрольованих умовах у закритих посудинах, де підтримується стерильне середовище. Рослини культивуються на спеціальних живильних середовищах із додаванням регуляторів росту, і цей процес називається *in vitro*, що означає «у склі». На відміну від цього, вирощування рослин у природних умовах у ґрунті називають *in vivo*. Оскільки рослини, вирощені *in vitro*, мають менші розміри, ніж ті, що розмножуються *in vivo*, такий процес отримав назву «мікророзмноження». [20]

Метод мікророзмноження використовує тотипотентність рослинних клітин для отримання нових рослин з протопластів, недиференційованих клітинних мас (калюсу), невеликих фрагментів тканин або окремих органів. Після підтвердження ефективності цього методу, його широко застосовують у сільському господарстві, лісництві та садівництві для масового виробництва високоякісного, вільного від хвороб посадкового матеріалу. Мікророзмноження також є найефективнішим способом видалення вірусів із важливих культур, збереження соматичних гібридів і гібридів, створених традиційними методами, розробки трансгенних рослин із бажаними властивостями та накопичення генів. Метод має широке промислове застосування. [21] [22]

Мікророзмноження можна використовувати як безпечний метод для отримання вторинних метаболітів із цінних для медицини рослин *in vitro* з

подальшим їх масштабуванням у біореакторах. Цей підхід виявився особливо ефективним у збереженні *ex situ* рідкісних та зникаючих видів рослин. Зокрема, для рослин, у яких відсутнє доступне насіння, мікророзмноження надає альтернативний спосіб або для відновлення стрімко зменшуваних популяцій, або для створення додаткових джерел важливих для медицини вторинних метаболітів. [23]

Залежно від характеру морфогенетичних процесів у культурі тканин розрізняють різні типи мікроклонального розмноження, які базуються на особливостях отримання рослин. Відповідно, отримані рослини-регенеранти можуть відрізнятися.

Перший тип рослин формується в результаті активації меристем (верхівка стебла, пазушні та сплячі бруньки), тобто через прямий морфогенез. Ці рослини, регенеровані з меристем, генетично ідентичні вихідним рослинам, оскільки апекси у культурі зазвичай зберігають генетичну стабільність.

Другий тип рослин виникає через індукцію нових бруньок або ембріодів. Рослини, отримані зі спеціалізованих або калюсних клітин, можуть мати генетичну мінливість і часто відрізняються від вихідних форм. Цей метод застосовується тільки для рослин, у яких калюс генетично стабільний або коли варіабельність серед регенерантів не перевищує природний рівень. [24]

Мікроклональне розмноження за своєю суттю схоже на вегетативне розмноження, але відбувається в умовах *in vitro*, де з клітин ізольованих тканин можна отримати велику кількість нових рослин. Основною вимогою мікроклонального розмноження є генетична ідентичність отриманих рослин материнській рослині. Раніше цей метод використовували для швидкого клонування рослин, що розмножуються вегетативно, а також для оздоровлення від вірусів. Однак експериментальні дані показали, що його значення зросло для клонової селекції рослин, таких як мутагенез і розхимерювання, кріозбереження важливого матеріалу та вивчення генетики рослин, що розмножуються насінням.[25]

Клональне мікророзмноження є ключовим елементом у розмноженні, розсадництві та садівництві. Ця технологія дозволила промисловості фундука в Орегоні відмовитися від щеплення та перейти на мікророзмножені дерева, що ростуть на власному корінні. У каліфорнійській промисловості волоського горіха вперше стали доступними клонові підщепи завдяки мікророзмноженню, оскільки живці волоського горіха погано вкорінюються та не є комерційно рентабельними. Усі процеси клонального мікророзмноження, незалежно від їхнього призначення — комерційного, дослідницького чи особистого, проходять однакові основні етапи. Оскільки важливим є розмноження пазушних пагонів, вихідні експланти мають включати вузли. Пазушні бруньки стимулюють ріст, і за потреби їх вирізають, укорінюють та акліматизують. [26]

Потрібно бути обережним, щоб уникнути утворення додаткових пагонів і стимулювати лише пазушні пагони для збереження клонової вірності. Додаткові пагони можуть схилитися до соматоклональних варіацій, що призводить до відхилень у типі отриманих рослин. Клони, які легко розмножуються, вкорінюються та успішно акліматизуються, є найбільш підходящими для задоволення попиту клієнтів і економічно вигідними у виробництві. Генотипи, що викликають більше труднощів під час вирощування, розмноження, вкорінення або акліматизації, коштують дорожче як у виробництві, так і для покупців. [27]

Мікророзмноження дає можливість вирощувати високоякісні рослини, бульби та цибулини, вільні від хвороб. Протягом останніх 30 років виникла ціла галузь, заснована на *in vitro* розмноженні рослин. Щорічно мільйони рослин, таких як банан, подорожник, цитрусові, ананас, полуниця, а також культури на зразок цукрової тростини, картоплі, батату та маніоку, розмножуються цим методом. Серед декоративних культур мікророзмножують антуріум, герберу, орхідеї (цимбідіум, дендробіум, онцидіум), троянди та інші. Рослини, вирощені в Азії через дешеву робочу силу, постачаються до Європи та США у вигляді мікророслин (орхідей), мікробульб (картопля) і мікроцибулин (нарциси, тюльпани). Технології мікророзмноження варіюються від простих пляшок до

високотехнологічних біореакторів. Великі лабораторії часто готують кілька літрів середовища масово, використовуючи механічні пристрої, такі як перистальтичні насоси, для точного розподілу середовища в тисячі контейнерів. [28]

Мікроклональне розмноження моркви посівної може проводитися як за допомогою насіння, так і за допомогою експлантів, які включають частини стебла, листя або кореневу тканину. Основні особливості цього процесу включають наступне: У порівнянні з іншими культурами тканин, морква посівна демонструє невисоку ефективність відтворення в лабораторних умовах. Це може бути зумовлено складністю формування морквяних калусів та низькою часткою клітин, здатних до регенерації, складнощі з вибором експлантів. Вибір оптимального експланту для мікроклонального розмноження може бути непростим, оскільки навіть незначні пошкодження можуть суттєво знизити ймовірність успішного розмноження. Морква посівна може швидко реагувати на стресові фактори, такі як зміни навколишнього середовища, дезінфекційні процедури або регенерацію після культивування тканин. Це, в свою чергу, може знизити ефективність відтворення. Різні сорти моркви можуть демонструвати різний рівень чутливості до ініціації та регенерації калусів. Це означає, що для кожного сорту можуть знадобитися специфічні умови для оптимізації процесу культури тканин, щоб досягти успішного мікроклонального розмноження. [29]

Метод культивування тканин, який використовується для клонального розмноження, спочатку передбачає стерилізацію різних частин рослинної тканини, відомих як експланти. Після цього застосовуються асептичні штучні середовища для вирощування, що дозволяє отримати нову тканину, рослину або її частини в контрольованих і стерильних умовах. Цю технологію можна використовувати для розробки нових сортів, створення генетичного різноманіття та захисту цінних рослин, які важко розмножити традиційним способом. Найчастіше для стимулювання росту і морфогенезу *in vitro* використовують регулятори росту, такі як ауксини і цитокініни, які можуть бути як природного, так і синтетичного походження. Завдяки варіюванню концентрацій ауксину та

