

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології і біотехнологій

**КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ЯК ТЕСТ-СИСТЕМА В ДОСЛІДЖЕННІ
БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

Допущена до захисту

«__» _____ 2025 р.

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

молекулярної біології

та біотехнологій

Масалиги Олени Вікторівни

Завідувач кафедри Божков Анатолій Іванович

Науковий керівник: Авксентьєва

Ольга Олександрівна

Оцінка «_____»

«__» _____ 2025 р.

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Робота викладена на 111 сторінках, містить 18 таблиць, 18 рисунків, 4 додатки. Список використаної літератури містить 78 джерел, з них 54 – іноземні.

Роботу було виконано на базі лабораторії «Морфогенез вищих рослин *in vitro*» кафедри молекулярної біології та біотехнологій Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Метою даної роботи було дослідження впливу препарату молозива (постказеїнова фракція) на ростову реакцію і біосинтетичну активність калюсної та суспензійної культур *Pisum sativum* L., що виступають у якості тест-системи для біологічно активних речовин. Об'єктами дослідження були калюсна та суспензійна культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, які культивували на поживному середовищі з додаванням різних концентрацій препарату молозива (постказеїнова фракція). У роботі використовувалися біотехнологічні, цитологічні, біохімічні, статистичні методи. В рамках роботи було проведено дослідження ростової реакції та біосинтетичної активності калюсної та суспензійної культури *Pisum sativum* L., яка культивувалась на середовищі з додаванням препарату молозива у різних концентраціях (0, 0,1, 1 та 10 мг/л). Проаналізовано показники ростової реакції та біохімічної активності культур. Розглянуто використання культури рослинних клітин *in vitro* у якості тест-об'єкта біологічно активних речовин. Було встановлено, що суспензійна культура *Pisum sativum* L. може бути використана як тест-об'єкт для дослідження біологічно активних сполук завдяки її чутливості до цього компоненту середовища. Також було визначено, що певні концентрації препарату молозива чинять стимулюючий ефект на суспензійну і калюсну культури *Pisum sativum* L.

Ключові слова: калюсна культура, суспензійна культура, молозиво, тест-об'єкт, біостимулятор.

ABSTRACT

The work includes 111 pages, 18 tables, 18 figures, and 4 appendices. The list of references contains 78 sources, 54 of which are in foreign languages.

The research was conducted at the laboratory "Morphogenesis of Higher Plants *In Vitro*" of the Department of Molecular Biology and Biotechnology, V. N. Karazin Kharkiv National University.

The aim of the present study was to investigate the effect of a colostrum preparation (postcasein fraction) on the growth response and biosynthetic activity of callus and suspension cultures of *Pisum sativum* L., used as test systems for biologically active compounds. The objects of the study were callus and suspension cultures of *Pisum sativum* L. (cv. Gaiduk), cultivated on nutrient media supplemented with various concentrations of the colostrum preparation (postcasein fraction). The research employed biotechnological, cytological, biochemical, and statistical methods. The study involved an analysis of the growth response and biosynthetic activity of callus and suspension cultures of *Pisum sativum* L. grown on media containing different concentrations (0, 0.1, 1, and 10 mg/L) of the colostrum preparation. Growth parameters and biochemical activity indicators were evaluated. The potential of *in vitro* plant cell cultures as test systems for biologically active compounds was also considered. It was established that the suspension culture of *Pisum sativum* L. may serve as a suitable test object for the study of biologically active substances due to its sensitivity to components of the culture medium. Moreover, certain concentrations of the colostrum preparation were found to exert a stimulatory effect on both callus and suspension cultures of *Pisum sativum* L.

Keywords: callus culture, suspension culture, colostrum, test-object, biostimulant.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Поняття біотестування.....	10
1.1.1 Тест-об'єкти.....	10
1.1.2 Рослини як тест-об'єкти.....	11
1.1.3 Методи біотестування.....	11
1.1.4 Способи застосування біотестування.....	12
1.1.5 Біотестування харчових продуктів, кормів, добавок.....	13
1.2 Калюсна культура – нова біологічна модель.....	14
1.2.1 Отримання первинного калюсу.....	17
1.2.2 Умови культивування.....	18
1.2.3 Характеристика калюсної культури	21
1.3 Біологічні добавки як компоненти поживного середовища для культивування рослин.....	24
1.3.1 Кокосова вода (рідкий ендосперм кокосового горіха).....	24
1.3.2 Дріжджовий екстракт.....	25
1.3.3 Гідролізат казеїну.....	26
1.3.4 Молозиво.....	27
1.3.5 Солодовий екстракт.....	28
1.4 Молозиво – унікальна суміш біологічно активних речовин.....	28
1.4.1 Біохімічний склад молозива.....	30
1.4.2 Мінеральні речовини та вітаміни.....	32
1.4.3 Білки.....	33
1.4.4 Жири, вуглеводи.....	35
1.4.5 Використання секрету молозива у медицині.....	36
1.5 Калюс як тест-система для оцінки дії стресових факторів.....	38

