

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1998 «С». 2023.11.01. 5 ПЗ

КІРЕЙ АРТЕМ АНДРІЙОВИЧ

2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 632.937

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 КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Мікроклональне розмноження сортів лохини висококущової
Vaccinium corymbosum L.»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Біотехнології та біоінженерія»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Лісовий М.М.

(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Коломієць Ю.В.

(ПІБ)

Виконав

(підпис)

Кірей А.А.

(ПІБ студента)

КИЇВ-2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
Кваско О.Ю.
« ____ » _____ 2024 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Кірею Артему Андрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Біотехнології та біоінженерія»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікроклональне розмноження сортів лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L.»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2024 року

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: живильні середовища WPM, AN, рослини *Vaccinium corymbosum* L.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Оптимізація мікроклонального розмноження лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на середовищі WPM
2. Оптимізація мікроклонального розмноження лохини висококущової *V. corymbosum* L. на середовищі mAN
3. Вплив різних субстратів на укорінення пагонів лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro*

Дата видачі завдання “10” вересня 2023 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи
Завдання прийняв до виконання

Ю.В. Коломієць
А.А. Кірей

Реферат

Робота виконана на 62 сторінках, містить 3 розділи, 12 рисунків, 5 таблиць, 71 використаних джерел.

Метою роботи було оптимізувати основні етапи мікроклонального розмноження – стерилізація вихідних експлантів, індукція пагонів в культурі *in vitro*, укорінення пагонів, адаптація рослин-регенерантів лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. зарубіжної селекції.

Об'єктами дослідження були 5 сортів лохини висококущової: Спартан раннього терміну дозрівання; Норленд, Олімпія, Рубель, середнього терміну дозрівання; Еліот, пізнього терміну дозрівання. Підібрано оптимальні умови стерилізації поверхні експлантів залежно від їх виду та ефективності застосовуваних дезінфікуючих засобів. Максимальну кількість життєздатних стерильних регенератів одержували за допомогою суміші стерилізуючих розчинів спирту та відбілювача «Білизна» з Твіном. Ефективність мікроклонального розмноження залежно від складу поживного агаризованого середовища з органічними сполуками на макро- та мікросольовій основі WPM (Woody Plant Medium) з додаванням ростерегулятора дії цитокініну 6-БАП, диметилаліламінопурину (2iP) оцінювали за на регенераційну активність експлантів і коефіцієнт відтворення пагонів. Результати дослідів показали, що ефективність дії фітогормонів та їх концентрації залежать від властивостей генотипу кожного сорту *V. corymbosum* L. Встановлено, що ростова активність і розмноження пагонів змінювалися залежно від концентрації в живильному середовищі 2iP. Максимальні значення коефіцієнта розмноження сортів Норленд і Олімпія і висоту пагонів визначали на середовищі 0,4 мг/л 2iP. Для Еліот та Рубель здатність була найвищою з концентрацією 0,8 мг/л 2iP та для Спартан 10 мг/л 2iP.

При мікророзмноженні лохини (*V. corymbosum* L.) для стимуляції утворення коренів широко використовуються два основні методи: укорінення *in vitro* – цей метод передбачає укорінення рослинних мікропагонів

безпосередньо в лабораторних умовах, в стерильному живильному середовищі, укорінення *ex vitro* – цей метод полягає в укоріненні мікропагонів уже за межами лабораторного середовища, безпосередньо в субстратах (грунтових сумішах).

Укорінення *ex vitro* справді має кілька переваг перед укоріненням *in vitro*, особливо щодо швидкості процесу та ефективності акліматизації. При *ex vitro* укоріненні мікропагонів лохини акліматизація відбувається паралельно з укоріненням у субстраті, що дозволяє рослинам краще адаптуватися до умов зовнішнього середовища вже на ранніх стадіях. Це знижує стрес для рослин та збільшує їхню життєздатність після пересадки.

Завдяки тому, що процес *ex vitro* укорінення відбувається безпосередньо у природному субстраті, рослини швидше пристосовуються до нестерильних умов, що в кінцевому підсумку може скоротити загальний час вирощування. У результаті, при комерційному розмноженні лохини використання методу *ex vitro* дозволяє зекономити не тільки час, а й ресурси, знижуючи витрати на підготовку стерильного середовища та додаткові етапи адаптації рослин.

ЗМІСТ

Вступ	7
Розділ 1. Огляд літератури	9
1.1. Рід <i>Vaccinium</i>	9
1.2. Користь ягід культур <i>Vaccinium</i> для здоров'я	12
1.3. Розмноження <i>Vaccinium</i>	15
1.3.1. Статеве розмноження	16
1.3.2. Безстатеве розмноження	16
1.3.3. Розмноження <i>in vitro</i> або мікророзмноження	18
Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень	23
2.1. Об'єкт дослідження	23
2.2. Одержання асептичних культур	30
2.3. Мікроклональне розмноження	31
2.4. Вплив поживних середовищ і гормонального складу на розмноження пагонів	32
2.5. Укорінення та акліматизація	32
Розділ 3. Результати досліджень	34
3.1. Оптимізація мікроклонального розмноження лохини висококущової <i>Vaccinium corymbosum</i> L. на середовищі WPM	34
3.2. Оптимізація мікроклонального розмноження лохини висококущової <i>V. corymbosum</i> L. на середовищі mAN	45
3.3. Вплив різних субстратів на укорінення пагонів лохини висококущової <i>Vaccinium corymbosum</i> L. <i>ex vitro</i>	50
Висновки	54
Список використаних джерел	55
Додатки (копії публікацій)	63

ВСТУП

Клітинна технологія в рослинництві, заснована на розмноженні *in vitro* органів, тканин, клітин і ізольованих протопластів вищих рослин, використовується для створення генетично різноманітного рослинного матеріалу, зокрема для отримання нових сортів рослин, прискореного вегетативного розмноження форм з поліпшеними господарськими характеристиками та підвищення продуктивності [1, 2].

Лохина висококущова (*Vaccinium corymbosum* L.) – найпоширеніший вид роду; Сорти досить морозостійкі і культивуються практично на всій території США, а також Канади, Австралії, Нової Зеландії, Китаю та країн Європи [3–5]. Зокрема, Польща за останнє десятиліття стала одним із світових лідерів з вирощування ягід [6]. У Європі широко впроваджено в практику мікроклональне розмноження лохини та інших господарсько цінних і рідкісних видів рослин [7, 8].

В Україні це нова перспективна культура для виробництва фруктів. У природі та культурі зустрічається дуже рідко порівняно з традиційними малиною, полуницею, чорною смородиною, але набагато привабливіший для промислового та індивідуального садівництва завдяки своїм смаковим і лікувальним властивостям.

Для збільшення обсягів виробництва та якості відновлених саджанців цінних сортів лохини використовуються нові високі технології, у тому числі мікроклональне розмноження, яке займає ключове місце як альтернатива традиційним технологіям вегетативного розмноження. Малі розміри експлантатів, що використовуються для мікророзмноження, їх поверхнева стерилізація, стерильне асептичне культивування на живильному середовищі зцілює отримані рослини лохини від можливого зараження нематодами та бактеріальними збудниками, а також дозволяє значною мірою позбавити від вірусів, віроїдів та мікоплазм [8].

Літературні дані про методи мікроклонального розмноження *V. corymbosum in vitro* дуже суперечливі щодо типу живильного середовища та його гормонального складу [9–12].

Оскільки багато промислових сортів лохини мають низьку регенераційну здатність, інтенсивність онтогенетичних процесів у клітинних культурах підвищується за рахунок підбору специфічних умов культивування та компонентів живильного середовища, а саме фітогормонів, регуляторів росту та синтетичних речовин як ефективних стимуляторів морфогенезу негормонального походження. Оскільки цитокініни та ауксини значно здорожують технологію мікроклонального розмноження для отримання достатньої кількості оздоровленого садивного матеріалу різних сортів лохини, необхідний підбір складу живильного середовища. Це дозволить істотно мінімізувати витрати на клонування та збалансувати здатність до регенерації експлантатів, термін отримання регенерантів та якість пагонів. Мікроклональне розмноження лохини високої кущової в Україні практикується мало, а площа промислових насаджень навесні 2020 року не перевищувала 600 га. Чорниця є однією з найдорожчих споживчих ягід, яка значно збільшила попит на світовому ринку за останнє десятиліття. Підбір умов мікроклонального розмноження різних сортів лохини сприятиме прискоренню їх впровадження в промислове виробництво та сприятиме збільшенню виробничих площ культури, її насадження стануть джерелом додаткового доходу для дрібних фермерів або основою для функціонування великих ферми.

Метою роботи було визначення оптимальних умов асептичного мікроклонального розмноження для вирощування висококущової культури лохини, що дасть змогу отримати оздоровлений рослинний матеріал, збільшити вихід та покращити якість садивного матеріалу сортів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рід *Vaccinium*

Рід *Vaccinium* складається з приблизно 450 видів, більшість з яких широко поширені на гірських схилах у тропіках, а решта поширені в субтропічних, помірних і бореальних регіонах північної півкулі [1, 2]. Промислове виробництво плодів ягід *Vaccinium* відбувається в основному з видів секцій *Cyanococcus* (чорниця кистоплідна), *Oxycoccus* (журавлина), *Vitis-idea* (брусниця) та *Myrtillus* (чорниця) [2].

Vaccinium ягоди характеризуються м'ясистими дрібними та середніми плодами з високим вмістом антиоксидантних сполук (фенольних речовин, флавоноїдів, дубильних речовин), фруктових барвників (антоціанів та каротиноїдів), вітамінів (аскорбінової кислоти) та мінералів [3]. Ці фрукти широко відомі своєю користю для здоров'я, як повідомляється, через їх потужні біологічно активні фенольні сполуки, які можуть взаємодіяти (додатково або синергічно) для поліпшення стану здоров'я людини [4]. Багато видів *Vaccinium* використовуються як лікарські рослини та декоративні рослини [5]. Високі фенольні сполуки, що мають сильні антиоксидантні властивості *Vaccinium* ягоди пов'язані з профілактикою кількох хронічних і дегенеративних захворювань, включаючи рак і серцево-судинні захворювання [6]. Основна функція цих антиоксидантів полягає в тому, щоб зупинити або затримати окислення інших молекул шляхом інгібування ініціювання або поширення окислювальних ланцюгових реакцій вільними радикалами.

Чорниця (*Vaccinium L. spp.*) популярна в усьому світі як «Суперфрукт» завдяки своїй поживній цінності, підвищеним рівням біоактивних фенольних молекул і чудовій сенсорній оцінці [7]. Основні харчові компоненти включають вуглеводи (15,3%), білки (0,7%), харчові волокна (1,5%), жири (0,5%) і воду (85%) [2]. Стигла чорниця має 3,5% клітковини і 0,7% пектину [8]. Стигла чорниця має набагато більшу кількість цукрів, ніж листя, а

найважливішими цукрами в плодах є глюкоза, фруктоза і галактоза [9]. На додаток до цих основних поживних речовин, ці ягоди містять широкий спектр органічних кислот, непоживних фітостеролів, таких як ситостерин і стигмастерин; і антиоксидантні фенольні молекули, такі як фенольні кислоти, флавоноли, флавоноли, антоціани, проантоціанідини та елагітаніни (табл 1.1.) [3, 10, 11, 12]. Журавлина посіла перше місце за вмістом поліфенолів серед фруктів, які зазвичай споживаються в Північній Америці, що пов'язано з високою антиоксидантною активністю [13]. Доведено, що споживання брусниці та чорниці запобігає раку людини, що пояснюється високим вмістом фенольних та антоціанових сполук [14, 15]. Інші корисні фітохімічні речовини, включаючи проантоціанідини, необхідні мінерали, жирні кислоти, харчові волокна та провітамін А, вітаміни С і В-комплекс, присутні у більш високому рівні в журавлині, брусниці та чорниці [12, 16, 17]. Брусниця також багата калієм, кальцієм, магнієм і фосфором.

Таблиця 1.1.

Загальний вміст фенолів, флавоноїдів, антоціанів та проантоціанів у ягодах *Vaccinium* (мг/100 г свіжої маси).

Види ягід	Фенольні речовини	флавоноїди	Антоціани	Проантоціанідини
Чорниця високоросла	77.0–820.0	155.2–512.3	18.0–249.0	179.8
Напіввисока чорниця	110.0–668.0	161.7–492.1	94.5–310.0	-
Чорниця низькокущова	299.0–840.0	260.0–320.0	59.0–344.0	190.0–331.9
Чорниця кроляча	230.8–929.6	-	12.7–410.0	-
Брусниця	489.1–760.0	692.0–1047.0	35.0–708.8	278.8–1294.7
Журавлина	328.0–915.0	278.0–751.0	13.0–227.0	11.2–418.8
Чорниця	458.0–570.0	374.0–418.0	301.0–393.0	85.5

Чорниця є найпоширенішим і відомим фруктом серед комерційно важливих ягід виду *Vaccinium*. Хоча багато видів чорниці є вихідцями з Північної Америки, деякі з них, особливо висококущова (*V. corymbosum* L.), низькокущова (*V. angustifolium* Ait.) і кроляча (*V. ashe* Reade) чорниця, комерційно культивуються в багатьох країнах Європи, Південна Америка, Азія, Австралія та Нова Зеландія [37, 38]. Чорниця має значний внесок у фруктову промисловість Канади та США. У 2018 році Канада виробила близько 149 тис. тон чорниці, а експорт оцінив понад 360,8 млн доларів США [39], а це 275 тис. тон у США на загальну суму 820,2 млн. доларів США [40].

Одомашнення північноамериканської місцевої низькокущової лохини, також відомої як дика лохина, було розпочато в 1961 році [41]. Однак екстенсивні посадки не відбулися на цьому континенті через повільне встановлення та відсутність виробництва кореневищ із стеблових живців (SC), які зазвичай використовуються як матеріали для розмноження [42]. Дику чорницю в основному збирають із природно вирощених полів у холодних, суворих зимових районах у бореальних лісах, болотах і безпліддях у штаті Мен у США та атлантичних провінціях та Квебеку в Канаді, який є найбільшим у світі регіоном з вирощування чорниці з низьким чагарником [43].

Чорниця та лохина природним шляхом розмножуються як статевим шляхом з насіння, так і клонально через розгалужену підземну систему кореневищ. Як правило, їх розмножують у розплідниках, використовуючи стебло або кореневище як вихідний матеріал, що легко, але вимагає багато часу для великомасштабного розмноження. Насіння використовується в обмеженому масштабі, оскільки воно не відповідає типу рослин-донорів. Традиційно журавлину вегетативно розмножують пагоновими живцями для отримання генетично ідентичного потомства та збереження переваг. Однак звичайні методи стикаються з такими ж недоліками, як і для чорниці та брусниці [44]. Культуру тканин рослин *Vaccinium berry* можна отримати або з вузлових зрізів, або з листя [45, 46]. Клонування за

допомогою мікророзмноження є більш вимогливим і ефективним методом для поліпшення існуючих полів диких ягід, а також для створення нової ферми через його неймовірний потенціал виробництва багатьох бажаних нових клонів з однієї рослини-джерела за короткий час, цілий рік [44, 47]. Останнім часом мікророзмноження було привабливим для дослідників через його потенціал для покращення біохімічних властивостей ягідних культур, включаючи лохину, брусницю та полуницю. Мікророзмножені ягоди мають вищий рівень фенольних сполук, які діють як антиоксиданти в організмі людини. Цей огляд надає важливу інформацію для кращого розуміння методів мікророзмноження та звичайних методів розмноження та їх впливу на морфологію та антиоксидантні властивості чорниці, журавлини та брусниці, а також заповнює наявну прогалину в літературі.