цитокиніну в середовищі та використанню різних типів рослинних тканин можна досягти різних результатів у процесі регенерації. [30] [31]

Одним із найпоширеніших синтетичних ауксинів є 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-D). У дослідженнях *in vitro* багато застосувань має активоване вугілля. Воно зазвичай додається до середовища в кількості 0,2 і 3,0% від загальної концентрації. Це потім має багато впливів, наприклад, на ріст мікробів, пухлин і культур протопластів, укорінення, пагоноутворення і пролонгацію рослин. Вугілля також має здатність інгібувати речовини, запобігати росту патогених мікроорганізмів в середовищах. [32]

Методи культивування рослинної тканини мають особливе значення, оскільки їх можна використовувати для масового розмноження видів, які під загрозою. Рослини, вирощені таким чином, можуть бути повторно інтродуковані як у їх природні ареали, так і в нові місця. Серед інших переваг цих методів слід зазначити зменшення простору, необхідного для утримання великої кількості експлантів, а також можливість зберігати колекції видів, що знаходяться під загрозою зникнення, в умовах *in vitro* одночасно з їх розмноженням. [35]

Метод мікроклонального розмноження відіграє ключову роль у прискореному клонуванні плодових, ягідних та декоративних деревних рослин. Позитивні результати були досягнуті при використанні цього методу для вегетативно розмножуваних видів. У випадку деяких декоративних рослин метод клонального мікророзмноження *in vitro* є ефективним з комерційної точки зору. Для інших рослин він застосовується для отримання елітного та суперелітного матеріалу. Практично будь-який вид рослини може бути розмножений в умовах *in vitro*. Проте основною проблемою широкого впровадження методу мікроклонального розмноження для деяких видів залишається висока вартість отриманих клонів. [37]

Метод мікроклонального розмноження має велике значення для оздоровлення вихідного рослинного матеріалу. Відомо, що боротьба з вірусними захворюваннями багатьох сільськогосподарських культур є однією з найактуальніших проблем у світі, адже з виробництва можуть зникнути цінні

сорти рослин. Це особливо стосується багаторічних культур, які розмножуються вегетативно. У 1952 році французькі дослідники Морель і Мартен вперше отримали садивний матеріал жоржини, вільний від вірусних інфекцій, використовуючи метод меристемних культур. На відміну від грибкових та бактеріальних хвороб, які можна усунути хіміотерапією, меристемні культури є надійним методом для видалення вірусів у вегетативно розмножуваних рослин. Цей метод базується на тому, що у інфікованих рослин меристеми розміром від 0,1 до 0,3 мм вважаються зонами, вільними від вірусів. Окрім методу культури меристем, отримати здоровий садивний матеріал також можна шляхом регенерації рослин з калюсних, суспензійних культур і культур протопластів, в яких віруси, зазвичай, не розмножуються. Проте в такому випадку генетичну стабільність отриманого матеріалу забезпечити не можна. Однією з ключових умов для отримання безвірусного садивного матеріалу є наявність надійних методів тестування вірусів. Раніше для цього використовували щеплення, електронно-мікроскопічні дослідження листків і соку чутливих до вірусів рослин-хазяїв, а також різноманітні тести.

Згодом були розроблені більш точні методи, такі як ELISA (ферментизований імуносорбентний аналіз) та імуно електронна мікроскопія. Однак найбільш чутливими методами, які дозволяють діагностувати не лише вірусні, а й віроїдні патогени, є методи моноклональних антитіл та ДНК-зондів. Обговорюючи практичну значимість методу мікроклонального розмноження, слід відзначити його значні можливості для прискорення селекційного процесу, довгострокового підтримання і зберігання цінних генотипів, а також розширення потенціалу мутагенезу, диференціації тканин і відбору цінних мутантних форм в умовах *in vitro*. Використання мутаційних змін є розповсюдженим і визнаним методом селекції для рослин, що розмножуються вегетативно. Тому застосування мікроклонального розмноження методом прямого органогенезу з цілих експлантів може стати більш надійним способом досягнення бажаних генетичних змін у рослин, порівняно з традиційними методами. [34]

Химерність, що виникає після обробки насіння та бруньок мутагенами, є суттєвою перешкодою для використання і виявлення мутагенних змін у рослинах. У таких випадках клональне мікророзмноження розглядається як найбільш надійний спосіб розхимерювання соматичних тканин, а також як засіб переходу між різними формами химерності або зберігання химерності залежно від генетичних ознак.

Селекціонери часто стикаються з проблемою підтримки та швидкого розмноження цінних генотипів. Якщо це пов'язано з певними біологічними та генетичними перешкодами, використання таких генотипів у селекції стає практично неможливим.

У цьому контексті мікроклональне розмноження використовується для вирішення ряду селекційних завдань. У багатьох рослинних видах (наприклад, капусти, моркві, буряках, помідорах тощо) комерційне значення мають лише гібриди першого покоління (F1). Виробництво гібридного насіння, а також підтримка вихідних батьківських форм, які представлені лініями самозапилення (часто самонесумісними), є дуже трудомістким процесом. Використання методу мікроклонального розмноження допомагає вирішити цю проблему. Отримання гібридів F1 у сільському господарстві часто ґрунтується на цитоплазматичній чоловічій стерильності (ЦЧС). Підтримка генотипів з цією ознакою пов'язана з тривалим процесом зворотних схрещувань (беккросування). У деяких випадках потрібно мати лінії-відновники ЦЧС, що також вимагає серії схрещувань і послідовного добору чоловічостерильних форм серед гібридних комбінацій. Якщо генетичних маркерів немає, добір генотипів з ЦЧС проводять на рослинах під час їх цвітіння. Для деяких видів цибулі, цукрових буряків та стерильних форм можна використовувати методи мікроклонального розмноження *in vitro*. Цей метод рекомендується для виробництва, наприклад, гібридного насіння томатів. Якщо стерильність відсутня, виробництво гібридного насіння таких рослин стає дорожчим. [37]

Розмноження гібридних рослин через отримання мікроклонів в умовах *in vitro* є більш економічно вигідним у порівнянні з традиційним ручним

запиленням. Очікується, що в деяких овочевих культурах, які вирощуються з розсади, ціна рослин, отриманих методом клонального мікророзмноження, не перевищуватиме вартості звичайної розсади. Якщо ж ситуація інша, виникає потреба в розробці нових машин або модернізації наявних видів рослин, для яких вирощування з розсади не є звичним, а також у вдосконаленні й автоматизації методів мікроклонального розмноження, які дозволяють отримувати доступну розсаду в умовах *in vitro*. Загалом, економічний аналіз підтверджує переваги цього методу над традиційними способами виробництва гібридного насіння. [33]

Для деяких рослин традиційні методи селекції є складними через тривалість їх життєвого циклу, високий рівень гетерозиготності та труднощі статевого розмноження. У цьому контексті можливість клонування таких генотипів *in vitro* значно спрощує їх селекцію та розмноження. Яскравим прикладом є мікроклональне розмноження цінних генотипів пальм у процесі селекції на підвищений вміст олії.