1.5.1	Типи стресових факторів, що досліджуються на калюсних культурах.....	38
1.5.2	Калюсна культура як тест-система при оцінці дії абіотичних стресових факторів: приклади та методи.....	39
1.5.3	Калюсна культура як тест-система при оцінці дії біотичних стресових факторів: приклади та методи.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....		45
2.1	Характеристика об'єктів дослідження.....	45
2.1.1	Характеристика рослинного матеріалу – насіння гороху посівного <i>Pisum sativum</i> L. сорту Гайдук.....	45
2.1.2	Характеристика препарату молозива корів.....	46
2.1.3	Характеристика суспензійної культури.....	48
2.1.4	Характеристика калюсної культури.....	49
2.2	Методи дослідження.....	50
2.2.1	Біотехнологічні методи.....	50
2.2.2	Біохімічні методи.....	54
2.2.3	Цитологічні методи.....	56
2.2.4	Статистичні методи.....	58
2.3	Дизайн дослідження.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....		63
3.1	Вплив молозива (потсказейнової фракції) на калюсну культуру.....	63
3.1.1	Морфологічний аналіз калюсної культури <i>Pisum sativum</i> L. сорту Гайдук за впливу препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища.....	63
3.1.2	Ростова реакція пересадкової калюсної культури за дії постказейнової фракції молозива як компонента поживного середовища.....	65

3.2	Вплив молозива (постсказеїнової фракції) на суспензійну культуру <i>in vitro</i>	72
3.2.1	Аналіз морфології клітин суспензійної культури <i>Pisum sativum</i> L. сорту Гайдук за впливу препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища.....	72
3.2.2	Динаміка росту суспензійної культури за дії препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища.....	74
3.3	Порівняльний аналіз впливу препарату молозива на ростову реакцію калюсної та суспензійної культури.....	82
	ВИСНОВКИ.....	86
	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	97
	ДОДАТКИ.....	102

ВСТУП

Актуальність. Біотестування наразі є методом, який активно розвивається і спрямований на встановлення потенційного небезпечного впливу певного середовища чи речовин. Ведуться пошуки нових тест-об'єктів, які демонструють чутливість до сполук, токсичність яких повинна бути визначеною. Біотестування також актуально і для біологічно активних речовин – сполук природного або синтетичного походження, які мають вплив на фізіологію і біохімічні процеси живих організмів. Оскільки важливо встановити можливий негативний вплив різних концентрацій сполук, що проявляють біологічну активність.

Культури рослинних клітин *in vitro* можуть виступати тест-об'єктами для біологічно активних сполук, оскільки мають високу чутливість до компонентів середовища культивування. За ростовою реакцією та зміною біосинтетичної активності можна охарактеризувати ефекти досліджуваної речовини на культуру, визначити концентрації, які інгібують її життєдіяльність. Враховуючи те, що у випадку суспензійних культур рослинних клітин *in vitro* біотестування відбувається на рівні окремих клітин, які знаходяться у рідкому поживному середовищі, можна говорити про важливість розгляду їх як тест-об'єктів.

Молозиво є біологічною рідиною, яка завдяки своєму різноманітному складу викликає інтерес у галузі медицини, спортивного харчування, харчовій промисловості, а також, виходячи з обмеженої кількості наукових досліджень, може виступати у якості біологічної добавки до поживних середовищ для культивування рослинних клітин *in vitro*. Окрім цього, не дивлячись на очевидні позитивні ефекти молозива, необхідно вивчати і можливу негативну дію на фізіологію і біохімічні процеси живих організмів. Тому біотестування тут є одним з методів, який можна застосувати з метою

перевірки реакції тест-об'єкта на досліджувану біологічно активну речовину.

Мета та завдання дослідження.

Метою роботи є дослідження впливу препарату молозива (постказеїнова фракція) на ростову реакцію і біосинтетичну активність калюсної та суспензійної культур *Pisum sativum* L., що виступають у якості тест-системи для біологічно активних речовин.