1.2. Користь ягід культур *Vaccinium* для здоров'я

В організмі людини вільні радикали викликають окисне пошкодження основних молекул, таких як ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти. Таким чином, ці радикали беруть участь у початковій фазі кількох хронічних захворювань, таких як рак і серцево-судинні захворювання. Фармацевтичні дослідження *in vitro* та *ex vivo* надали велику кількість інформації про біоактивність чорниці проти багатьох стадій канцерогенезу, який також називають онкогенезом або пухлинотворенням, і здатність лікувати кілька дегенеративних захворювань (табл. 1.2) [3, 48, 49]. Чорниця добре відома своїми протираковими, протизапальними та протидіабетичними властивостями [50, 51]. Плоди або листя чорниці кущової, низькокущової та лохини індукують апоптоз канцерогенних клітин *in vitro* різних видів раку, таких як рак крові [52], молочної залози [15, 49], товстої кишки [50, 53], печінки та простати [54, 55, 56] раку, і тому вважається, що чорниця може допомогти запобігти людському організму від захворювань, які викликають рак.

Біоактивні сполуки в ягодах *Vaccinium* та їх біологічні властивості

Види ягід	Біологічно активні сполуки	Біологічні властивості
Чорниця висококроста	Поліфеноли, антоціани, дубильні речовини, β -каротин, лютеїн і зеаксантин	Протиракова, протизапальна, антимікробна дія; уповільнити та повернути назад пов'язані з віком дефіцити поведінки, знизити серцево-судинні ризики, полегшити радіаційне ураження легень; уповільнений діабет II типу, ювенільний ідіопатичний артрит та остеоартрит.
Чорниця низькокущова	Фенольні речовини, флавоноїди, антоціани та проантоціандіни	Уповільнює розвиток раку печінки і простати, прилучують інфекції сечовивідних шляхів; зворотні ознаки старіння, захистити мозок від ішемічного ураження; зміцнюють судини і артерії; нейропротекторний ефект.
Чорниця кроляча	Поліфеноли, антоціани, дубильні речовини	Перешкоджають раку товстої кишки та печінки.
Брусниця	Поліфеноли, антоціани та проантоціандіни	Запобігайте шкідливим метаболічним ефектам, спричиненим дією з високим вмістом жиру; захищають нирки від пошкодження нирок, викликаного ішемією-реперфузією; протизапальну, антиканцерогенну, антимікробну, протислайкову дію; запобігає лейкемії та раку товстої кишки.
Журавлина	Поліфеноли, антоціани та проантоціандіни	Антибактеріальну, антиканцерогенну дію; знизити серцево-судинний ризик у пацієнтів з метаболічним синдромом; захистити від окиснення та інсулінорезистентності, спричинених дією; запобігає кишковому окислювальному стресу, запаленню та інфекції сечовивідних шляхів.
Чорниця	Антоціани, флавоноїди, каротиноїди, лютеїн і зеаксантин	Антиканцерогенний; зменшити запалення і прогресування хронічної гіпертонії; запобігає розвитку глаукоми, катаракти та дегенерації жовтої плями.

Екстракти дикої чорниці зменшують виникнення захворювань, пов'язаних зі старінням [66]. Дієти, додані 2% чорниці, мають чіткий біологічний вплив на функцію нейронів і поведінку старіючих тварин, що може бути пов'язано з впливом окремих класів танінів у різних областях мозку [58]. Продукти з чорниці знижують високий кров'яний тиск, рівень холестерину в крові і таким чином запобігають серцево-судинним і атеросклерозним ризикам в організмі людини [57]. Щоденне споживання чорниці покращує жорсткість артерій у жінок у постменопаузі з передстадією та стадією 1 гіпертензії [59].

Чорниця демонструє протидіабетичні властивості, захищаючи β -клітини підшлункової залози від індукованого глюкозою окисного стресу [60, 69]. Опитування визначило канадську лошину низькокущової як фрукти, які настійно рекомендують традиційні практики та старійшини кри з *Beyou Istchee* у Квебеку для лікування діабетичних симптомів та ускладнень [70]. Споживання європейської чорниці (чорниці) покращує нічну гостроту зору у мишей із ожирінням [37]. Він покращує доставку крові та кисню до очей і поглинає вільні радикали, таким чином захищаючи від розвитку глаукоми, катаракти та макулярної дегенерації у мишей і людей [38, 39].

Проантоціанідини, антоціани та флавоноли в чорниці є корисними для захисту кісток [45]. Сік чорниці позитивно впливає на лікування ювенільного ідіопатичного артрити [61]. Щоденне споживання цілої чорниці зменшує біль, скутість і труднощі при виконанні повсякденної діяльності, покращує нормальну ходьбу і, отже, покращує якість життя людей із симптоматичним остеоартритом колінного суглоба [62]. Антоціани чорниці використовували для кількох терапевтичних цілей, включаючи лікування фіброзно-кістозної хвороби, розладів зору, спричиненої радіацією загибелі клітин [63]. Проантоціанідини А-типу, виявлені в дикій чорниці, володіють антиадгезивними та антипроліферативними властивостями для мікроорганізмів, які допомагають запобігати бактеріальним інфекціям, особливо в сечовивідних шляхах [56]. Екстракт листя чорниці високої має значну антибактеріальну дію проти *Salmonella typhymurium* і *Enterococcus faecalis* [64]. Споживання добавок порошку дикої чорниці підвищує спричинений дією *ex vivo* антиоксидантний статус сироватки в організмі людини [57]. Екстракт із листя, основного відходу при збиранні чорниці, а також у переробній промисловості, пригнічує експресію вірусу гепатиту С [65]. Отже, чорниця захищає людину від багатьох хронічних захворювань.

Журавлина вважається лікарським фруктом, і вплив продуктів з журавлини на здоров'я людини зосереджено в основному на інфекціях сечовивідних шляхів і серцево-судинних розладах [3, 35]. Журавлина (сік, концентрований порошок, капсули та таблетки), що містить високий рівень проантоціанідинів А, може запобігти рецидиву інфекцій сечовивідних шляхів, зменшуючи адгезію *Escherichia coli* до уроепітеліальних клітин, що може зменшити застосування антибіотиків і, як наслідок, розвиток стійкості до ці препарати [22, 23]. Журавлина, багата на поліфеноли, сприяє зниженню ризику серцево-судинних захворювань, підвищуючи стійкість ліпопротеїнів низької щільності до окислення, пригнічуючи агрегацію тромбоцитів, знижуючи артеріальний тиск та за допомогою інших антитромботичних

механізмів [25]. Вони також продемонстрували терапевтичну дію проти раку молочної залози [45].

Встановлено, що брусниця є одним із провідних конкурентів із найвищим вмістом фенолів і проантоціанідинів, а також антиоксидантною активністю серед ягід *Vaccinium* [31, 33], які виявляють значні антигенотоксичні, антимуtagenні та апоптотичні ефекти на клітини лейкемії людини та колоректального раку в *in vitro* [48]. Ці ягоди зменшують запалення печінки та діють проти ожиріння шляхом зменшення жиру в організмі мишей з високим вмістом жиру [45, 46]. Чорниця використовується в народній медицині всередину (як чай або лікер) для лікування розладів шлунково-кишкового тракту та цукрового діабету [33]. Їх антоціани продемонстрували протипухлинні властивості, пригнічуючи проліферацію ракових клітин і діючи як клітинні антиінвазивні фактори та хіміо-інгібітори [15].

1.3. Розмноження *Vaccinium*

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]. Щоб впоратися з високим попитом на ці ягоди для створення нових ферм, потрібні численні посадкові матеріали. Хоча брусниця, журавлина та чорниця кущова, вирощена з диких насаджень, потребують мінімальної практики вирощування, кількість культивованих господарств зростає. На природно вирощеному промисловому полі низькокущової 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. Різні способи розмноження обговорюються нижче:

1.3.1. Статеве розмноження

Низькокущова 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 вважається, приваблює рослина яскравим кольором і ароматним 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 низькокущової лохини. При статевому розмноженні рослини чорниці низькокущової 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 вбивають 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].

Розмноження живцями

Вегетативне розмноження видів *Vaccinium* вже давно успішно практикується з використанням вузлових сегментів стебел м'якої деревини, напівтвердої деревини, листяної деревини, окремого вузла, поділу підземних кореневищ або навіть живців листових бруньок як пропагул для відтворення генетично ідентичних рослин, які називаються клонами, які зберігають генетична структура та однорідність вихідної рослини. Найбільш поширеною практикою є зрізання хвойних порід з використанням молодих пагонів або верхівок пагонів, що містять меристему (рис. 1.1).

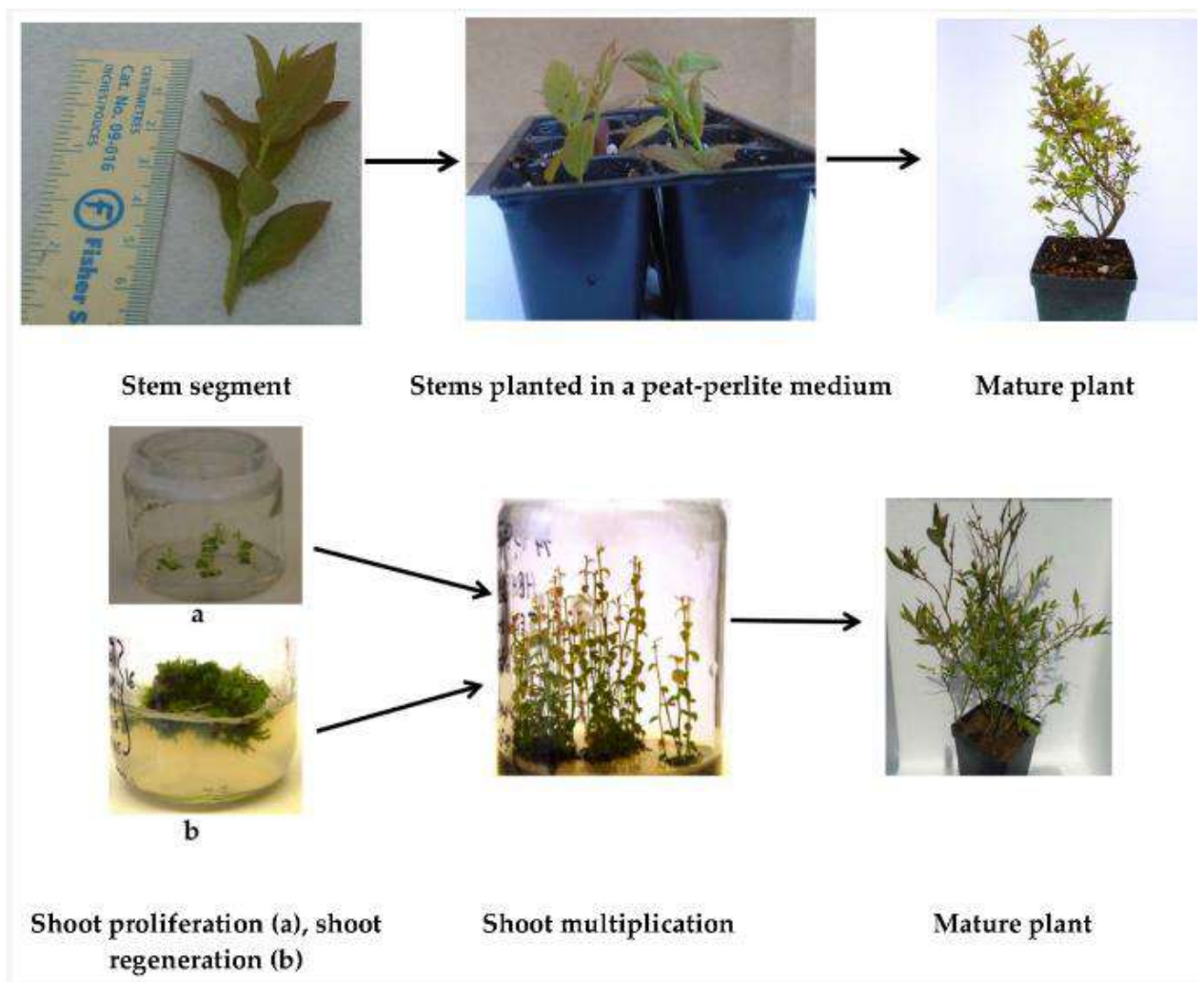


Рис. 1.1. Розмноження живцями м'якої деревини (верхня панель) і мікророзмноження (нижня панель) лохини низькокущової [30].

Кінчики пагонів довжиною приблизно 4–6 см обрізають у материнської рослини та висаджують у ґрунт для горщиків, який можна доповнити гормонами росту, або безпосередньо в полі [35]. СК відрощують пагони та розвивають додаткові корені (рис. 1.1) протягом кількох тижнів із підтриманням належної родючості ґрунту, температури, вологості та інтенсивності та тривалості освітлення. Альтернативою живцям хвойних порід є живці листяних порід, які стосуються живців, отриманих після того, як рослинна тканина здерев'яніла, як правило, на стадії спокою рослин. Напівтверду деревину та сегменти кореневища відрізають 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 традиційного розмноження полягає в тому, що SCs мають обмежений потенціал для розвитку нових і наступних кореневищ, які уповільнюють 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 клоновими 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.

1.3.3. Розмноження *in vitro* або мікророзмноження

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, цитокиніни та гібереліни) і хелатного 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. Регенерація меристеми, пагона чи кореня здійснюється трьома різними морфогенними шляхами [44]: (i) проліферація пазушного пагона з уже існуючих апікальних або пазушних бруньок, (ii) органогенез шляхом утворення однополярного органу або регенерації пагона та (iii) 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 спирається на дві основні концепції: тотипотентність і пластичність розвитку. Тотипотентність — це здатність клітини диференціюватися, проліферувати та 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 клонуючи 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 ряд переваг порівняно з природними рослинами у виробництві біоактивних сполук [43, 44] такі як (i) умови виробництва можна оптимізувати та контролювати для отримання бажаного вмісту чистого продукту; (ii) біологічні фактори, такі як мікроорганізми, комахи та кліматичні та географічні умови, не можуть впливати на виробництво вторинних метаболітів; і (iii) 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 збільшує 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 Коллінзом [47], які вирощували шматочки 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 висококущової та напіввисокої лохини регулярно використовується більше ніж тридцять років [51], мікророзмноження низькокущової лохини знаходиться на стадії розробки. Перше утворення калюсу було викликано *in vitro* у чорниці низькокущової з використанням міжвузлів стебла Нікерсоном і Холлом [52] на середовищі Мурасіге та Скуга [53] з додаванням гормону росту 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-D) (табл. 1.3.).

Таблиця 1.3.