Культури тканин можна використовувати для клонального розмноження дводомних видів, зокрема для відібраних генотипів, які виступають батьківськими формами для отримання великої кількості насіння. Мікророзмноження деяких гетерозисних генотипів, які можуть слугувати вихідними батьківськими формами у гетерозисній селекції, стає можливим для видів, що традиційними методами розмножуються дуже повільно. Типові приклади включають цибулю та диплоїдні і тетраплоїдні цукрові буряки, для яких розроблені відповідні методи, що входять до складу селекційних програм. [38]

Мутантні рослини, вирощені *in vitro*, також можуть бути клонировані в культурі тканин. Альбіноси та біохімічні мутанти, які підходять для клітинної селекції, соматичної гібридизації, а також для перенесення генів і хромосом, можуть підтримуватися *in vitro*, незважаючи на те, що в звичайних умовах вони не нежиттєздатні. [39]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження стали наступні сорти моркви:

Морква «Сластьона». Середньо-пізній сорт моркви (період від сходів до технічної стиглості 120-130 днів) . Коренеплоди циліндричні, тупокінцеві, оранжеві, довжиною 18-20 см, практично без серцевини, з дуже ніжною, солодкою і соковитою м'якоттю. Володіє стійкістю до хвороб, розтріскування, цвітушності. Морква Сластьона відрізняється великими розмірами, гарним складом м'якоті, а однією з переваг догляду вважається висока стійкість до ураження хворобами та атаками шкідників – навіть морквяна муха рідко атакує цей сорт. Крім того, для коренеплодів характерні гарна лежкість та відмінний товарний вигляд, який зберігається на 76-90% навіть під час зимового зберігання.

Морква «Канада F1» – популярний пізньостиглий гібрид типу Шантане, створений селекціонерами компанії Vejo Zaden з Нідерландів. Відзначається стабільною врожайністю незалежно від кліматичних умов та типу ґрунту, хоча спеціально адаптований для південних, посушливих регіонів. Період вегетації триває приблизно 135 днів, за які можна отримати врожай на рівні 7-7,5 кг з 1 кв. м. Гібрид найкраще росте на слабокислих суглинистих або піщаних ґрунтах, проте також здатен адаптуватися до важких чорноземів. Перед висаджуванням ґрунт потрібно ретельно розпушити та зволожити. Важливо дотримуватися сівозміни, висаджуючи моркву після томатів або картоплі. Проріджування є обов'язковим етапом для отримання високого врожаю. Хоча цей гібрид вирізняється загальною витривалістю та невибагливістю до умов вирощування і агротехніки, він стійкий до таких захворювань, як церкоспороз та чорна ніжка.

Плоди мають конічну форму з трохи загостреним кінцем і рівною поверхнею. Вони досягають довжини 16-18 см і діаметра 4-6 см, а їхня вага коливається від 120 до 400 г. Забарвлення рівномірне, яскраво-оранжевого кольору. Серцевина майже не відрізняється від м'якоті. Вміст каротину становить приблизно 22 мг на 100 мг, а концентрація цукру сягає 8%.

Морква «Флакке» — пізній сорт столової моркви, з вегетаційним періодом від сходів до технічної стиглості 130-160 днів. Коренеплоди мають конічну форму, насичено-оранжевий колір, досягають довжини до 25 см, вирівняні, масою від 150 до 170 г. М'якоть оранжево-червоного кольору, щільна, хрустка, ніжна, з оранжевою серцевиною, не схильна до накопичення нітратів. Цей сорт містить багато каротину, вітамінів групи В, В2, аскорбінову кислоту та інші корисні речовини. Морква Флакке підходить як для споживання в свіжому вигляді, так і для переробки та тривалого зберігання, при цьому коренеплоди довго зберігають свої товарні якості. Вирощується у відкритому ґрунті, чутлива до рівня вологи та родючості ґрунту.

2.2 Стерилізація посівного матеріалу

Поверхні рослинних органів зазвичай контаміновані спорами різних мікроорганізмів і грибів, а також можуть містити ендогенну та епіфітну мікрофлору, зокрема віруси. Однак внутрішні тканини рослин вважаються стерильними, хоча іноді в них можуть бути присутні непатогенні бактерії, які не завжди піддаються виявленню.

Ключовою умовою для отримання калюсних і суспензійних культур є процес стерилізації рослинних матеріалів. Він передбачає усунення екзогенної мікрофлори без завдання шкоди внутрішнім тканинам. Вибір стерилізуючих засобів, їх концентрація і тривалість впливу визначаються щільністю та чутливістю стерилізованих тканин.

Правильний вибір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона ефективно знищувала патогенну мікрофлору, завдаючи при цьому мінімальних пошкоджень рослинним тканинам. Виклики виникають при стерилізації об'єктів, що мають тріщини, заглиблення або пошкодження, таких як насіння, плоди чи стебла листяних і хвойних дерев. У таких випадках не тільки поверхнева стерилізація, але й проникнення стерилізуючого розчину всередину тканин може негативно вплинути на їхній ріст в умовах *in vitro*. Отже, важливо, щоб

стерилізуючий розчин легко вимивався дистильованою водою або розкладався, щоб уникнути токсичного впливу на тканину.

Зазвичай користуються відомими методами стерилізації, проте для кожного конкретного об'єкта може бути розроблена індивідуальна методика. Один і той самий орган у різних видів рослин потребує різних умов стерилізації. При правильному виборі стерилізуючого засобу рівень інфікування тканин не перевищує 1-3%. Перед початком стерилізації рослинні тканини попередньо очищають.

Для проведення стерилізації було використано здорові, непошкоджені коренеплоди моркви, які зберігалися при температурі +4°C. Коренеплоди ретельно промивали у мильному розчині за допомогою щітки, після чого промивали проточною водою та очищали дистильованою водою. Далі з коренеплодів знімали шкірку.

Наступні етапи роботи виконувалися в умовах ламінарного боксу. Коренеплід фіксували на стерильному ланцеті та занурювали у фарфорову склянку, що містила 96% етанол, після чого здійснювали обпалювання в полум'ї спиртівки.

За допомогою стерильного свердла з коренеплоду вилучали циліндричні зразки тканин, які поміщали в чашки Петрі. Обпалені краї зразків відсікали, а тканини розділяли на диски товщиною 1,5-1,2 мм.

Ізольовані тканини переносили до пеніцилінових флаконів, що містили калюсогенне живильне середовище.