Приклади розмноження видів *Vaccinium* *in vitro* з використанням різних базальних середовищ та експлантів

види	Типи носіїв 1	Мікророзмноження через	Використані експланти	Укорінення <i>In Vitro/Ex Vitro</i>
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. angustifolium</i> cv. 'Sw. Cloud', «Патріот», «Northblue», «Chippewa»	MBM-C	Соматичний ембріогенез	Сегменти листя	<i>In vitro</i> & <i>ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i> дві клони	MBM-C	Розростання пагонів	Подинокі вузли, пазушні бруньки	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i> cv. «Фанді» і дві клони	MBM-C	Розростання пагонів	Верхівка і сегменти пагона	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i> дві клони	MBM-C	Відродження пагонів	Сегменти листя	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i>	WPM	Розростання пагонів	Одиночний вузол	N/R
<i>V. angustifolium</i>	ПРИМІТКА	Відродження пагонів	Гіпокотиль і сім'ядолі	N/R
<i>V. angustifolium</i>	ЧСЧ	Утворення мозолі	Міжвузля і плоди	N/R
<i>V. angustifolium</i>	ЗЕМ	Розростання пагонів	Стріляти	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i>	ЗЕМ	Розростання пагонів	Молодий пагін	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i>	ЗЕМ	Відродження пагонів	листок	<i>Ex vitro</i>
<i>V. angustifolium</i> cv. "Карлик Топхат"	WPM	Розростання пагонів	Одиночний вузол	<i>In vitro</i> на WPM
<i>V. angustifolium</i>	ЗЕМ	Відродження пагонів	Міжвузля	N/R
<i>V. ashei</i> cv. "Титан"	MCM і WPM	Розростання пагонів	Багаторазові пагони	<i>Ex vitro</i>
<i>V. corymbosum</i> cv. 'Polaris', 'St. Cloud'	MBM-C	Розростання пагонів	Пахові відростки	<i>Ex vitro</i>
<i>V. corymbosum</i> cv. «Гурон»	MCM і WPM	Розростання пагонів	Вузлові сегменти	<i>Ex vitro</i>
Гібрид <i>V. corymbosum</i> 'Spartan' × <i>V. bracteatum</i>	MCM і WPM	Розростання пагонів	Пазушні бруньки	В пробірці
<i>V. corymbosum</i> cv. 'Berkeley', 'Bluecrop' 'Goldtraube'	ЧСЧ і ANM	Розмноження пагонів	Пагони	<i>In vitro</i> на ANM
<i>V. corymbosum</i> cv. 'Elliot'	WPM	Відродження і розростання пагонів	Бруньки, листя, мікропагони	<i>Ex vitro</i>
<i>V. corymbosum</i> cv. 'Bluecrop' 'Berkeley', 'Earlblue'	MCM і WPM	Розростання пагонів	Вузлові сегменти	В пробірці
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. angustifolium</i> cv. 'Northland'	WPM	Відродження пагонів	Вузлові і листові сегменти	В пробірці

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 низькокущової [38, 56] та її міжвидових гібридів напіввисокої [60, 61, 62] лохини (табл 1.3.). Найновішим прогресом у мікророзмноженні лохини є розвиток соматичного ембріогенезу у сортів лохини та використання автоматизованих біореакторних систем з рідкими середовищами для розмноження мікропагонів низькокущової та напіввисокої чорниці, отриманих або через проліферацію пагонів, або за допомогою адвентивної регенерації пагонів. Добре налагоджено мікророзмноження видів журавлини та брусниці з пазушних меристем, а також органогенез пагонів з листових експлантів з різними регуляторами росту рослин. Біореакторна система економічно ефективна для комерційного розмноження. Однак рідка культура, як правило, обмежена низьким вмістом кисню та гіпергідрогенністю регенерантів. Іншою проблемою при мікророзмноженні лохини 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 повідомили, що використання індол-3-масляної кислоти (IBA) замість індоліл-3-оцтової кислоти (IAA) і зниження концентрації N6-(2-ізопентеніл) аденіну (2iP) покращує здоровий пазушний пагін з відносно довгими міжвузлями та жорсткими, добре розвинуте листя у лохини висококущової та пригнічена основа-прилягає до неочікуваних пагонів, які були тонкими та крихкими, здебільшого заклованими з короткими міжвузлями, меншими та розгорнутими листками.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Матеріалом для досліджень були фрагменти молодих пагонів з бруньками 5 сортів лохини висококущової *V. corymbosum* зарубіжної селекції ранньостиглого сорту — Спартан; середньостиглі — Норленд, Олімпія, Рубель, пізньостиглі — Еліот.

Сорт Спартан



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд рослин сорту Спартан

Один з ранніх – дозріває в липні, один з великих – вага до 2 г. Радусе лохина Спартан і врожайністю – до 6 кг з куща. Цвіте пізно, що зменшує ризик потрапляння під повторні пізні заморозки.

Смак ягід дуже приємний, терпкувато-солодкий. Розмір 16-18 мм в діаметрі, до третього збору дещо дрібнішають. Повністю дозрілі, не довго висять – обсипаються: рекомендується збирати не рідше 1 раз на 7 днів, щоб не було втрат.

Опис:

Дозрівання: липень

Висота куща (м): 1,5-1,8

Діаметр ягід (мм): 16-18

Врожайність (кг з куща): 3,6-6

Особливості: швидко осипаються.

Сорт Еліот



Рис. 2.2. Зовнішній вигляд рослин сорту Еліот

Лохина Елліот, або пізнь остиглий старожил плантацій. Кущ високорослий – від 1.5 м до 2 м дорослі кущі, пряморослий, гілки вертикально-спрямовані. Досить густий, щільний, помірно розлогий кущ – вимагає частого і сильного підрізування для отримання більшої продуктивності, більшого розміру і кращої якості ягід.

Плоди дрібні і середні – в діаметрі від 11-12 до 15 мм, поодинокі великі, зібрані в кисті середньої і малої щільності – пухкі.

Як мінус – перезрілі плоди схильні обсіпатися, як плюс – не розтріскуються. Шкірочка міцна і міцна, желейна м'якоть густа і щільна – транспортабельність висока, а здатність до зберігання – один з головних переваг сорту. В охолоджену вигляді можуть зберігатися більше місяця (за відгуками, мало не 7-8 тижнів і до 12 тижнів в умовах контрольованої температури).

Смак приємний, кисло-солодкий, з ароматом. При зниженні температури, достатку опадів в смаку, за відгуками, з'являється малопомітна гірчинка. При цвітінні не страшні заморозки аж до -6 ... -7 С.

Опис:

Дозрівання: середина липня

Висота куща (м): 1,5-2

Діаметр ягід (мм): 11-15

Врожайність (кг з куща): 6-7 кг

Особливості: великий термін зберігання.

Сорт Норленд



Рис. 2.3. Зовнішній вигляд рослин сорту Норленд

Нортленд - це високопродуктивний сорт лохини, який характеризується хорошою морозостійкістю. У висоту кущ досягає 1,1-1,3 м. Сама ж рослина, досить компактна, але тим не менше, вона відрізняється хорошою врожайністю. Вона легко пересідає і пристосовується, до різних типів ґрунту, в незалежності від рівня їх кислотності. Облистянність куща даного сорту - середня. Варто відзначити, що листя восени має оранжево-жовте забарвлення. Це надає рослині гарний вигляд.

Ягоди - середнього розміру, ідеально підходять, як для приготування джему, так і для випічки. Також їх можна вживати в сирому вигляді. Ягоди

лохини, позитивно впливають на імунну систему людей. Варто відзначити, що в ягодах сорту Нортленд, міститься велика кількість глюкози.

Варто пам'ятати, що ягоди лохини на кущах, можуть зберігатися досить довгий період. Вони при цьому не будуть обсіпатися і гнити. Для збільшення врожайності даної рослини, її слід регулярно поливати, удобрювати і обрізати хворі пагони.

Сорт Рубель



Рис. 2.4. Зовнішній вигляд рослин сорту Рубель.

Лохина Рубель - це сорт сімейної реліквії, названий Елізабет Колман Уайт в 1905-1906 рр. Оригінальну рослину було виявлено в дикому вигляді в Соснових степах Нью-Джерсі. Вона була названа на честь імені Руба Ліка, людини з соснової долини, який і виявив цей різновид лохини. Рубель це високоросла лохина яка є прородичем багатьох сучасних різновидів, яка перша використовувалась в комерційному вигляді. Рубель був відкритий заново, особливо тому, що плоди мають більш насичений смак, також було доведено що він має високий антиоксидантний потенціал і як наслідок, цінність для здоров'я цього сорту набагато вище, ніж у більшості інших

сортів лохини. У Європі ці переваги в своїх книгах вихваляє, відомий англійський письменник-садівник Джеймс Вонг (доморощена революція).

Це пізній середньостиглий сорт. Якщо ви шукаєте первісну лохину, яка має смак і зовнішній вигляд, який вона була 100 років тому в нетрях Соснових лісів Джерсі, то Рубель - один з тих, хто вам потрібен. Його вирощують до сих пір, і він пережив усіх своїх сучасників і багатьох своїх нащадків, залишаючись в первозданній формі.

Основні характеристики і властивості

Кущ

Щільної конституції з прямостоячими гілками, погано росте на перезволожених ґрунтах.

Час цвітіння: квітень

Час дозрівання: кінець липня початок серпня в один час з Елізабет або Джерсі.

Витривалість: Витривалі до - 30 С.

Вік плодоношення: 1-2 роки після посадки.

Розмір чагарнику в зрілому віці: 120-150 см у висоту і ширину.

Восени листя стає з яскравими червоними відтінками.

Зрілий кущ дає 7-9 кг ягід.

Ягоди

Невеликі, темно-сині, рясно розташовані; при повному дозріванні м'якоті шкірка набуває світло-блакитний колір; Рубель має надзвичайно високий вміст антиоксидантних речовин, приблизно в 3 рази більше, ніж Bluecrop.

Смак: Насичений, солодкий з маленькою кислінкою; відмінно підходить для свіжого вживання; але також є кращим варіантом для запікання, наприклад кекси.

Цікавий факт, що 100 років тому ягоди Рубель вважалися великими.

Стійкість

Рубель в основному дуже стійкий до хвороб, але ця рослина не припускає вологих місць і страждає раніше, ніж інші культивовані садової лохини.

Особливості

Рубель - одна з перших культивованих ягід лохини, яка була представлена на ринку США на початку 20 століття. Хоча її плоди трохи менше, ніж у більшості нових видів, але є такі переваги:

Рубель незмінно дає багатий середньостиглий врожай з високим рівнем антиоксидантів.

первозданний смак лохини якою вона була до буму сортовиведення, це характерний насичений смак в високим вмістом мікроелементів.

крім того, листя восени стає вогненно-червоним, що робить цей красивий чагарник до того ж універсальною ландшафтною рослиною.

самозапилюється, але посадите ще одну північну лохину для отримання більшої кількості плодів.

Догляд

Лохина віддає перевагу кислому ґрунту (рН 4,5-5,5). Удобрюйте ранньою весною гранульованим або рідким кислотним добривом. В кінці зими обріжте мертві гілки. Після збору врожаю обріжте неплодоносні гілки, залишивши нові гілки для плодоношення в наступному сезоні.

Ділянка і ґрунт: мінімум пів дня на сонці 6-8 годин і з гарним дренажем кислий ґрунт.

Сорт Олімпія

Темп зростання: Швидкорослий.

Вік плодоношення: Скороплідний та приносить відчутний врожай на 2-й чи 3-й рік;

Габарити у зрілості: 1,25-1,8 м заввишки з розмахом 0,9-1,2 м.

Розмістіть рослини на відстані: 1,5-1,7 м одна від одної.

Цвітіння: Рясне, у вигляді бочкоподібних бутонів сформованих у витончені грона, що звисають під гілками. Колір кремово-білий з рожевим відтінком. Час цвітіння: травень. пізно, щоб допомогти уникнути заморозків. Квіти витримують до -6 °С.

Листя: Темно-зелене, овальної форми з глянцевою поверхнею. Восени вони змінюють колір на відтінки червоного, жовтого та помаранчевого.

Кора: Гладка, цегляно-червона.



Рис. 2.5. Зовнішній вигляд рослин сорту Олімпія.

Ягода

Середнього розміру до 2 см, злегка плескаті. Має делікатно-солодкий смак, соковиту і тверду консистенцію. Шкірка світло-блакитна. М'якуш світло-зеленого кольору майже білий з м'яким ароматом. Рубчик невеликий.

Зібрані в пухкі грона, дозрівають у середині сезону.

Має неймовірну здатність зберігати якість плодів і довго зберігати їх на гілках.

Врожайність

6-9 кг. Його ягоди розвиваються в унісон і утримуються на гілках не втрачаючи властивостей, що дозволяє зробити збір лише один раз тоді, коли це буде необхідно. Але можна і збирати протягом кількох тижнів як правило 2-3.

Дозрівання

В середині червня. Перші ягоди можуть з'явитись на другий сезон вирощування. У 3-4 річному віці один кущ може дати 0,5-1 кг плодів. З цілком зрілого чагарнику можна зібрати до 6 кг. Збір слід проводити приблизно через 5 днів після того, як вони стануть повністю синіми.

Морозостійкість

Витривала до -32 °С. Зона стійкості USDA: 4–8. Потребує мінімум 800-1000 годин стану спокою в зимовий час, при температурі менше ніж +7 °С.

Стійкість

Менш примхливий сорт. Протистоїть: хворобам. Зазнає невеликої посухи. Стійкий до плодової гнилі.

2.2. Одержання асептичних культур

Асептичну культуру лохини високої кущової *in vitro* отримано модифікованою нами методикою [13]. Відбір експлантів проводили з використанням фрагментів пагонів з двома-трьома пазушними бічними бруньками 2–3-річного віку з рослин-донорів різних сортів лохини.

Стерилізацію рослинного матеріалу проводили за таким протоколом: водопровідна вода + 0,01% Твін (30 хв), 70% етанол (30 с), 10% — 15% — 20% розчини гіпохлориту натрію («Відбілювач») + 0,001% Твін (10 хв, 15 хв, 20 хв) і триразове промивання в стерильній дистильованій воді протягом 20 хв; водопровідна вода + 0,01% твін (30 хв), 70% етанол (30 с), 0,1% або 0,01% розчини хлориду ртуті (1 хв) і триразове промивання в стерильній дистильованій воді протягом 20 хв.

Для кращого проникнення дезінфекційних речовин в епідермальну тканину пагонів використовували поверхнево-активну речовину Tween 20 (Phyto Technology Laboratories, США).

2.3. Мікроклональне розмноження

Для мікроклонального розмноження лохини висококущової використовували поживне агаризоване середовище з 2,41 г/л середовища Woody Plant Medium (WPM) (Phyto Technology Laboratories, США). Модифіковано залежно від сорту регуляторів росту 0,4 мг/л, 0,6 мг/л, 0,8 мг/л і 1,0 мг/л 2iP — 6-БАП, диметилалаліламінопурин (Phyto Technology Laboratories, США); 40 мг/л та 80 мг/л аденінгемісульфату (Phyto Technology Laboratories, США); 0,5 мг/л, 1 мг/л зеатину (Sigma); 50 мг/л і 100 мг/л хелатного заліза Sequesrene 138 (Phyto Technology Laboratories, США); вітаміни: В1 (0,05%), В6 (0,05%), РР (0,1%), С (50 мг/л) (Україна), 30 г/л сахароза (Україна); контроль — модифіковане середовище росту WPM, без регулятора росту 2iP. Культивування стерильних експлантів проводили в скляних банках об'ємом 450 мл (по 15 штук на ємність) на середовищі з 0,5 % агару (Phyto Technology Laboratories, США), рН 5. Пагони культивували в контрольованих умовах: інтенсивність освітлення від люмінесцентних ламп OSRAM L36W / 77 Флюора — 3000 люкс, температура — 24 ± 2 °С, відносна вологість — 70% і 16-годинний фотоперіод.