2.3 Калюсогенез моркви

Ізольовані тканинні диски були перенесені на калюсогенне живильне середовище зі складом:

Макросолі МС — 100 мл

Мікросолі МС — 1 мл

Fe-хелат — 5 мл

Вітаміни МС — 1 мл

Гідролізат казеїну — 500 мг

Мезо-інозит — 100 мг

Кінетин — 2 мг

ІОК (індол-3-оцтова кислота) — 2 мг

Сахароза — 20 г

Агар — 8 г

Вода — 880 мл

Живильне середовище було приготоване з рН у межах 5,6-5,8 та стерилізоване шляхом автоклавування. Після цього пеніцилінові флакони з ізольованими тканинами помістили в термостат для інкубації в умовах абсолютної темряви при температурі +25-26 °С з метою ініціації утворення калюсів. [39]

Через 3-4 доби було здійснено перевірку чистоти культури для контролю за відсутністю контамінації.

Базове середовище для калюсогенезу було модифіковано шляхом зміни концентрацій кінетину та індол-3-оцтової кислоти (ІОК) з метою експериментального визначення оптимального співвідношення фітогормонів для максимальної індукції синтезу бета-каротину в калусній культурі. Було підготовлено три варіанти середовища з різними концентраціями фітогормонів:

1. Середовище з 2 мг кінетину та 2 мг ІОК.
2. Середовище з 0,5 мг кінетину та 2 мг ІОК.
3. Середовище з 2 мг кінетину та 0,5 мг ІОК.

Ці варіанти використовувалися для визначення найбільш ефективної комбінації фітогормонів, яка сприяє підвищенню продукції бета-каротину в калусній культурі.

2.4 Екстракція бета-каротину

Для визначення вмісту каротину в калусній культурі моркви використовується наступний метод. Спочатку готують стандартний розчин біхромату калію: 36 мг біхромату калію розчиняють у воді у мірній колбі об'ємом

100 см³, доводячи об'єм до позначки. Один см³ цього розчину відповідає 2.08 мкг β-каротину за його забарвленням. Після цього будується калібрувальний графік. Для цього готують серію стандартних забарвлених розчинів. У ряд пробірок додають 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 та 9.0 см³ свіжоприготовленого робочого розчину біхромату калію і доводять об'єм кожного розчину до 10 см³ за допомогою 96% етилового спирту. Отримані розчини відповідають масовій концентрації каротину 0.23; 0.47; 0.70; 0.94; 1.17; 1.41; 1.65; 1.88; 2.11 мкг/см³.

Далі вимірюють оптичну густину кожного розчину за допомогою спектрофотометра або фотоколориметра при використанні кювет з відстанню між робочими гранями 10 мм і довжиною хвилі 450 нм.

На основі отриманих даних будується калібрувальний графік залежності оптичної густини розчину від масової концентрації каротину (мкг/см³), який виражається у вигляді функції $D = f(C)$.

Наступним етапом є екстракція каротину. Для цього рідкі продукти, такі як соки, концентрати або сиропи, у кількості від 10 до 20 г поміщають у градуйовані пробірки. Додають 20 см³ ацетону, після чого обережно струшують пробірки, щоб уникнути утворення емульсії. Потім додають 15 см³ петролейного ефіру та знову обережно струшують, дотримуючись обережності, щоб не допустити утворення емульсійних структур. Після цього визначають вміст каротину. Залежно від інтенсивності забарвлення отриманого елюату, його об'єм регулюють розчинником так, щоб в 1 см³ елюату містилося від 0,4 до 3,0 мкг каротину (при цьому 3,0 мкг/см³ каротину відповідає оптичній густині 0,750). Фіксують остаточний об'єм усього каротиновмісного елюату.

Далі проводять фотоелектроколориметричне або спектрофотометричне вимірювання оптичної густини елюату порівняно з чистим розчинником при довжині хвилі 450 нм, використовуючи кювети з відстанню між робочими гранями 10 мм. Отримані дані обробляють і вміст каротину обчислюють за двома методами за допомогою калібрувального графіка.

Масову частку α-каротину та транс-β-каротину (X1) у мкг/г продукту визначають за формулою:

$$X1 = C \cdot V / m,$$

де: C — масова концентрація каротину, визначена за калібрувальним графіком, $\text{мкг}/\text{см}^3$;

V — об'єм каротиновмісного елюату, см^3 ;

m — маса наважки продукту, г.

Масову частку каротину ($X2$) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X2 = C \cdot V / 1000 \cdot m.$$

Результати одиничних вимірювань обчислюють до четвертого десяткового знака. За остаточний результат випробувань береться середнє арифметичне значення двох паралельних вимірювань, також округлених до четвертого десяткового знака.

Наступним етапом є перевірка збіжності отриманих результатів. Розбіжність між результатами двох паралельних визначень, проведених за однаковим методом на одній і тій самій аналітичній пробі, у межах однієї лабораторії, тим самим виконавцем і за допомогою ідентичного обладнання, не повинна перевищувати (при ймовірності $P = 0,95$) 5 % від середнього значення двох результатів. Такий підхід забезпечує високу точність вимірювань і підтверджує відтворюваність результатів аналізу. [40]

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Калюсогенез моркви і особливості росту калюсу

Простерилізовані тканині диски моркви були висаджені на калюсогене середовище з різними концентраціями фітогормонів. У рамках експерименту було висаджено 27 пробірок із тканинними дисками, які представляли три різні сорти моркви. Кожен сорт культивували на трьох різних варіантах калюсогенного середовища, при цьому для кожного середовища використовували три повтори, що забезпечувало надійність даних та мінімізувало ризик контамінації. Пробірки були поміщені в термостат для інкубації та стимуляції процесу калюсогенезу.

Першу перевірку на контамінацію було проведено через 4 доби після висадження, а через 8 діб почалося утворення калюсної маси. Розвиток калюсу оцінювали за такими ключовими параметрами, як колір, текстура та щільність. Ці характеристики слугують індикаторами активності метаболічних процесів у тканинах та ступеня диференціації клітин.

Сорт «Сластена»: Калюсна тканина у цього сорту почала формуватися швидше за інші, з появою рихлого, світло-зеленого калюсу вже на восьму добу. Його структура була ніжною, з пухкою текстурою, що вказує на активний ріст тканин. Щільність калюсу залишалася помірною, що є характерним для менш щільних тканин коренеплоду «Сластена», який не має вираженої серцевини. На основі отриманих результатів можна припустити, що активність метаболічних процесів в цьому сорті є високою, що сприяє швидкому росту калюсної маси (Рис 3.1).



Рис 3.1. Калюсна тканинна сорту «Сластена» на 8 добу

Сорт «Флаккe»: Формування калюсу відзначалося трохи повільнішим порівняно з «Сластеною». Калюс був щільнішим і мав оранжевий відтінок, що свідчить про велику кількість каротиноїдних сполук у тканинах цього сорту. Текстура калюсу була гладкою, з менш вираженою пухкістю, проте він мав високий рівень структурованості та стійкості. Калюсна тканина «Флаккe» відрізнялася повільнішим, але більш стабільним ростом, що пов'язано з щільною і хрусткою структурою коренеплодів цього сорту (Рис 3.2).



Рис. 3.2. Калюсна тканина сорту «Флакке» на 8 добу

Сорт «Канада F1»: Калюс у цього гібриду продемонстрував стабільний і рівномірний ріст, із щільною текстурою і рівномірним світло-зеленим кольором. Калюсна маса мала помірну щільність і рівномірну текстуру, що свідчить про активні процеси метаболізму. Враховуючи адаптивні властивості гібриду «Канада F1», його калюс виявився досить стійким до умов культивування, забезпечуючи рівномірний ріст і відсутність структурних порушень (Рис 3.3).



Рис 3.3. Калюсна тканина сорту «Канада F1» на 8 добу

На шістнадцяту добу експерименту було проведено повторну оцінку розвитку калюсних тканин, сформованих з ізолюваних тканин моркви сортів «Сластена», «Флакке» та гібриду «Канада F1». Калюсні тканини продовжували рости у трьох різних варіантах середовищ з різним співвідношенням кінетину та індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Оцінка була проведена за наступними параметрами: колір, текстура, щільність і загальна динаміка росту.

Сорт «Сластена»: На 16-ту добу калюс сорту «Сластена» продовжував активно розвиватися. Спостерігалось значне збільшення об'єму калюсу, при цьому його структура залишалася рихлою, з яскраво вираженою пухкістю. Колір калюсу поступово змінився на світло-жовтий, що свідчить про накопичення первинних метаболітів, включаючи каротиноїди. Текстура залишалася ніжною, проте з тенденцією до ущільнення у центральних ділянках. Така морфологія свідчить про продовження активних метаболічних процесів та можливе наближення до оптимальних умов для синтезу вторинних метаболітів (Рис. 3.4).



Рис. 3.4. Калюсна тканинна сорту «Сластена» на 16 добу

Сорт «Флакке»: У сорту «Флакке» на 16-ту добу калюс був більш щільним, порівняно з початковим етапом. Він набирив масу рівномірно, утворюючи гладкі, щільно сформовані калюсні тканини з характерним оранжевим відтінком. Текстура стала ще більш структурованою, вказуючи на стабільний ріст і метаболічну активність. Оранжевий відтінок калюсу вказує на високий вміст каротиноїдів, що підтверджує можливість активного накопичення бета-каротину в цьому сорті. Калюс цього сорту був найстійкішим до умов культивування і демонстрував стабільну щільність (Рис. 3.5).



Рис. 3.5. Калюсна тканинна сорту «Флакке» на 16 добу

Сорт «Канада F1»: Калюс гібриду «Канада F1» також продемонстрував значний приріст маси на 16-ту добу. Його колір залишався світло-зеленим, однак структура стала щільнішою, ніж на початковому етапі. Калюс мав однорідну гладку текстуру і демонстрував високу стійкість до зовнішніх умов. У порівнянні з іншими сортами, «Канада F1» зберігав рівномірність у рості, а калюс відзначався однорідністю та відсутністю ознак деградації чи некрозу. Це вказує на стабільний метаболізм і здатність гібриду адаптуватися до умов вирощування *in vitro* (Рис. 3.6).



Рис. 3.6. Калюсна тканинна сорту «Канада F1» на 16 добу

На шістнадцяту добу калюс усіх трьох сортів демонстрував активний ріст та відсутність ознак деградації або некротичних змін. Калюс сорту «Сластена» мав найбільш пухку структуру, характерну для активного метаболізму, тоді як калюс «Флакке» відзначався високою щільністю і вираженим оранжевим кольором, що свідчить про значну кількість каротиноїдів. Калюс «Канада F1» демонстрував збалансоване поєднання щільності та рівномірності, зберігаючи стабільний ріст.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що калюс сорту «Флакке» на шістнадцяту добу демонструє найвищу щільність і насичений оранжевий колір, що є показником накопичення бета-каротину. Сорт «Сластена» показав швидке зростання калюсної маси, проте його структура залишалася пухкою. Гібрид «Канада F1» відзначився стабільним і рівномірним розвитком, з високою однорідністю тканин.

3.2 Вплив складу живильного середовища на ріст калюсу

Розвиток калюсу також оцінювали з урахуванням складу живильного середовища. Калюсні утворення, які зростали при різних співвідношеннях кінетину та індол-3-оцтової кислоти (ІОК), демонстрували різні характеристики за вище означеними параметрами а саме:

Середовище з 2 мг кінетину та 2 мг ІОК продемонструвало швидший початок утворення калюсу порівняно з іншими варіантами. Через 8 діб спостерігали активний ріст калюсу у всіх зразках. Калюс мав рівномірно жовто-зелене забарвлення, однорідну, м'яку текстуру та високий рівень метаболічної активності. Його структура була пухкою, що вказує на інтенсивний процес клітинного поділу.

Середовище з 0,5 мг кінетину та 2 мг ІОК характеризувалося повільнішим темпом росту калюсу. Утворення калюсу почалося лише на 10-ту добу, причому калюс був щільнішим і мав помітні ділянки темнішого забарвлення. Ріст був менш активним, а структура калюсу виглядала менш пухкою, що вказує на повільніший метаболічний процес.

Середовище з 2 мг кінетину та 0,5 мг ІОК також виявило менш інтенсивний ріст порівняно з середовищем 1. Калюс почав формуватися на 9-ту добу, але мав більш щільну консистенцію і трохи жовтувате забарвлення. Процес клітинного поділу був менш активним, що відобразилося на помірному рості.

На основі отриманих результатів, середовище з 2 мг кінетину та 2 мг ІОК (Середовище 1) (Рис 3.7) забезпечило найкращі умови для росту калюсу моркви. Калюс характеризувався активними метаболічними процесами, однорідною пухкою структурою та інтенсивним зростанням. Середовища з меншими концентраціями фітогормонів призвели до сповільненого росту та менш інтенсивного калюсогенезу, що вказує на необхідність певної мінімальної концентрації обох гормонів для забезпечення оптимального росту.



Рис 3.7. Зразок калюсної тканини якій був отриманий на найоптимальнішому середовищі 1

3.3 Виділення каротиноїдів з калюсної культури

Для визначення кількості каротину з калюсних культур моркви було використано метод екстрагування каротиноїдів, який передбачав попереднє приготування стандартного розчину біхромату калію та побудову калібрувального графіка. Процес виділення каротину був проведений відповідно до наступних етапів:

Калюсна культура зразків моркви була подрібнена та екстрагована 20 см³ ацетону. До екстракту додали 15 см³ петролейного ефіру, після чого екстракт ретельно перемішали для розділення фаз і забезпечення максимального виходу каротину. Оптичну густину елюату вимірювали на фотоколориметрі за довжини хвилі 450 нм. Отримані дані опрацьовані з використанням калібрувального графіка для визначення масової концентрації каротиноїдів у кожному зразку. Результати: Найвищу концентрацію каротиноїдів було зафіксовано у калюсі моркви сорту «Канада F1», який вирощувався на середовищі з 2 мг кінетину та 2 мг ІОК. За результатами спектрофотометричного аналізу, середня кількість каротину склала 2.5 мкг/см³ що найбільше у порівнянні з іншими зразками.

Калюс сорту «Флакке» продемонстрував дещо нижчі результати, з концентрацією каротиноїдів близько 2.1 мкг/см³, що вивело його на друге місце за вмістом каротину серед досліджуваних сортів.