Для порівняння ефективності мікроклонального розмноження лохини високої кущової залежно від складу живильного середовища та мікрокліматичних умов вирощування оцінювали регенеративну здатність експлантів, особливості пагонів, варіабельність варіантів росту регенерантів та коефіцієнт їх розмноження. — через 6 тижнів аналізували співвідношення пагонів, що розвинулися з бруньки (РК). Середній РС визначали методом математичної статистики [14]. Висоту регенерантів вимірювали на аркуші міліметрового паперу.

Усі досліди проводили в 3-кратній повторності. Для досліджуваних сортів у кожному варіанті досліду аналізували не менше 25 регенерантів (5 банок і 5 експлантів). Результати досліджень оброблено статистично.

2.4. Вплив поживних середовищ і гормонального складу на розмноження пагонів

Для фази розмноження було протестовано два базальних поживних середовища: середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) і модифіковане середовище рододендрону Андерсона (mAN).

Середовище Anderson's Rhododendron - середовище AN (Anderson, 1980) було модифіковано таким чином: 37,3 мг/л NaEDTA та 27,8 мг/л FeSO₄ x 7H₂O використовувалися замість 73,40 мг/л FeNaEDTA. Середовище містило 0,5 мг/л зеатину, застосованого окремо або в поєднанні з різними концентраціями (0,1, 1 і 5 мг/л) індол-3-масляної кислоти (ІМК) (Таблиця 1). 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 Millipore, 0,22 мкм) і додавали до середовища після автоклавування.

Однорідні поодинокі пагони, вирізані з встановлених культур, використовували в експериментах з розмноження. Пагони двічі пересівали на кожне середовище, а параметри розмноження визначали при другому пересіві (інтервал пересіву 35 діб). Контролювали параметри розмноження: індекс розмноження та довжину осьових і бічних пагонів. Індекс розмноження визначали як кількість новоутворених пагонів (>0,5 см) на початкову верхівку пагона, зареєстровану після зазначеного інтервалу субкультури.

Культури зберігали в камері для вирощування при 23±1°C протягом 16-годинного фотоперіоду.

Інтенсивність світла, що подається холодними білими люмінесцентними трубками, становила 54 мкмоль/м²/с1.

2.5. Укорінення та акліматизація

Пагони всіх сортів укорінювали на модифікованому середовищі mAN з додаванням 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активованого вугілля. Відсоток укорінених рослин, а також інші параметри вкорінення, такі як кількість і довжина

коренів і висота вкорінених рослин, визначали через 28 днів. Як укорінені, так і неукорінені пагони видаляли з культуральних посудин, ретельно промивали водою, щоб видалити прилипло середовище, переносили в пластикові горщики, що містили стерильний ґрунтовий субстрат, і акліматизували на «туманній» лавці в теплиці протягом двох тижнів.

Статистичний аналіз

В експерименті з розмноження кожна обробка включала 6 культуральних посудин \times 5 однорідних пагонів \times 2 повторення. Дані були проаналізовані за допомогою Excel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Оптимізація мікроклонального розмноження лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на середовищі WPM

Здатність до регенерації в умовах *in vitro* багато в чому залежить від ефективності використовуваних дезінфекторів. Для стерилізації використовують доступні і відносно недорогі дезінфікуючі речовини, в тому числі 70% етанол, розчини хлориду ртуті і «Білизна» з Твіном 20.

За дії 0,01 % та 10 % – хлориду ртуті і 15 % розчину «Білизна» спостерігалось майже 70–75 % забруднення рослинного матеріалу (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Вплив стерилізуючих розчинів на життєздатність експлантатів

Vaccinium corymbosum L.

Стерилізуючі розчин	Час стерилізації	Ефективність стерилізації, %	Життєздатні експлантати, %
70% етанол	30 с	25	7
0,01% хлорид ртуті	30 с		
70% етанол	30 с	85	25
0,1% хлорид ртуті	60 с		
70% етанол	30 с	20	10
5% «Білизна»	5 хв		
Твін 20	5 хв		
70% етанол	30 с	75	70
10% «Білизна»	10 хв		
Твін 20	10 хв		
70% етанол	30 с	95	87
25% «Білизна»	15 хв		
Твін 20	15 хв		

У випадках використання хлориду ртуті результати показали пошкодження (побуріння) тканин рослин і наявність грибкових і бактеріальних інфекцій, коли експланти стерилізували в 70% етанолі (1 хв) і 0,01% хлориду ртуті (1 хв).

Перші ознаки контамінації експлантів *V. corymbosum* L. після дії 70% етанолу (1 хв) та розчинів низьких концентрацій «Білизна» + Твін 20 (10 хв) виявлялися на 5-ту добу культивування – 70% рослин були заражені.

У результаті підбору експериментальних умов стерилізації оптимальними були визначені такі умови: 70% етанол (1 хв) та 20% розчин «Білизна» + 0,001% Твін 20 (20 хв). Це дозволило отримати до 85–95% життєздатних експлантів. Відсутність бактеріальної та грибкової інфекції на 14–15 добу і в подальшому дала підстави вважати культуру лохини садової асептичною. Такі умови стерилізації експлантів застосовувалися надалі.

Згідно з літературними даними, NaOCl менш токсичний для експлантів рослинної тканини порівняно зі сполуками ртуті та досить ефективний у видаленні рослинних патогенів [15].

Ми продовжили дослідження з підбору оптимальних стерилізуючих речовин для одержання більшої кількості життєздатних експлантів. Ми використали різні комбінації стерилізації із застосуванням 75% етанолу і 4% гіпохлориду натрію (табл. 3.2).

Спостерігали різні відсотки ефективності стерилізації і індукції пагонів *in vitro* залежно від часу експозиції стерилізації експлантів. За однакового часу експозиції гіпохлоридом натрію і збільшення часу експозиції етанолом спостерігали значне зниження інфікування посадкового матеріалу та значного підвищення відсотку індукції пагонів. Найнижчий відсоток інфікування спостерігали за стерилізації етанолом 30 с і гіпохлоридом натрію 20 хв. Найвищий відсоток індукції пагонів спостерігали за стерилізації етанолом 60 с і гіпохлоридом натрію 10 хв. (рис. 3.1, 3.2).

Стерилізація експлантатів етанолом і гіпохлоридом натрію з різною експозицією

Варіант стерилізації	Час експозиції етанолом, с	Час експозиції гіпохлоридом натрію, хв
1	5	10
2	5	10
3	5	10
4	30	15
5	30	15
6	30	15
7	60	20
8	60	20
9	60	20

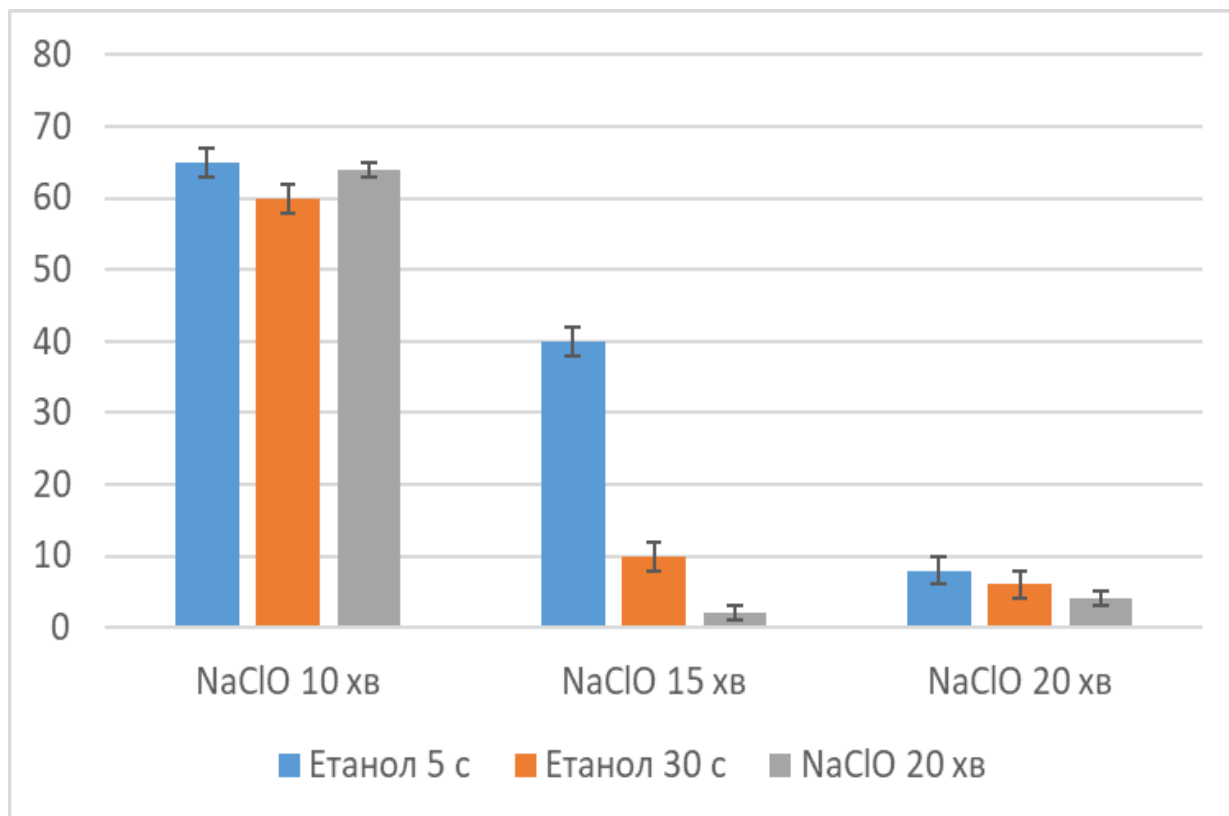


Рис. 3.1. Ефективність стерилізації пагонів, % інфікованих пагонів

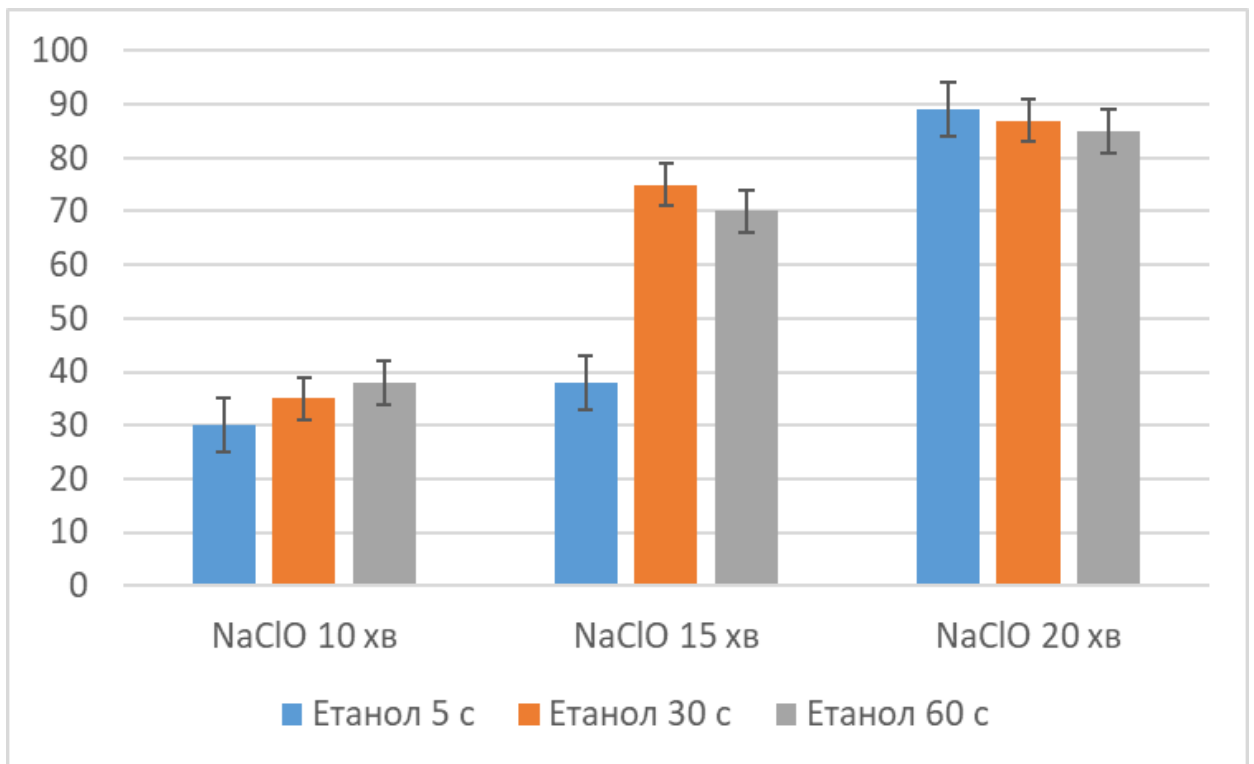


Рис. 3.2. Відсоток індукції пагонів за різних комбінацій стерилізуючих речовин

Культивування експлантатів *V. corymbosum* L. проводили на живильному середовищі WPM [16], оскільки більшість авторів підтверджують, що його мінеральний склад найкраще збалансований для розмноження та росту *in vitro* багатьох рослин, у тому числі лохини садової [17–20]. Проте дані автора про гормональний склад живильного середовища дуже розбіжні й часто суперечливі [21–23].

Досліджено вплив гормонального та мінерального поживного складу середовища для введення експлантатів лохини високої кущової в культуру *in vitro*. Проаналізовано вплив різних концентрацій 2iP, мінеральних сполук і вітамінів на висоту і кількість пагонів і кількість повних регенерантів для мікроклонального розмноження сортів лохини висококущової.

Регенеративну здатність експлантатів оцінювали за варіабельністю параметрів росту та коефіцієнтів відтворення регенерантів. Умови вирощування – освітлення, температура, вологість [24], а також концентрація

2iP у живильному середовищі значною мірою впливають на висоту пагонів сортів *V. corymbosum* L. *in vitro* (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Висота регенерантів сортів *Vaccinium corymbosum* L. залежно від концентрації 2iP у живильному середовищі

Концентрація 2iP, мг/л	Висота регенерантів сортів <i>Vaccinium corymbosum</i> L., см				
	Еліот	Норленд	Олімпія	Спартан	Рубель
Контроль	0,25±0,2	0,36±0,2	0,60±0,3	0,34±0,3	0,89±0,3
0,4	1,20±0,2	3,00±0,2	3,44±0,4	0,2±0,3	3,35±0,4
0,6	2,54±0,3	1,98±0,3	1,99±0,4	0,82±0,4	2,60±0,4
0,8	3,56±0,4	0,2±0,1	0,3±0,1	1,23±0,4	3,95±0,2
1,0	2,90±0,2	0,3±0,1	0,3±0,1	2,57±0,3	3,50±0,4

Для сортів Норленд і Олімпія максимальну висоту пагонів визначали на середовищі з 0,4 мг/л 2iP. Більша (0,6 мг/л) концентрація регулятора росту пригнічує ріст регенерантів на 35–40%. Для сортів Норленд і Олімпія вищі концентрації регулятора є токсичними: під дією 0,8–1,0 мг/л 2iP відмічено припинення росту пагонів, а при тривалому вирощуванні – побуріння експлантатів. Для сортів Еліот та Рубель концентрація 2iP 0,8 мг/л позитивно впливала на висоту пагонів та швидкість їх росту, тоді як Спартан мав найефективніший ріст за концентрації регулятора 1,0 мг/л (рис. 3.1).