Калюс сорту «Сластена» показав найнижчу кількість каротиноїдів — 1.7 мкг/см³. (Таблиця 3.1)

Висока концентрація каротину у калюсі сорту «Канада F1» підтверджує генетичну схильність цього сорту до накопичення β-каротину, що було прогнозовано на основі його первинних характеристик (вміст каротину в коренеплодах до 22 мг на 100 г). Середовище з рівними концентраціями кінетину та ІОК виявилось найбільш сприятливим для розвитку калюсної культури та синтезу каротиноїдів. Сорт «Флакке» також виявив значну здатність до накопичення каротиноїдів, хоч і поступався «Канада F1» за інтенсивністю метаболічних процесів. Ймовірно, що деякі морфологічні особливості калюсу «Флакке» вплинули на дещо нижчий рівень каротину. Сорт «Сластена» показав найменший рівень каротиноїдів, що може бути пов'язано з відмінностями у фізіологічних особливостях та реакції на склад середовища.

Таблиця 3.1

Вміст каротиноїдів в залежності від сорту та середовища

Сорт моркви	Концентрація кінетину (мг/л)	Концентрація ІОК (мг/л)	Характеристика калюсу	Рівень каротиноїдів (мкг/см ³)
Канада F1	2	2	Оптимальний ріст, щільна текстура, яскравий колір	2,8

Продовження таблиці 3.1

Канада F1	0,5	2	Середній ріст, світлий колір	2,5
Канада F1	2	0,5	Низька щільність, слабке забарвлення	2,2
Флакке	2	2	Добрий ріст, помірна щільність, інтенсивний колір	2,2
Флакке	0,5	2	Середній ріст, менш щільна структура	2,1
Флакке	2	0,5	Низький ріст, блідий колір	2
Сластена	2	2	Помірний ріст, середня щільність	1,8
Сластена	0,5	2	Слабкий ріст, неоднорідна структура	1,6
Сластена	2	0,5	Мінімальний ріст, слабке забарвлення	1,6

ВИСНОВКИ

Оптимальне середовище для калюсогенезу: Середовище з рівними концентраціями кінетину та ІОК (2 мг/л кожного) виявилось найбільш ефективним для ініціації та розвитку калюсної культури моркви. Це середовище сприяло кращому росту калюсу, характеризується активним метаболізмом та сприятливими морфологічними показниками (колір, щільність, текстура).

Різниця між сортами моркви: Калюсна культура сорту «Канада F1» показала найвищу здатність до синтезу каротиноїдів, з концентрацією β -каротину, що значно перевищувала інші сорти. Калюс сорту «Флакке» виявився менш продуктивним за кількістю каротину, але все ж показав значну продуктивність. Сорт «Сластена» мав найнижчий рівень синтезу каротиноїдів, що свідчить про відмінності у генетичних та метаболічних характеристиках цього сорту.

Вплив фітогормонів на синтез каротиноїдів: Зміна концентрацій кінетину та ІОК суттєво впливала на ріст калюсу і синтез каротину. Оптимальним співвідношенням для максимального утворення каротину в калюсній культурі моркви виявилось рівне співвідношення цих фітогормонів (2 мг кінетину та 2 мг ІОК). Більш високі або нижчі концентрації кінетину та ІОК призводили до зменшення продуктивності калюсу.

Результати цього дослідження можуть бути використані для оптимізації умов вирощування калюсних культур моркви з метою підвищення вмісту цінних біологічних сполук, для подальшого використання в біотехнологічних та фармацевтичних цілях.

СПИСКИ ЛІТЕРАТУРИ

1. Extraction of Carrot (*Daucus carota* L.) Carotenes under Different Conditions Martina FIKSELOVÁ , Stanislav ŠILHÁR , Ján MAREČEK and Helena FRANČÁKOVÁ, Department of Storing and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic; 2 Food Research Institute, Biocenter Modra, Modra, Slovak Republic
2. K. Gupta, G. Talwar, V. Jain, K. Dhawan, S. Jain, SALAD CROPS | Root, Bulb, and Tuber Crops, Editor(s): Benjamin Caballero, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, 2003, Pages 5060-5073, ISBN 9780122270550
3. Gisandro Reis Carvalho, Karoline Costa Santos, Jaqueline Souza Guedes, Bruna Sousa Bitencourt, Meliza Lindsay Rojas, Pedro Esteves Duarte Augusto, 17 - Drying of roots and tubers, Editor(s): Seid Mahdi Jafari, Narjes Malekjani, Drying Technology in Food Processing, Woodhead Publishing, 2023, Pages 587-628, ISBN 9780128198957
4. Tzi Bun Ng, Evandro Fei Fang, Xiaolin Li, Qiu Lu, Jack Ho Wong, Hongwei Guo, Chapter 34 - Carrot (*Daucus carota*) Oils, Editor(s): Victor R. Preedy, Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Press, 2016, Pages 303-308, ISBN 9780124166417
5. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "carrot." Encyclopedia Britannica, May 4, 2023.
6. Nowick, E. A. *Daucus carota* at Historical Common Names of Great Plains Plants
7. PHILIPP W. SIMON, 33 - Carrot: *Daucus carota* L., Editor(s): G. KALLOO, B.O. BERGH, Genetic Improvement of Vegetable Crops, Pergamon, 1993, Pages 479-484, ISBN 9780080408262
8. Raees-ul H, Prasad K. Role of various coloring pigments within different varieties of carrot (*Daucus carota*). Adv Plants Agric Res. 2018;8(5):386-387.

9. Manuel Rodriguez-Concepcion, Claudia Stange, Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 539, Issue 2, 2013, Pages 110-116, ISSN 0003-9861
10. The wealth of India: raw materials. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research; 1952. pp. 20–21.
11. Deshpande SS, Deshpande US, Salunkhe DK. Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editors. *Food antioxidants—technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker; 1995. pp. 361–382.
12. Carotenoids determination of carrot cultivars Sofija Kilibarda 1* , Ilinka Pećinar 1 , Aleksandar Ž. Kostić 1 , Steva Lević 1 , Zora Dajić Stevanović 1 , Slavica Jelačić 1 and Đorđe Moravčević 1 1University of Belgrade-Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11080 Zemun-Belgrade, Serbia
13. Wang XD. Carotenoids. In: Ross CA, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2014:427-439.
14. Weber D, Grune T. The contribution of beta-carotene to vitamin A supply of humans. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(2):251-258.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York, NY: Oxford University Press; 1999.
16. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385(1):20-27.
17. Manjeshwar Shrinath Baliga, Arnadi Ramachandrayya Shivashankara, Sunitha Venkatesh, Harshith P. Bhat, Princy Louis Palatty, Ganesh Bhandari, Suresh Rao, Chapter 7 - Phytochemicals in the Prevention of Ethanol-Induced Hepatotoxicity: A Revisit, Editor(s): Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, *Dietary Interventions in Liver Disease*, Academic Press, 2019, Pages 79-89, ISBN 9780128144664
18. A.M. Martín Ortega, M.R. Segura Campos, Chapter 4 - Phytochemicals in cancer treatment, Editor(s): Maira Rubi Segura Campos, Armando Manuel Martin