Коефіцієнт розмноження (КР) — показник ефективності мікроклонального розмноження пагонів *in vitro*, який визначає кількість новоутворених пагонів. Встановлено, що величина КР досліджуваних сортів суттєво змінювалася залежно від концентрації 2iP у живильному середовищі. З підвищенням концентрації 2iP 0,4 до 0,8 мг/л коефіцієнт КР живильного середовища WPM збільшувався для сортів Рубель, Еліот та Спартан. Для сортів Еліот та Рубель регенераційна здатність була при максимальній концентрації 0,8 мг/л 2iP у живильному середовищі, а для Спартан – 1,0 мг/л. Результати аналізу КР *in vitro* сортів *V. corymbosum* L. наведені в таблиці 3.4.

Рис. 3.1. Рослини-регенеранти *Vaccinium corymbosum* L. сорту Спартан на живильному середовищі WPM 1,0 мг/л 2iP.

Таблиця 3.4.

Вплив різних концентрацій 2iP на коефіцієнт розмноження сортів
Vaccinium corymbosum L. *in vitro*

Концентрація 2iP, мг/л	Коефіцієнт розмноження сортів <i>Vaccinium corymbosum</i> L.				
	Еліот	Норленд	Олімпія	Спартан	Рубель
Контроль	0,4±0,2	0,4±0,2	1,0±0,3	0,2±0,3	2,2±0,3
0,4	2,2±0,2	2,0±0,2	4,2±0,4	0,2±0,3	3,6±0,4
0,6	3,6±0,3	1,0±0,3	2,0±0,4	1,0±0,4	3,0±0,4
0,8	5,8±0,4	0,2±0,1	0,3±0,1	1,2±0,4	5,0±0,2
1,0	4,0±0,2	0,3±0,1	0,3±0,1	2,2±0,3	5,0±0,4

На основі отриманих результатів встановлено, що для розмноження та розвитку пагонів сортів Норленд та Олімпія зворотна залежність на дозу стимулятора росту характерно: максимальна кількість КР зафіксована при найменшій концентрації 2iP у живильному середовищі — 0,4 мг/л, при збільшенні дози регулятора до 0,6 мг/л спостерігається помітне зниження

значення КР; концентрації 0,8 мг/л і 1,0 мг/л були інгібуючими для досліджуваних сортів.

Рис. 3.2. Культура *Vaccinium corymbosum* L. сорту Олімпія на WPM з концентрацією 0,4 мг/л 2iP.

Рис. 3.3. Культура *Vaccinium corymbosum* L. сорту Олімпія на WPM з концентрацією 0,6 мг/л 2iP.

Додавання до середовища 0,4 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК) призводило до появи великої кількості нових пагонів. Зокрема у регенерантів сортів Олімпія показник КР підвищувався до 2,0 (рис. 3.2), але сповільнювався ріст пагонів і з часом пагони побуріли. Під впливом гіберелінової кислоти (ГК) у тій же концентрації подовження пагонів посилювалося, але їх кількість не збільшувалася, коефіцієнт КР у цього сорту становив 1. Зеатин у концентрації 0,5 мг/л незначно стимулював розвиток бруньок, а підвищення концентрації гормону до 1 мг/л викликало інтенсивний калюсогенез, що пригнічувало ріст регенерантів.

Для ініціації росту бруньок сорту Еліот при 0,4 та 0,8 мг/л концентрації ІОК у живильному середовищі були неефективними, прискорення росту бруньок не отримано. Лише підвищення концентрації ІОК до 2,0 мг/л стимулювало ріст пагонів, але середнє значення РК не перевищувало 1. Вирощування довгих пагонів призводить до руйнування хлорофілу в листках. Пересадка етіолозованих пагонів на живильне середовище з більшою концентрацією 2iP (0,6 мг/л або 0,8 мг/л) сприяла відновленню хлорофілу та більш активному росту. Інтенсивний ріст калюсу ініціювало 1 мг/л зеатину, менша концентрація (0,5 мг/л) гормону прискорювала розростання бруньок і утворення пагонів, але подальшого їх росту, як і калюсогенезу, не спостерігалось.

Розмноження регенерантів сорту Норленд було складним і важкою була ідентифікація компонентів живильного середовища [25, 26]. Застосування 0,4 мг/л та 2,0 мг/л ІОК було неефективним для розвитку бруньок [27]. Вплив 0,8 мг/л ІОК покращував їх ріст, але зазвичай активно ріс один листок, а пагони не ставали довгими. Застосування 0,8 мг/л гіберелінової кислоти (ГК) стимулювало фазу натягу пагонів, але не впливало на швидкість їх розвитку – вони росли повільно і з часом побуріли. Додавання 0,5 мг/л зеатину стимулювало калюсогенез, а також появу сходів, але ріст їх був надто повільним. Можливо, більш високі концентрації (1,0–2,0 мг/л) зеатину, як вказують багато авторів [28–30], сприяли б збільшенню кількості

мікрівідростків і прискоренню їх морфогенезу, але дія гормону в таких концентраціях не досліджувалася. нами, тому що це занадто дорого та неекономічно.

Таким чином, результати досліджень показують, що ефективність різних фітогормонів та їх концентрації визначаються особливостями кожного генотипу сортів *V. corymbosum* L.

Узагальнення експериментальних даних дає підстави стверджувати, що для отримання регенерантів із помірною кількістю пагонів визначальної якості в культуральному середовищі WPM вирішальне значення має концентрація регулятора росту дії цитоцинінів 2iP. Підібрано оптимальні умови розмноження *in vitro* для 5 сортів лохини висококущової *V. corymbosum* L.

МИ продовжили роботу з підбору живильних середовищ для мікроклонального розноження лохини висококущової. З метою оптимізації складу живильного середовища для ефективного мікроклонального розмноження лохини висококущової, в нашій роботі ми використовували живильні середовища WPM (Lloyd, 1980), M-WPM (Rowland, 1992), для модифікації середовища WPM замість NH_4NO_3 додавали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, середовище позначили WPM1, для модифікації середовища M-WPM замість NH_4NO_3 додавали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, середовище позначили M-WPM1, для модифікації середовища M-WPM1 солі кальцію збільшили в 1,5 рази $(\text{CaNO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 924,4 мг/л.

Різний вміст солей амонію та нітратів в 5 живильних середовищах призвели до різної ефективності регенерації рослин лохини висококущової. На середовищі M-WPM спостерігали максимальну індукцію пагонів 60,4%, коефіцієнт розмноження був на рівні 2,0, довжина пагонів сягала 3,8 см, при цьому середня сира вага пагонів становила 290,5 мг, тоді як суха вага пагонів становила 38 мг. Найкращим середовищем для культивування виявилось WPM, на якому спостерігали найвищий відсоток регенерації пагонів та найбільшу кількість пагонів. На середовищі WPM1 порівняно з середовищем

WPM спостерігали більші показники сирій ваги пагонів, але одночасно відбувалося зменшення кількості пагонів на експлантат. Враховуючи загальні показники найкращим середовищем для індукції пагонів за введення в культуру *in vitro* (рис. 3.4-3.8).

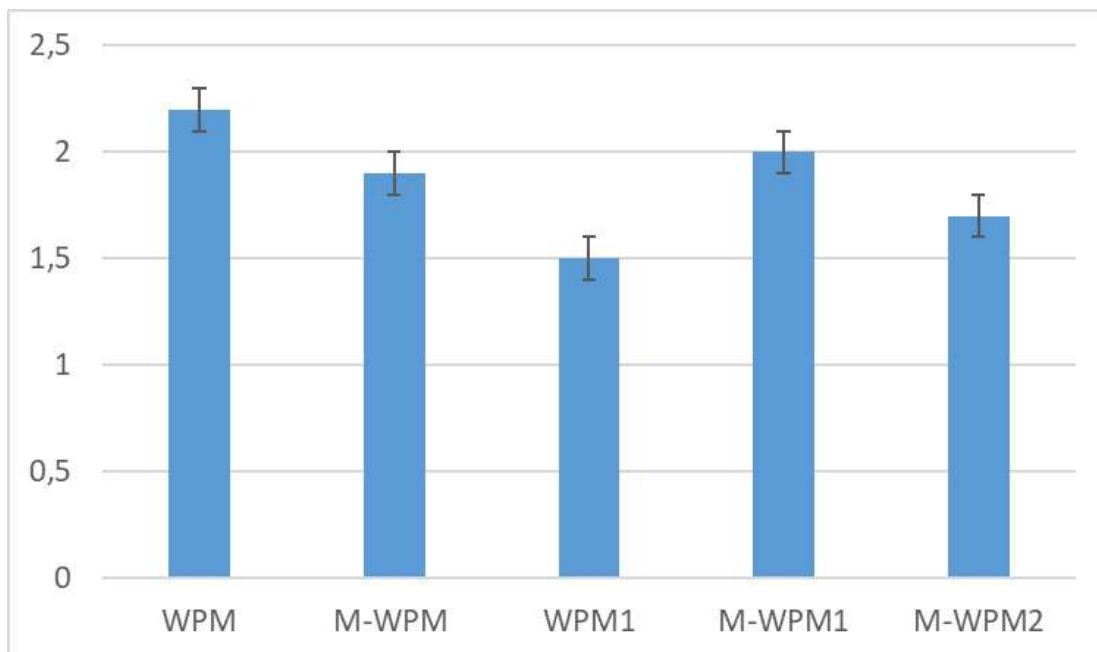


Рис. 3.4. Коефіцієнт розмноження лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на різних живильних середовищах.

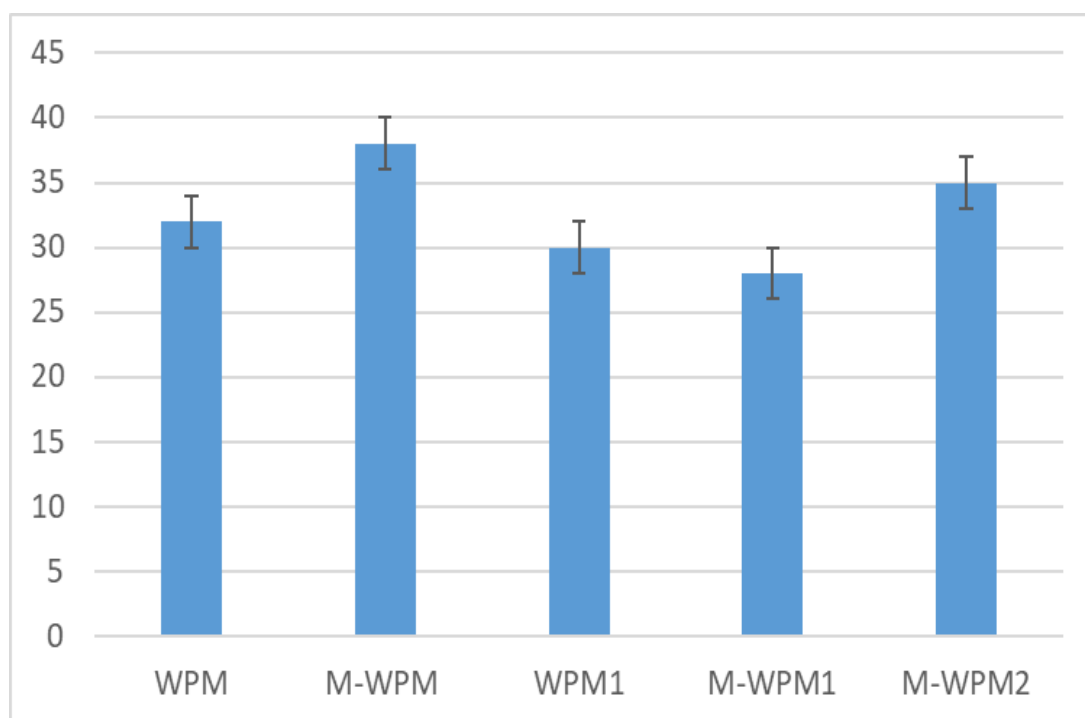


Рис. 3.5. Довжина пагонів (мм) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на різних живильних середовищах.

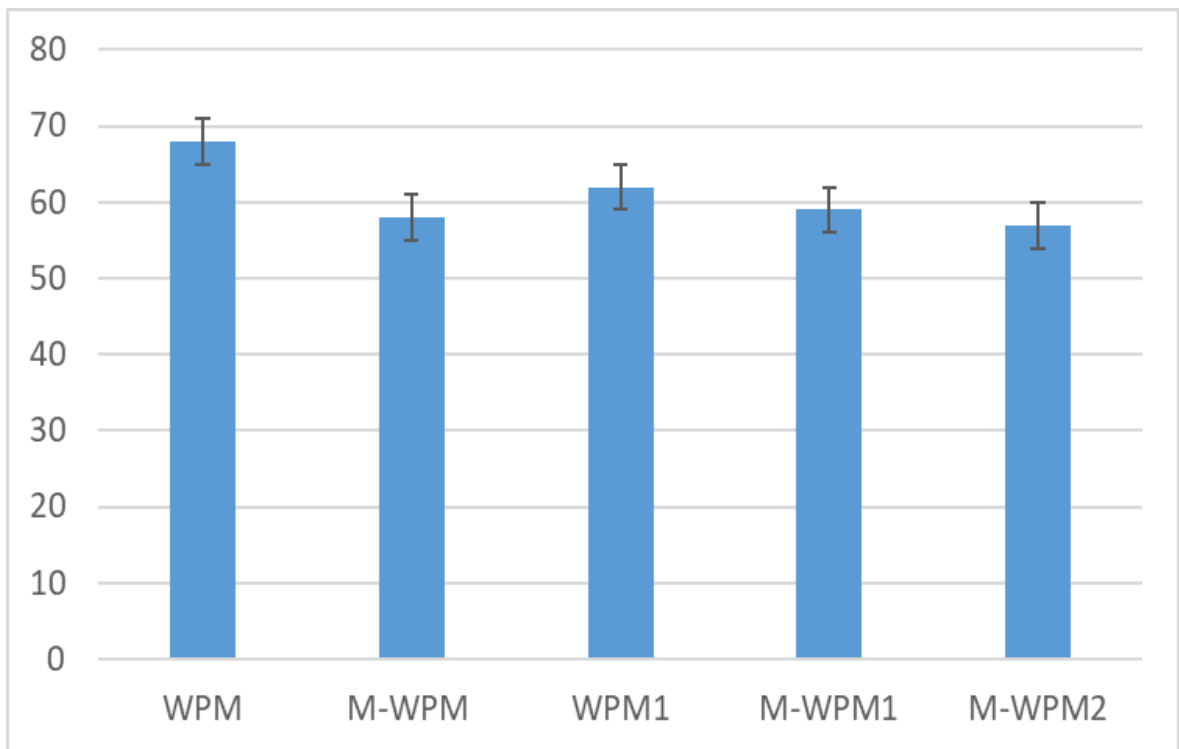


Рис. 3.6. Частота регенерації пагонів (%) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на різних живильних середовищах.