Ortega, Oncological Functional Nutrition, Academic Press, 2021, Pages 125-160, ISBN 9780128198285

19. A.V. Roberts, A. Schum, CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE | Micropropagation, Editor(s): Andrew V. Roberts, Encyclopedia of Rose Science, Elsevier, 2003, Pages 57-66, ISBN 9780122276200

20. Saurabh Bhatia, Kiran Sharma, Chapter 11 - Micropropagation, Editor(s): Saurabh Bhatia, Kiran Sharma, Randhir Dahiya, Tanmoy Bera, Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, Academic Press, 2015, Pages 361-368, ISBN 9780128022214

21. Chieri Kubota, Concepts and Background of Photoautotrophic Micropropagation, Editor(s): Noriyuki Morohoshi, Atsushi Komamine, Progress in Biotechnology, Elsevier, Volume 18, 2001, Pages 325-334, ISSN 0921-0423, ISBN 9780444509581

22. Amit Chawla, Amit Kumar, Ashish Warghat, Sanatsujat Singh, Shashi Bhushan, Ram Kumar Sharma, Amita Bhattacharya, Sanjay Kumar, Chapter 18 - Approaches for conservation and improvement of Himalayan plant genetic resources, Editor(s): Narendra Tuteja, Renu Tuteja, Nishat Passricha, Shabnam K. Saifi, Advancement in Crop Improvement Techniques, Woodhead Publishing, 2020, Pages 297-317, ISBN 9780128185810

23. Carmen Valero-Aracama, Sayed M.A. Zobayed, Shyamal K. Roy, Chieri Kubota, Toyoki Kozai, Photoautotrophic Micropropagation of Rhododendron, Editor(s): Noriyuki Morohoshi, Atsushi Komamine, Progress in Biotechnology, Elsevier, Volume 18, 2001, Pages 385-390, ISSN 0921-0423, ISBN 9780444509581

24. B.S. Ahloowalia, TISSUE CULTURE | Clonal Propagation, In Vitro, Editor(s): Brian Thomas, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier, 2003, Pages 1360-1364, ISBN 9780122270505

25. Manu Pant, Azamal Husen, Chapter 20 - In vitro micrografting to induce juvenility and improvement of rooting, Editor(s): Azamal Husen, In Plant Biology, Sustainability and Climate Change, Environmental, Physiological and Chemical

Controls of Adventitious Rooting in Cuttings, Academic Press, 2022, Pages 439-453, ISBN 9780323906364

26. P.E. Read, J.E. Preece, Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture, Editor(s): Neal K. Van Alfen, Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, Academic Press, 2014, Pages 317-336, ISBN 9780080931395

27. B.S. Ahloowalia, TISSUE CULTURE | Clonal Propagation, In Vitro, Editor(s): Brian Thomas, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier, 2003, Pages 1360-1364, ISBN 9780122270505

28. In vitro propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes Ana Cristina Tavares & Lígia R. Salgueiro & Jorge M. Canhoto Received: 13 July 2008 /Accepted: 21 October 2009 / Editor: Rida A. Shibli # The Society for In Vitro Biology 2009

29. Fukuda, E. and Kurata, K. (1992). PRODUCTION OF TRANSPLANTS OF CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.) THROUGH ADVENTITIOUS SHOOTS BY USING RED LIGHT. *Acta Hortic.* 319, 303-306

30. Sharon McNabola, Sherry L. Kitto; Tissue Culture of Carrot Roots. *The American Biology Teacher* 1 March 1989; 51 (3): 165–167.

31. Santiz-Gómez JA, Abud-Archila M, Ruíz-Valdiviezo VM, Sánchez-Roque Y, Gutiérrez-Miceli FA. Totipotency of *Daucus carota* L. Somatic Cells Microencapsulated Using Spray Drying Technology. *Plants* (Basel). 2021 Nov 18;10(11):2491. doi: 10.3390/plants10112491. PMID: 34834854; PMCID: PMC8621100.

32. In vitro Carrot (*Daucus carota* L.) Regeneration: A Study on the Use of 2,4-D and Activated Charcoal Tugce OZSAN M. Gokce KANMAZ A. Naci ONUS Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, Antalya, TURKEY

33. M. Pan, J. van Staden, The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*, *South African Journal of Botany*, Volume 68, Issue 3, 2002, Pages 349-356, ISSN 0254-6299

34. Richard A Dixon, R. A. Dixon, and Robert A. Gonzales. (1995). Plant Cell Culture: A Practical Approach.

35. THE FREQUENCY OF GENETIC REARRANGEMENTS DURING CARROT (*Daucus carota*) SOMATIC EMBRYOGENESIS IS DEPENDENT ON 2,4-D LEVELS AND DIMINISHED IN ITS ABSENCE Ottó TOLDI – Kitti TÓTH-LENCSÉS – László KOVÁCS – Zsófia TÓTH –Ákos MENDEL – Adrienn KERÉKES – Gábor GYULAI Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Szent István University, Gödöllő 2103, Hungary

36. Górecka K, Kowalska U, Krzyzanowska D, Kiszczak W. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. J Appl Genet. 2010;51(2):141-7. doi: 10.1007/BF03195722. PMID: 20453301.

37. Tomohiro Kiyosue, Koujiro Takano, Hiroshi Kamada, and Hiroshi Harada. 2011. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. Canadian Journal of Botany. 68(10): 2301-2303.

38. Subodh Kumar Datta Datta, Jour Pl, and Sci Res. (2019). Need based Tissue Culture in Floriculture : A Success story.

39. М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Київ, 2014. – 247 с

40. Методичні рекомендації до лабораторних робіт з дисципліни «Технології харчових продуктів. Технологія консервування» упоряд.: Г.М. Андронович, Ю.М. Куриленко ; М-во освіти і науки України, Черкас. держ. технол. ун-т. – Черкаси: ЧДТУ, 2021. – 22 с.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ



ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ
РОСЛИН

*Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції
здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБІП України
(23 квітня 2024 р.)*



Київ-2024

Дослідження і перспективи в захисті та карантині рослин, 2024 р.
Сторінка IV – «Біологічний захист, захарна цукрові рослини»

**СТРАТЕГІЇ ЗАСТОСУВАННЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *DAUCUS
CAROTA* IN VITRO ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ БІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА
ВИРОБНИЦТВА КОРИСНИХ БІОПРОДУКТІВ**

Савицьких А. А., магістр 1-го року,

Керівник: Каломієць Ю. В., професор, доктор с.-г. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України
[e-mail: biomabca@ukr.net](mailto:biomabca@ukr.net)

Daucus carota є одним із найбільш часто використовуваних рослинних матеріалів у дослідженнях культур тварин. Незважаючи на те, що різні фактори росту та організації були широко вивчені, зрост було зроблено відносно мало при виробництві in vitro специфічних рослинних виродків у клітинних морфях. Корінь моркви характеризується високим вмістом каротиноїдних пігментів. Каротиноїди також містяться в плодах, насінні та плодах різних видів рослини. Багато жовтих, помаранчевих і червоних кольорів, які можна побачити в цих органах рослини, часто пов'язані з присутністю цих сполук. Однак їх наявність не обмежується тільки органами збирання, а включає всі частини рослини. Вони служать молекулами, що збирають світло, у фотосинтезних організмах і також відіграють роль у захисті прокаротинів від шкідливого впливу світла.