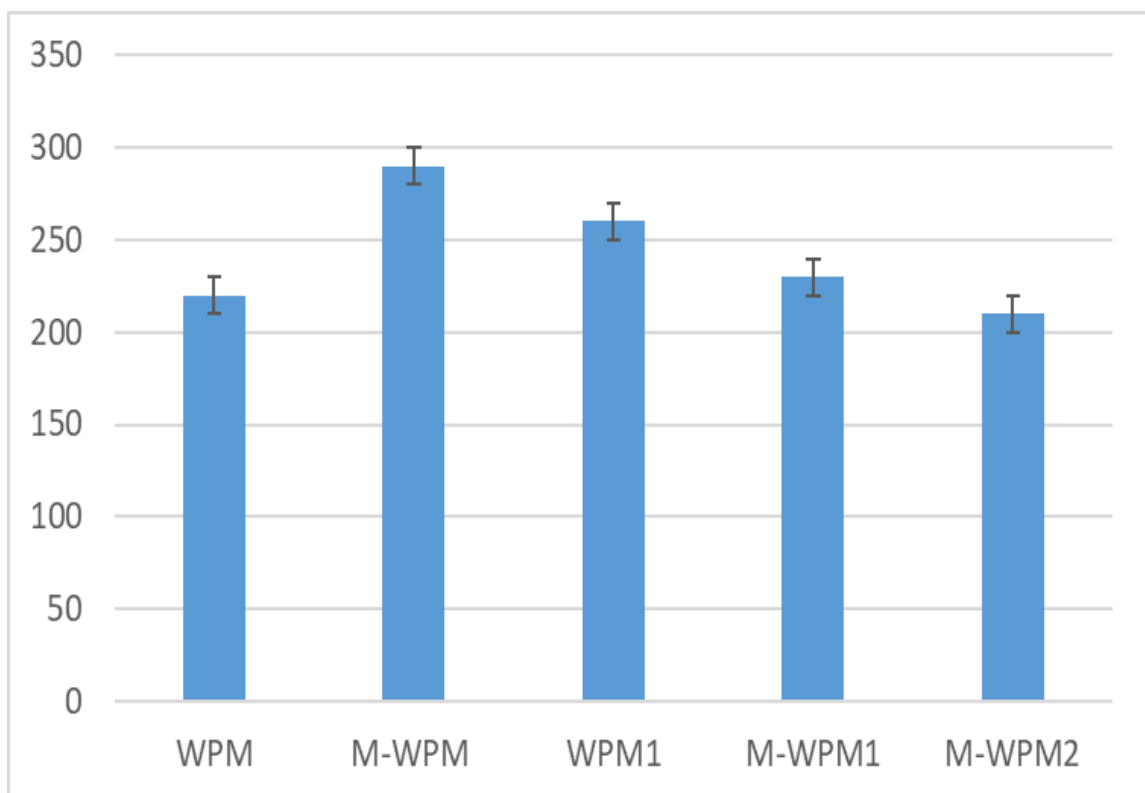


Рис. 3.7. Сира маса пагонів (мг) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на різних живильних середовищах.

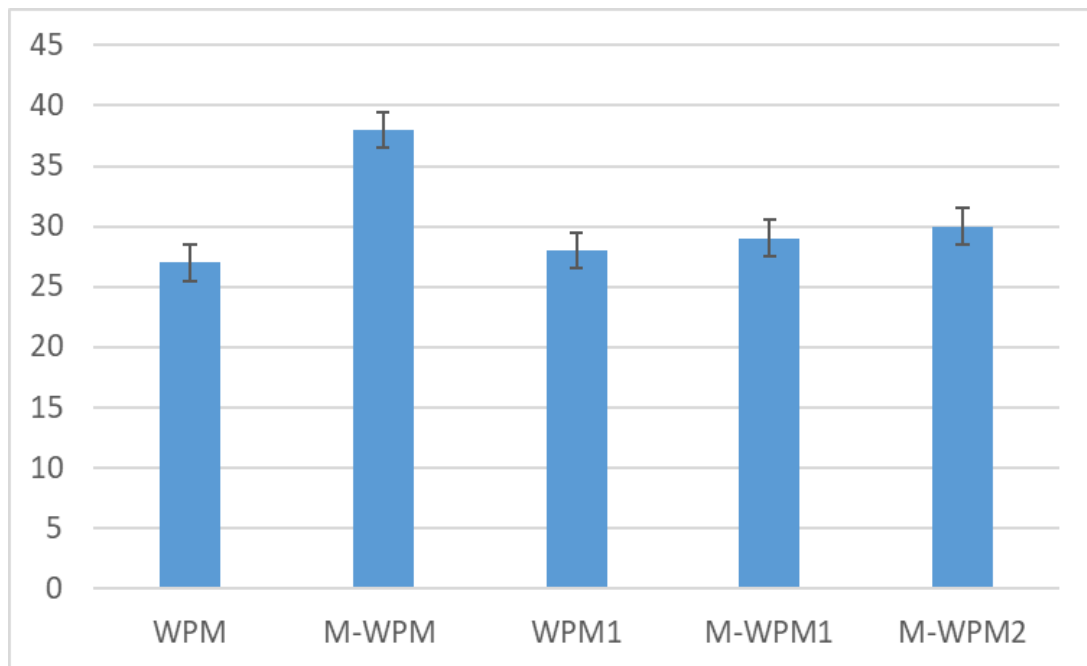


Рис. 3.8. Суха маса пагонів (мг) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на різних живильних середовищах.

3.2. Оптимізація мікроклонального розмноження *V. corymbosum* на середовищі mAN

Отримані результати показали, що модифіковане середовище mAN є більш придатним для розмноження *in vitro* відібраних сортів лохини висококущової, ніж середовище MS (табл. 3.4). Пагони, розмножені на MS, демонстрували нижчу швидкість розмноження та гірший ріст, ніж пагони на модифікованому середовищі mAN з таким самим гормональним складом. Дебнат (2009) також довів, що середовища з низькими іонними концентраціями підходять для культури *Vaccinium*. Для розмноження чорниці висококущової найчастіше використовують середовище mAN (Ostrolucka та ін., 2002, 2007; Гайдошова та ін., 2006) та середовище для деревних рослин – WPM (Reed and Adbelnour-Esquivel, 1991; Gonzalez et al., 2000; Чжан та ін., 2006). Середовище WPM виявилось більш придатним для мікророзмноження висококущових сортів чорниці «Спартан», «Bluecrop» і «Berkeley» порівняно із середовищем mAN та середовищем MS половинного складу (Sedlak and Paprstein, 2009). Навпаки, Tetsumura et al. (2008) показали,

що під час стадії розмноження пагони на середовищі WPM показали гірший ріст, ніж ті, що виростили на середовищі MS або суміші рівних частин середовищ MS і WPM.

Таблиця 3.4

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

Сорт	Середовище	Комбінація регуляторів росту, мг/л	Коефіцієнт розмноження	Довжина осьового пагону, см	Довжина бічних пагонів, см
Спартан	mAN	Зеа 0,5	2,0	1,8	0,7
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	2,0	2,1	0,9
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	1,7	2,0	1,4
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,0	1,5	0,5
	MS	Зеа 0,5	1,2	1,2	0,6
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	1,1	1,2	0,6
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	1,0	1,3	0,5
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,0	1,2	0,4
Норленд	mAN	Зеа 0,5	2,0	1,5	1,0
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	2,3	1,4	0,7
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	1,4	2,0	1,1
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,0	1,5	0,5
	MS	Зеа 0,5	1,6	1,0	0,7
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	1,5	1,1	0,7
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	1,1	1,2	0,6
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,0	1,1	0,4
Олімпія	mAN	Зеа 0,5	2,1	1,5	0,7
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	2,0	2,1	1,0
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	2,2	2,2	1,2
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,5	2,0	1,0

	MS	Зеа 0,5	1,8	1,5	0,8
		Зеа 0,5 + ІМК 0,1	1,3	1,3	0,6
		Зеа 0,5 + ІМК 0,2	1,0	1,3	0,4
		Зеа 0,5 + ІМК 0,5	1,0	1,1	0,2

Пагони на середовищі MS у їхньому експерименті росли добре, але мали тенденцію до гіпергідричності, ймовірно, через високу концентрацію іонів амонію в цьому середовищі (Tetsumura et al., 2008). Незважаючи на те, що в цьому експерименті не спостерігалось жодних симптомів гіперрегідності, частковий або повний некроз стебел і листя був виявлений на середовищах MS і був більш вираженим на тих, що містять зеатин у поєднанні зі збільшенням концентрації ІМК. Найвищий відсоток некротичних пагонів (80%) був помічений у сорту Олімпія на середовищі MS, що містило 0,1 та 0,5 мг/л ІМК у поєднанні з 0,5 мг/л зеатину. Крім того, вищі концентрації ІМК в середовищі MS повністю пригнічували розмноження пагонів і значно зменшували довжину осьових і бічних пагонів у всіх сортів (табл. 3.4). Життєздатні пагони були жовтуватого-зеленого кольору з появою червоного забарвлення вздовж країв листків і стебел бічних пагонів. Хоча Tetsumura та ін. (2008), пов'язуючи червоні пагони у сортів чорниці, вирощених на середовищі WPM, із дефіцитом азоту, ми спостерігали ідентичні симптоми на пагонах, вирощених на середовищі MS, яке містить у чотири рази більше азоту, ніж WPM. Пагони лохини на модифікованому mAN у нашому експерименті також показали червоне забарвлення, але воно було менш вираженим, особливо у сорту «Goldtraube».

Модифіковане середовище mAN переважало показники розмноження пагонів, видовження та якості пагонів у всіх сортів. Достовірні відмінності в параметрах розмноження спостерігалися також серед середовищ з різним гормональним складом (табл. 3.4). Що стосується сортів Спартан і Норленд, середовище, що містить зеатин у поєднанні з 0,1 мг/л ІМК, давало вищу швидкість розмноження пагонів, ніж середовище для розмноження лише з

зеатином. Розмножувальна здатність «Goldtraube» на середовищах, що містять зеатин у поєднанні з 0,1 та 1 мг/л ІМК, була подібною до тієї, що отримана на середовищі лише з зеатином. Крім того, додаючи 0,1 та 1 мг/л ІМК значно збільшував довжину осьових пагонів у всіх сортів. Така ж тенденція спостерігалася і в довжині бічних пагонів. ІМК доповнено на 1,16 мг/л значно посилювало подовження пазушних пагонів лохини висококущової *Vaccinium × covilleianum* But. et PI 'Herbert' (Літвінчук та Вадас, 2008).

Ці результати свідчать про те, що середовище mAN, що містить зеатин у кількості 0,5 мг/л у поєднанні з низькою концентрацією ІМК, можна успішно використовувати для мікророзмноження трьох сортів лохини висококущової. Численні дослідження показали, що зеатин є важливим регулятором росту рослин для ефективного розмноження та росту *Vaccinium* spp. Було виявлено, що зеатин є більш ефективним, ніж інші цитокініни (наприклад, 2iP), для ініціації пагонів у восьми з дванадцяти генотипів *Vaccinium* (Reed and Abdelnour-Esquivel, 2001), а також для проліферації пазушних пагонів і випадкової регенерації лохини висококущової (Gajdošova et al., 2006) та брусниці (*V. vitis-idea*) (Debnath and McRae, 2001). Незважаючи на те, що дуже висока концентрація зеатину (10-20 мг/л) була визнана найбільш ефективною для проліферації пагонів лохини висококущової (Escher and Noe, 2009), Gajdošova et al. (2006) вказали на ефективність зеатину в низькій концентрації (0,5 мг/л) для індукції формування множинних пагонів у меристемних культурах *Vaccinium* spp. Крім того, низькі концентрації зеатину (0,2-1,3 мг/л) були успішно застосовані для розробки ефективного протоколу клонування журавлини (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), який забезпечує проліферацію пагонів і укорінення за один етап (Debnath, 2008). Проте вплив різних ауксинів на розмноження пагонів *Vaccinium* spp. приділялося менше уваги. Гонсалес та ін. (2000) виявили, що додавання ІОК у концентрації 0,65 мг/л у середовище, доповнене 2iP, суттєво

не вплинуло на розмноження та подовження пагонів лохини висококущової «Berkeley».

З іншого боку, Litwinczuk і Wadas (2008) виявили, що ІМК у поєднанні з цитокініном може сприяти мікророзмноженню лохини високої кущової «Герберта» шляхом розмноження пазушних пагонів, що відповідає нашим результатам.

Результати укорінення *in vitro* наведені в таблиці 3.5. Укорінюваність пагонів у випробовуваних сортів лохини сильно відрізнялася. Модифіковане середовище AN з додаванням 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активованого вугілля було найефективнішим для індукції коренів у сорту Олімпія. Ступінь укорінення у цього сорту (79,6 %) разом з більшістю інших параметрів укорінюваності був значно вищим, ніж у сортів Спартан та Норленд – 8 та 37,0 % відповідно. В усіх сортів ІМК сприяв розвитку коренів безпосередньо з прикореневої частини пагонів, без утворення калюсу. Sedlak і Paprstein (2009) повідомили про подібний вплив цього ауксину на пряму індукцію коренів, але набагато вищі показники укорінення у «Berkeley» і «Bluescop» на середовищі WPM з додаванням 1 мг/л ІМК.

Таблиця 3.5.

Параметри укорінення різних сортів лохини на модифікованому середовищі AN з додаванням 0,8 мг/л ІМК та 4 г/л активованого вугілля

Сорт	% вкорінення	Середнє число коренів на пагін	Середня довжина коренів (см)	Середня висота вкорінених пагонів (см)
Спартан	12	0,8	1,0	2,1
Норленд	37	1,1	0,8	2,6
Олімпія	80	2,4	0,8	2,1

Акліматизацію спостерігали протягом двох тижнів після перенесення як укорінених, так і неукорінених рослин *in vitro* в умови *ex vitro*. Що

стосується вкорінених пагонів, то найвищий рівень акліматизації був у сорту Олімпія (89,6%), а найнижчий у сорту Спартан (64,5%). Така тенденція спостерігалася при акліматизації некорінених пагонів, хоча темпи акліматизації були значно нижчими, особливо для сортів Норленд і Олімпія.

3.3. Вплив різних субстратів на укорінення пагонів лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. ex vitro

Для укорінення ex vitro використовували 6 варіантів субстратів, які містили торф, перліт, мох сфагнум, вермикуліт. Найвищий відсоток укорінення до 88,4% спостерігали на субстратах перліт, торф:перліт 2:1, перліт:торф:вермикуліт 3:3:1. На субстраті мох сфагнум спостерігали найвищу кількість коренів (16,5), що значно перевищувало показники за використання інших досліджуваних субстратів.

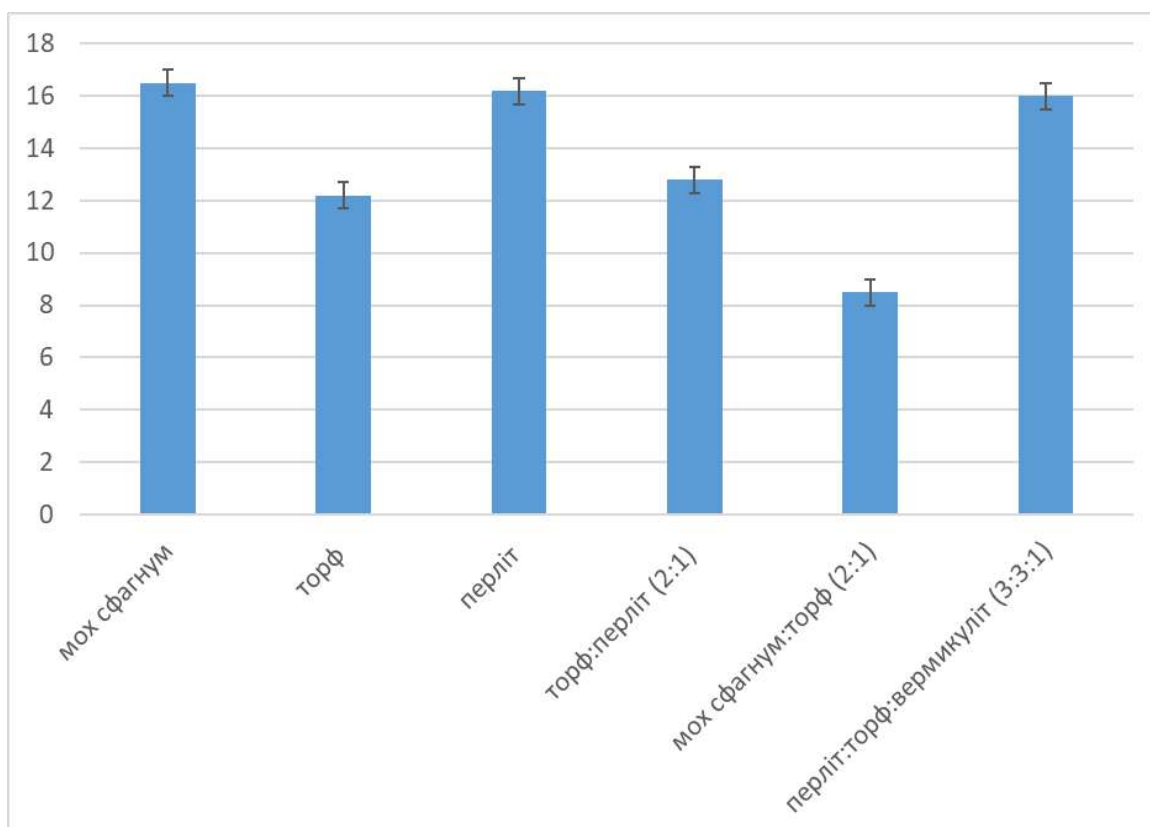


Рис. 3.9. Кількість коренів на пагін лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на досліджуваних субстратах.

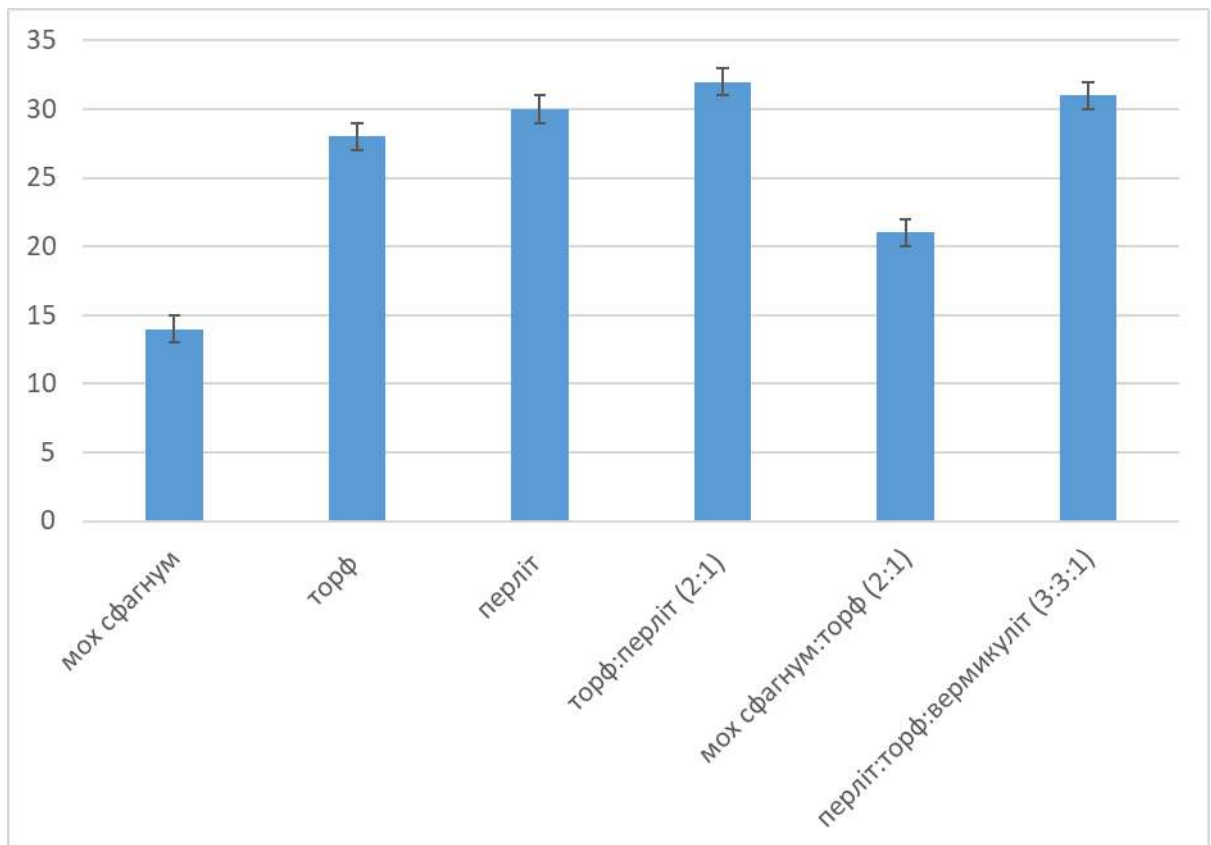


Рис. 3.9. Довжина коренів (мм) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на досліджуваних субстратах.

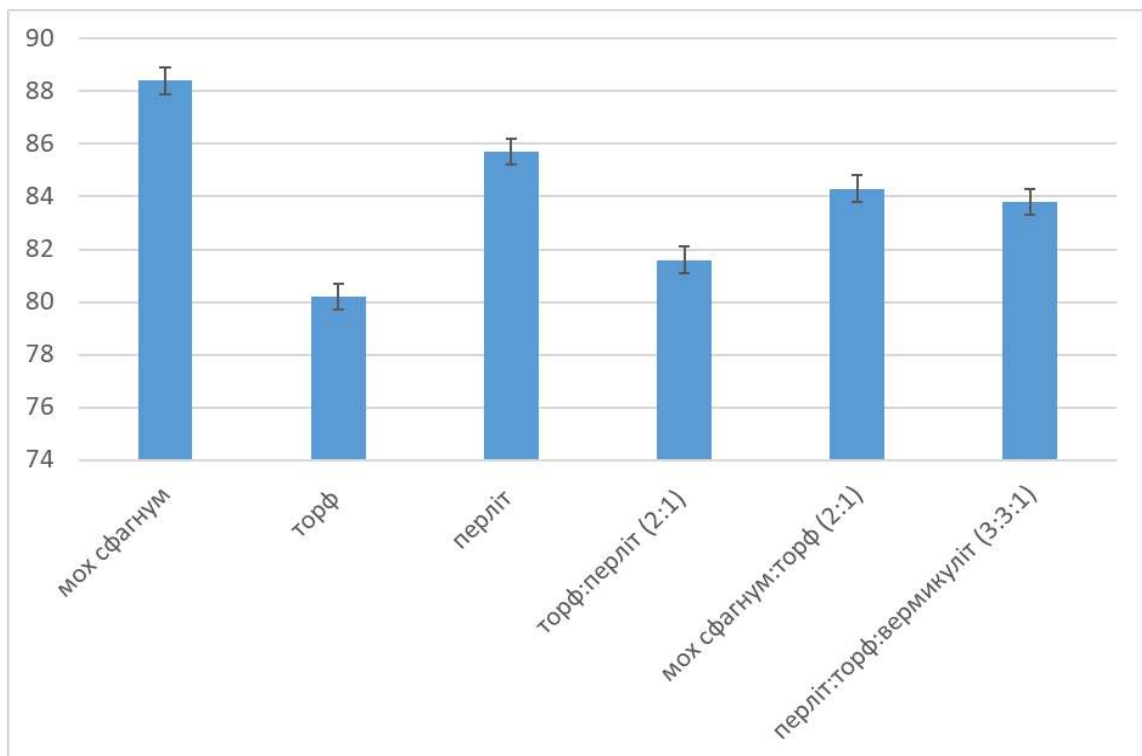


Рис. 3.10. Частота укорінення пагонів (%) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на досліджуваних субстратах.

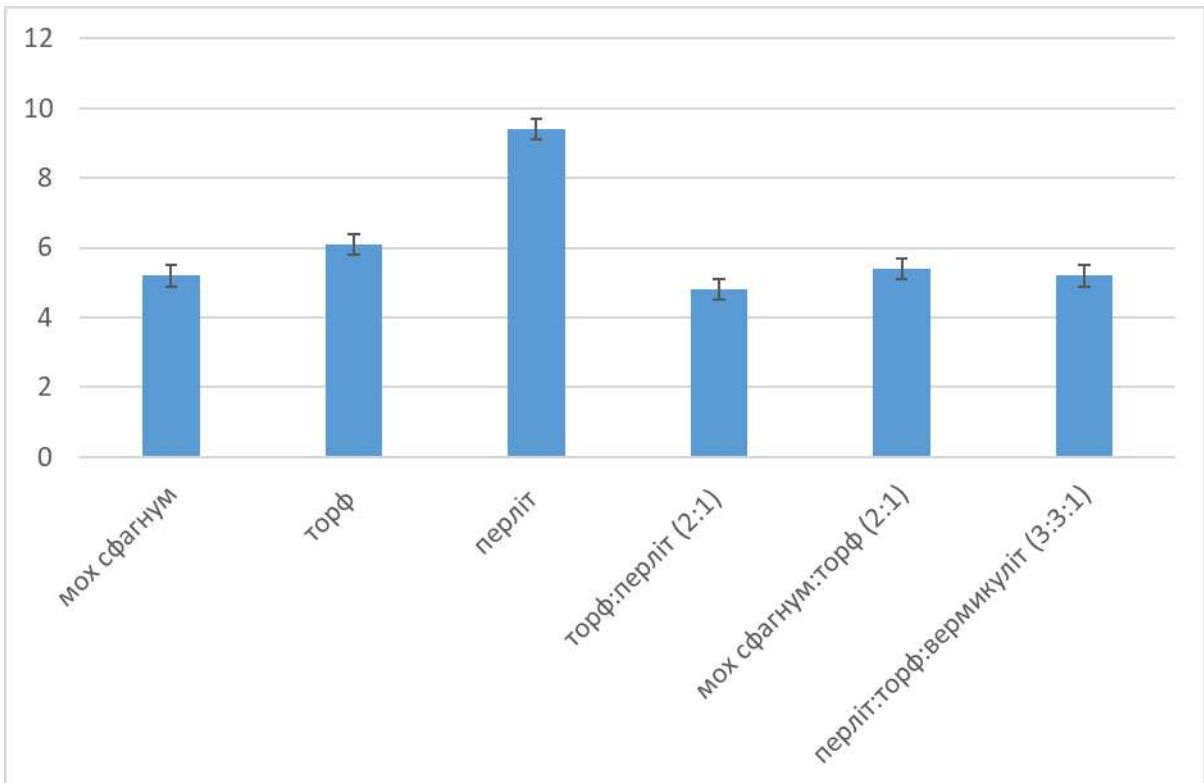


Рис. 3.11. Сира маса коренів (мг) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на досліджуваних субстратах.

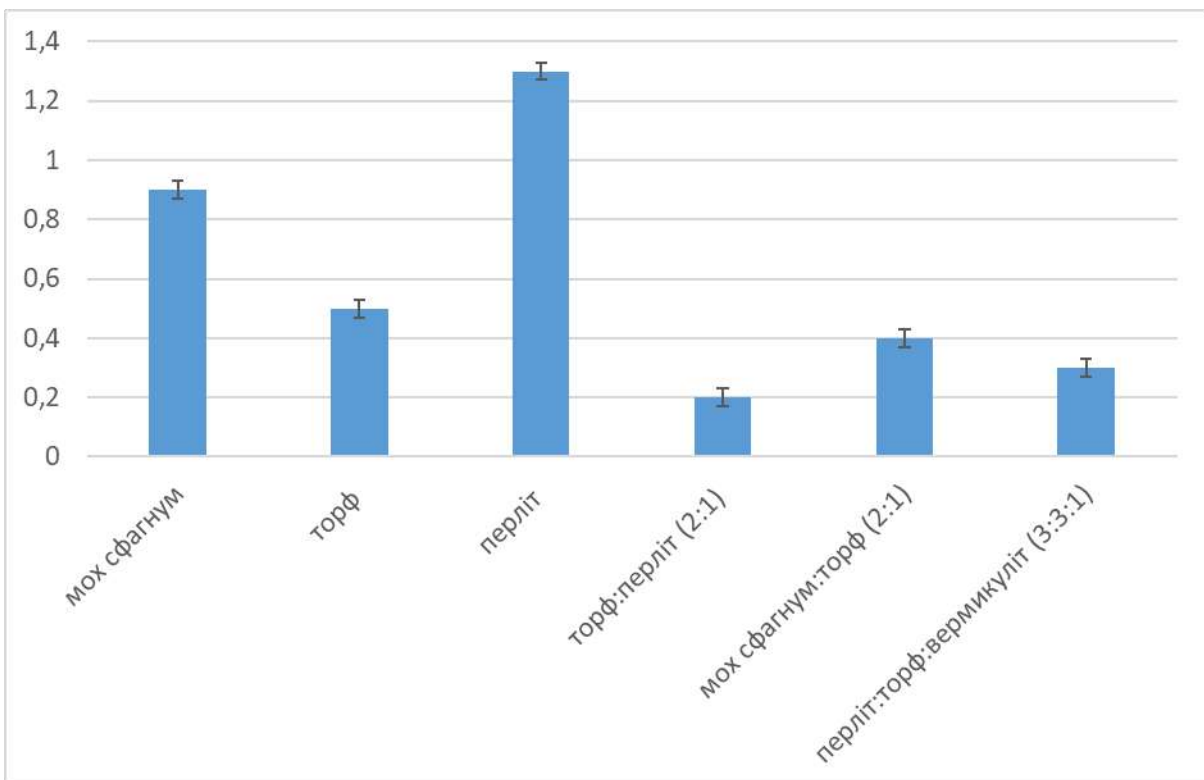


Рис. 3.12. Суша маса (мг) лохини висококущової *Vaccinium corymbosum* L. на досліджуваних субстратах.

На субстраті торф:перліт 2:1 відмічено найвищий показник середньої довжини кореня, ніж на інших субстратах. Такі показники як сира маса і суха маса коренів були найвищими за використання в якості субстрату перліту. Взагалі на субстраті перліт зафіксовано найкращі показники росту з оптимальним відсотком укорінення 85,7%, сира маса коренів 9,4 мг і суха маса коренів 1,3 мг (рис. 3.9-3.12).