Каротиноїди також необхідні для зору. Молекули, що поглинають світло зорової системи багатьох організмів, 11-цис-ретинала, походять від В-каротину. Було показано, що каротиноїди є протипалирковими у щурів і мишей, і виявлено що це стосується і людей. Хоча В-каротин в даний час виробляється синтетичним шляхом для комерційного використання, культури клітин моркви пропонує дуже простий модельну систему для аналізу in vitro виробництва важливих рослинних метаболітів.

Окрім каротиноїдів, клітини моркви виробляють фітоалексини за управління фітоалексинами. Фітоалексини синтезуються як низькомолекулярні протипалиркові сполуки, що виробляються рослиною у відповідь на інфекцію. Повідомлялося, що тискуларин фітоалексин 6-метоксиальдегід синтезується в зараженні моркви, зараженні грибами. Це може бути потворено і в культурі клітин моркви in vitro, коли їх належним чином обробляють певними хімікатами [2, 3].

В дослідженні вивчали оптимальний спосіб культивування рослин *Daucus carota* in vitro для отримання максимальної кількості каротиноїдів.

В якості рекламного матеріалу було взято моркву 3 різних сортів найпопулярніших в сільському господарстві.



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

**X МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ
І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ**



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

24-25 квітня 2024 р.

Київ – 2024

1

УДК 582.57.085.2:577.19:612.015:163.745

**ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ *DAUCUS CAROTA* IN VITRO:
СПОСОБИ ОТРИМАННЯ ПРИРОДНИХ ІНГРЕДІЕНТІВ І ФІТОНЦІДІВ У
КОНТЕКСТІ ФІЛОСОФІЇ СТАЛОГО РОЗВИТКУ ЛЮДСТВА**

Савченко А.А., факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

**Ковалів Ю.В., д.с.-т.н., професор кафедри екобіотехнологій та біоресурсів
Національний університет біоресурсів та природокористування України**

Daucus carota широко використовується у дослідженнях культур тварин, проте, незважаючи на те, що багато аспектів його росту та організації шкелет, вироблення специфічних рослинних інгредієнтів та його значення недостатньо досліджені. Корні моркви містять велику кількість каротиноїдних пігментів, які є основними у поживних, лікарських та ароматичних властивостях рослини. Різноманітні жовті, помаранчеві та червоні пігменти, концентруючись у цих органах, часом пов'язані з наявністю цих сполук. Хоча їх формування залежить повільно з органічною обертання, каротиноїди присутні у всіх частинах рослини, виконуючи функції поглинання світла у фотосинтезних органах та захищають від надмірного впливу світла деякі прокаріоти.

Каротиноїди також важливі для зору, оскільки молекули, які поглинають світло в меридіанній системі багатьох організмів, включаючи 11 типів ретинолу, формуються з В-каротинолу. Дослідження на тварин і людини показали протипухлинну дію каротиноїдів, і цей ефект також виявлено у рослах. Хоч В-каротин виробляється синтетичним шляхом для комерційного використання, культури клітин моркви можуть стати цінною моделлю для дослідження в галузі виробництва цінних рослинних метаболітів.

Крім каротиноїдів, клітини моркви також виробляють фіталецини у відповідь нападку мікроорганізмів. Фіталецини - це шкідливі вторинні метаболіти, які рослини виробляють у відповідь на інфекції. Генетично модифіковані фіталецини, *6-methylsalicylic acid*, були виявлені у моркви зараженої грибами моркви. Цей процес може бути відтворений у культурі клітин моркви *in vitro*, за умов відокремленої обробки клітинними речовинами [2, 3].

В дослідженні вивчається оптимальний спосіб культивування рослин *Daucus carota* *in vitro* для отримання максимальної кількості каротиноїдів. В процесі рослинного матеріалу було виявлено моркву і різних сортів найпопулярніших в сільському господарстві.

Для культивування використовували алакогеномічне середовище з різними концентраціями фітормонів. Середовище інкубували, розливаючи по 125 мл кожною (50 мл/коліба) і автоклавували при 120°C протягом 15 хв. Для одержання клітинного шкелету тканини (приблизно 5 мм у діаметрі) вирізали асептично, окремо від коренів і фібрилі (позначили



УДК 58.085

Самодіюк А. А., Коломієць Ю. В.

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ *DAUCUS CAROTA IN VITRO* ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ БІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ВИРОБНИЦТВА КОРИСНИХ БІОПРОДУКТІВ

Національний університет біоресурсів та природокористування України
 вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
 e-mail: homabog1@gmail.com

Daucus carota широко використовується у дослідженнях культур тканини, хоча багато аспектів його росту та організації досліджені, використання специфічних рослинних інгредієнтів *in vitro* у клітинах моркви залишається досить обмеженим. Корені моркви відрізняються високим вмістом каротиноїдних пігментів, проте ці сполуки також присутні в пелюстках, насінні та плодах різних видів рослини. Різноманітність жовтих, помаранчевих і червоних кольорів, які можна спостерігати в різних органах рослини, часто пов'язана з присутністю каротиноїдів. Ці сполуки відіграють важливу роль як фотосинтетичні пігменти, а також в захисті прокаріотів від шкідливого впливу світла.

Каротиноїди відіграють важливу роль у зоровій системі, адже молекули, що поглинають світло в очах багатьох організмів, такі як 11-цис-ретиналь, походять від β -каротину. Дослідження показали, що каротиноїди мають протиканцерогенні властивості у щурів і мишей, і цей ефект також спостерігається у людей. Навіть за умови, що β -каротин виробляється синтетичним шляхом для комерційного використання, культури клітин моркви можна використати як корисну модельну систему для дослідження *in vitro* виробництва важливих рослинних метаболітів.

Поміж інших речовин, клітини моркви виробляють фітоалексини як реакцію на враження фітопатогенами. Фітоалексини - це низькомолекулярні антимікробні речовини, що виробляються рослиною у відповідь до інфекції. Дослідження показують, що у коренях моркви, які заражені грибками, накопичується ізокумаріновий фітоалексин, 6-метоксимеллеїн. Цей процес можна імітувати у культурі клітин моркви *in vitro*, за умови правильної обробки їх певними хімічними сполуками. [2,3]

У ході дослідження аналізувався найоптимальніший метод культивування рослини *Daucus carota in vitro* з метою отримання максимальної кількості каротиноїдів. В якості матеріалу для дослідження було використано моркву трьох різних сортів, що є найбільш поширеними в сільському господарстві.

Для культивування використовували калпосогенне середовище з різними концентраціями фітогормонів. Це середовище підігрівали, розливали по 125 мл колбах (з об'ємом 50 мл кожна) і автоклаували при температурі 120°C протягом 15 хвилин. Для