Подібні дослідження проводили в роботі Kreen S. та ін., зокрема мікропагони та живці стебла м'якої деревини п'яти сортів клематисів (*Clematis section Atragene*) укорінювали в різних субстратах (перлітовому, торфоперлітовому та піщаноперлітовому). Мікропагони вкорінюються краще і швидше ніж стеблові живці незалежно від субстрату. Суха маса коренів мікропагонів була більш ніж удвічі більшою порівняно з сухою масою коренів стеблових живців. Для мікропагонів кількість первинних коренів була найбільшою в піщано-перлітовому та чистому перліті. Однак продовження зростання призвело до найвищої загальної довжини коренів, кількості кінчиків коренів і кількості розгалужень у торфі-перліті. Мікропагони отримали найбільший середній діаметр кореня в чистому перліті. Не було різниці в сухій масі коренів мікропагонів серед субстратів. Для стеблових живців відсоток укорінення та швидкість укорінення були вищими в чистому перліті (71%) і нижчими в торфоперлітовому (36%). Кількість первинних коренів і суха маса коренів стеблових живців були найбільшими в піщано-перлітовому та чистому перліті.

ВИСНОВКИ

1. Підбрано оптимальні умови стерилізації поверхні експлантатів залежно від їх виду та ефективності застосовуваних дезінфікуючих засобів. Максимальну кількість життєздатних стерильних регенератів одержали за допомогою суміші стерилізуючих розчинів спирту та розчину «Білізна» з Твіном.

2. Найвищий відсоток індукції пагонів спостерігався за стерилізації етанолом 60 с і гіпохлоридом натрію 10 хв.

3. Оцінено регенераційну активність експлантатів і коефіцієнт розмноження пагонів на середовищі WPM (Woody Plant Medium) з додаванням регуляторів росту групи цитокінінів 6-БАП, диметилаліламінопурину (2iP). Результати дослідів показали, що ефективність дії фітогормонів та їх концентрації залежать від властивостей генотипу кожного сорту *V. corymbosum* L.

4. На стадії введення в культуру *in vitro* лохини висококущової рекомендовано використовувати середовище WPM1, до складу якого замість NH_4NO_3 додавали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5. Встановлено, що ростова активність і розмноження пагонів змінювалися залежно від концентрації в живильному середовищі 2iP. Максимальні значення коефіцієнта розмноження сортів Норленд і Олімпія і висоту пагонів спостерігали на середовищі з 0,4 мг/л 2iP.

6. Для Еліот та Рубель регенераційна здатність була найвищою з концентрацією 0,8 мг/л 2iP та для Спартан 1,0 мг/л 2iP.

7. Низька концентрація ІМК (≤ 1 мг/л), додана в середовище AN, доповненому зеатином, підвищує ефективність розмноження пагонів лохини висококущової *in vitro*.

8. Найкращим субстратом пагонів для укорінення *ex vitro* був перліт, зафіксовано найкращі показники росту з оптимальним відсотком укорінення 88,4%, сира маса коренів 9,4 мг і суха маса коренів 1,3 мг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kunakh V. A. Plant biotechnology for human life improvement. *Biotehknolohiia*. 2008, 1 (1), 28–39.
2. Mel'nychuk M. D., Novak T. V., Kunakh V. A. *Plants biotechnology*. Kyiv: Polihraf — Konsal'tynh. 2003, 520 p.
3. Banados M. P. Blueberry Production in South America. *Acta Horticulturae: Proceedings of the 8th International Symposium on Vaccinium Culture*, May 3–8, 2004. Sevilla, Spain. 2006, N 715, P. 165–172. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.715.24.
4. Strik B. Blueberry Production and Research Trends in North America. *Acta Horticulturae: Proceedings of the 8th International Symposium on Vaccinium Culture*, May 3–8, 2004. Sevilla, Spain. 2006, N 715, P. 173–183. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.715.25.
5. Debnath S. C. Strategies to propagate *Vaccinium* nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Canad. J. Plant Sci.* 2007, N 87, P. 911–922.
6. Zmarlicki K. Production and marketing of blueberries in Europe, USA and in Canada. *International Conference on Blueberry and cranberry growing (with ecological aspects)*, 19–22 June, 2006. Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland. 2006, P. 181–186.
7. Reshetnikov V. N., Kilchevskii A. V., Rupasova Zh. A., Filipenia V. L., Chizhik O. V., Gorbatshevich V. I., Ivanovich A. A. Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Genetic basics of plant selection. *Sci. ed. A. V. Kilchevskii, L. V. Khotyleva*. Minsk. 2012, *Biotechnology in plant selection. Cellular engineering*. V. 3, P. 347–355.
8. Reshetnikov V. N., Spiridovich E. V., Nosov A. M. Plant biotechnology and perspectives of its development. *Genetics and Plant Physiology*. 2014, 46 (1), 3–18.
9. Litwinczuk W., Szczerba G., Wrona D. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Herbert propagated by cuttings and tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 2005, V. 106, P. 162–169.

10. Noe N., Eccher T., Del Signore E., Montoldi A. Growth and proliferation in vitro of *Vaccinium corymbosum* L. under different irradiance and radiation spectral composition. *Biologia Plantarum*. 1998, 41 (2), 161–167.
11. Ostrolucka M. G., Libiakova G., Ondruskova E., Gajdosova A. In vitro propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis*. 2004, V. 676, P. 207–212.
12. Tetsumura T., Matsumoto Y., Sato M., Honsho C., Yamashita K., Komatsu H., Sugimoto Y., Kunitake H. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2008, V. 119, P. 72–74.
13. Kyte L., Kleyn J. *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 1996, 240 p.
14. Lakyn H. F. *Biometrics: A manual for biological specialities of universities*. Moskwa: Vysshaya shkola. 1990, 352 p.
15. Kushnir H. P., Sarnats'ka V. V. *Microclonal plant propagation. Theory and Practice*. Kyiv: Naukova dumka. 2005, 272 p.
16. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of International Plant Propag. Soc.* 1981, V. 30, P. 421–427.
17. Orlikowska T. Micropropagation of highbush blueberry. *Fruit Sci. Rep.* 1986, 13 (3), 105–115.
18. Gajdosova A., Ostrolucka M. G., Libiakova G., Ondruskova E., Simala D. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 2006, V. 14, P. 103–118.
19. Gonzales M. V., Lopez M., Valdes A. E., Ordas R. J. Micropropagation of three berry species using nodal segments of field – grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 2000, V. 137, P. 73–78.
20. Litwinczuk W. Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation. *Meth. Mol. Biol.* 2013, V. 11013, P. 63–76.

21. Jiang Y., Yu H., Zhang D., He S., Wang Ch. Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of Brightwell and Choice blueberries in vitro. *Acta Horticulturae*. 2009, V. 810, P. 581–586.
22. Litwinczuk W., Wadas. Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium x civileanum* But. et Pl.) Herbert in vitro shoot cultures. *Scientia Horticulturae* . 2008, V. 119, P. 41–48.
23. Cao X., Hammercshlag F. A. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *Hort. Sci.* 2000, 35 (5), 945–947.
24. Genetic basics of plant selection. In 4 vol. V. 3. Biotechnology in plant selection. Cellular engineering. Sci. ed. A. V. Kilchevskii, L. V. Khotyleva. Minsk: Belarus. Navuka. 2012, 489 p.
25. S molarz K., Chlebowska D. Growth vigour and yielding of highbush blueberry cv. Bluecrop propagated from semi-woody cuttings and in vitro. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 1997, V. 2, P. 53–60.
26. Cao X., Hammerschlag F. A. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. *HortScience*. 2002, 37 (5), 819–821.
27. Litwińczuk W. Propagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in vitro. Effect of micropropagation on growth and fruiting bushes. *Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów*. 2007, 108 p.
28. Chandler C. K., Draper A. D. Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three blueberry clones in vitro. *HortScience*. 1986, V. 21, P. 1065–1066.
29. Reed B. M., Abdelnour A. E. The use of Zeatin to Initiate in vitro cultures of *Vaccinium* Species and Cultivars. *HortScience*. 1991, V. 26, P. 1320–1322.
30. Debnath S. C. Zeatin-induced one-step in vitro cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) micropropagules over stem cuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008, V. 93, P. 231–240.

31. Goyali, J.C.; Igamberdiev, A.U.; Debnath, S.C. Propagation methods affect fruit morphology and antioxidant properties but maintain clonal fidelity in lowbush blueberry. *HortScience* 2015, *50*, 888–896.
32. Grace, M.H.; Esposito, D.; Dunlap, K.L.; Lila, M.A. Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity, and anti-inflammatory bioactivity in wild Alaskan and commercial *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.* 2014, *62*, 4007–4017.
33. Vyas, P.; Debnath, S.C.; Igamberdiev, A.U. Metabolism of glutathione and ascorbate in lingonberry cultivars during in vitro and ex vitro propagation. *Biol. Plant.* 2013, *57*, 603–612.
34. Drózdź, P.; Šežienė, V.; Pyrzynska, K. Phytochemical properties and antioxidant activities of extracts from wild blueberries and lingonberries. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2017, *72*, 360–364.
35. Debnath, S.C.; An, D. Antioxidant properties and structured biodiversity in a diverse set of wild cranberry clones. *Heliyon* 2019, *5*, e01493.
36. Blumberg, J.B.; Camesano, T.A.; Cassidy, A.; Kris-Etherton, P.; Howell, A.; Manach, C.; Ostertag, L.M.; Sies, H.; Skulas-Ray, A.; Vita, J.A. Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Adv. Nutr.* 2013, *4*, 618–632.
37. Häkkinen, S.H.; Törrönen, A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* 2000, *33*, 517–524.
38. Strik, B. Blueberry: An expanding world berry crop. *Chronica Hort.* 2005, *45*, 7–12.
39. Strik, B.C.; Yarborough, D. Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth. *HortTechnology* 2005, *15*, 391–398.
40. Agriculture and Agri-Food Canada. Statistical overview of the Canadian fruit industry 2018. Available online: http://www.agr.gc.ca/horticulture_e (accessed on 29 July 2019).

41. USDA. *Noncitrus Fruits and Nuts 2018 Summary*; USDA: Washington, DC, USA, 2019; pp. 90–91.
42. Hall, I.V. Genetic improvement of the lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*. *Can. J. Plant. Sci.* 1983, *63*, 1091–1092.
43. Yarborough, D.E. Establishment and management of the cultivated lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). *Int. J. Fruit Sci.* 2012, *12*, 14–22.
44. Wetzel, S.; Duchesne, L.C.; Laporte, M.F. *Bioproducts from Canada's Forests: New Partnerships in the Bioeconomy.*, 1st ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2006; pp. 89–112.
45. Debnath, S.C. Strategies to propagate *Vaccinium* nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Can. J. Plant. Sci.* 2007, *87*, 911–922.
46. Debnath, S.C. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation—A review. *Can. J. Plant. Sci.* 2011, *91*, 147–157.
47. Debnath, S.C.; McRae, K.B. An efficient in vitro shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2001, *37*, 243–249.
48. Morrison, S.; Smagula, J.M.; Litten, W. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 2000, *35*, 738–741.
49. Bomser, J.L.; Madhavi, D.A.L.; Singletary, K.A.L.; Smith, M.A.L. In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med.* 1996, *62*, 212–216.
50. Madhavi, D.L.; Bomser, J.; Smith, M.A.L.; Singletary, K. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. *Plant Sci.* 1998, *131*, 95–103.
51. Yi, W.; Fischer, J.; Krewer, G.; Akoh, C.C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 2005, *53*, 7320–7329.

52. Faria, A.; Oliveira, J.; Neves, P.; Gameiro, P.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V.; Mateus, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6896–6902.

53. Skupień, K.; Oszmiański, J.; Kostrzewa-Nowak, D.; Tarasiuk, J. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Lett.* 2006, 236, 282–291.

54. Yi, W.; Akoh, C.C.; Fischer, J.; Krewer, G. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food Res. Int.* 2006, 39, 628–638.

55. Matchett, M.D.; MacKinnon, S.L.; Sweeney, M.I.; Gottschall-Pass, K.; Hurta, R.A.R. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. *Biochem. Cell Biol.* 2005, 83, 637–643.

56. Schmidt, B.M.; Erdman Jr, J.W.; Lila, M.A. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2006, 231, 240–246.

57. Schmidt, B.M.; Howell, A.B.; McEniry, B.; Knight, C.T.; Seigler, D.; Erdman Jr, J.W.; Lila, M.A. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6433–6442.

58. Basu, A.; Du, M.; Leyva, M.; Sanchez, K.; Betts, N.; Wu, M.; Aston, C.; Lyons, J. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome 1-3. *J. Nutr.* 2010, 140, 1582–1587.

59. Shukitt-Hale, B.; Carey, A.N.; Jenkins, D.; Rabin, B.M.; Joseph, J.A. Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiol. Aging* 2007, 28, 1187–1194.

60. Johnson, S.A.; Figueroa, A.; Navaei, N.; Wong, A.; Kalfon, R.; Ormsbee, L.T.; Feresin, R.G.; Elam, M.L.; Hooshmand, S.; Payton, M.E.; et al. Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: A randomized,

double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2015, *115*, 369–377.

61. Kang, B.; Racicot, K.; Pilkenton, S.; Apostolidis, E. In-vitro evaluation of bioactive fractions of blueberry extract for phenolic-mediated inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2016, *9*, 33–38.

62. Zhong, Y.; Wang, Y.; Guo, J.; Chu, H.; Gao, Y.; Pang, L. Blueberry improves the therapeutic effect of etanercept on patients with juvenile idiopathic arthritis: Phase III study. *Tohoku J. Exp. Med.* 2015, *237*, 183–191.

63. Du, C.; Smith, A.; Avalos, M.; South, S.; Crabtree, K.; Wang, W.; Kwon, Y.-H.; Vijayagopal, P.; Juma, S. Blueberries improve pain, gait performance, and inflammation in individuals with symptomatic knee osteoarthritis. *Nutrients* 2019, *11*, 290.

64. Liu, Y.; Tan, D.; Tong, C.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Liu, X.; Gao, Y.; Hou, M. Blueberry anthocyanins ameliorate radiation-induced lung injury through the protein kinase RNA-activated pathway. *Chem. Biol. Interact.* 2015, *242*, 363–371.

65. Pervin, M.; Hasnat, M.A.; Lim, B.O. Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2013, *3*, 444–453.

66. Takeshita, M.; Ishida, Y.I.; Akamatsu, E.; Ohmori, Y.; Sudoh, M.; Oto, H.; Tsubouchi, H.; Kataoka, H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 21165–21176.

67. Papandreou, M.A.; Dimakopoulou, A.; Linardaki, Z.I.; Cordopatis, P.; Klimis-Zacas, D.; Margarity, M.; Lamari, F.N. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behav. Brain Res.* 2009, *198*, 352–358.

68. Wang, Y.; Zhang, X.; Jiang, Z.; Yang, X.; Liu, X.; Ou, X.; Su, W.; Chen, R. Establishment and Optimization of Micropropagation System for Southern Highbush Blueberry. *Horticulturae* 2023, *9*, 893.

69. Sedlak, J.; Paprstein, F. In Vitro Multiplication of Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Cultivars. *Acta Hortic.* 2009, 810, 575–580.
70. Kreen, S.; Svensson, M.; Rumpunen, K. Rooting of Clematis Microshoots and Stem Cuttings in Different Substrates. *Sci. Hortic.* 2002, 96, 351–357.
71. Pacholczak, A.; Nowakowska, K. The Ex Vitro Rooting of Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Microcuttings. *Folia Hortic.* 2015, 27, 145–150.