Завдання:

1. Ввести в культуру *in vitro* та отримати пересадкову калюсну культуру *Pisum sativum* L.
2. Дослідити та проаналізувати вплив препарату молозива (постказеїнова фракція) різних концентрацій на ростову реакцію (PI, площа, біомаса), та морфогенетичні зміни калюсної культури *Pisum sativum* L.
3. Дослідити та проаналізувати біосинтетичну активність (розчинний білок, феноли та флавоноїди) калюсної культури *Pisum sativum* L.
4. Отримати суспензійну культуру *in vitro* *Pisum sativum* L.
5. Дослідити та проаналізувати вплив препарату молозива (постказеїнова фракція) різних концентрацій на ростову реакцію (щільність, життєздатність, морфологія клітин, ООК), та біосинтетичну активність суспензійної культури *Pisum sativum* L.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Поняття біотестування

Біотестування – сукупність методів, що спрямовані на встановлення токсичності певного середовища, з використанням тест-об'єктів, які своїми морфо-фізіологічними реакціями сигналізують про небезпечні чинники навколо себе. Процес біотестування проводиться за використання обраних лабораторних культур тест-організмів, а експеримент, під час якого перевіряють зразок, проводиться у контрольованих умовах освітлення, температури, концентрації кисню для отримання точних результатів, які можливо відтворити у майбутньому [1].

Варто відрізнити поняття біоіндикації від біотестування. Біоіндикація – метод оцінки навколишнього середовища або його окремих компонентів за наявністю чи відсутністю певних популяцій, видів організмів або їх угруповань. Для цього використовують види-стенобіонти. На відміну від біотестування, біоіндикація є тривалим процесом без миттєвої реакції на несприятливі умови, на результат може впливати велика кількість чинників, адаптаційні можливості виду-біоіндикатора. Біотестування дозволяє отримати більш швидкі, чіткі результати, а також надає характеристику ступеня впливу факторів середовища [1, 2].

До наявних методів біотестування зразків з природних середовищ існують певні вимоги:

- Біотест має бути придатним для оцінки будь-яких екологічних змін середовища, що перевіряється.
- Біотестування повинне бути достатньо чутливим, щоб можна було виявити початкові і ще зворотні екологічні зміни.

- Біотестування має характеризувати найважливіші і найзагальніші параметри живих організмів
- Бути зручним не тільки у лабораторних умовах, але і в умовах польових досліджень, не вимагати надмірних матеріальних, фінансових, часових витрат.
- Бути універсальним щодо чутливості до типу впливу (біологічний, фізичний чи хімічний) і реагувати на комплекс чинників.

Біотестування застосовується для оцінки антропогенного впливу на ґрунти, водні ресурси, повітря, а також для перевірки токсичності певних хімічних сполук, препаратів, харчових продуктів, кормів і добавок. Однак, найбільш відомим застосуванням біотестування є токсикологічний контроль навколишнього середовища [2, 3].

1.1.1 Тест-об'єкти

Для біотестування використовують: види-індикатори, які своєю загибеллю вказують на наявність відповідного фактору; види-монітори, які морфо-фізіологічними змінами організму дозволяють оцінити інтенсивність впливу несприятливих чинників середовища. Тест-об'єктами є лабораторні культури, які під час тестування зразка перебувають у середовищі з контрольованими параметрами стосовно освітлення, температури, його хімічного складу [1, 2].

Серед всіх видів живих організмів, які можуть бути тест-об'єктами, що відповідають вимогам щодо біотестування, найбільш часто залучають різні види водоростей, найпростіших, бактерій. Для біотестування води (стічні води, стан водойм тощо) також використовують представників ракоподібних, визначаючи гостру летальну токсичність. Рослин також залучають, якщо постає питання визначення фітотоксичності ґрунтів та реакції на внесення добрив [4].

У таблиці (див. Додаток А) наведені тест-об'єкти, які широко використовують у біотестуванні для оцінки стану і динаміки середовища,

його забрудненості, для тестування препаратів, харчових продуктів, різних хімічних речовин.

1.1.2 Рослини як тест-об'єкти

Рослини як тест-об'єкти біотестування застосовують для визначення фітотоксичності ґрунтів – моніторингу хімічного забруднення, дослідження реакції на внесення добрив, меліорантів, перевірки впливу використання відходів у якості добрив (компост, осад стічних вод/стічні води). Зазвичай застосовують проростки та насіння обраних видів. Досліджують показники схожості насіння, одночасності цього, час появи сходів, швидкість росту і розвитку проростків. Рослини як тест-об'єкти є привабливими, оскільки легкі у використанні, дешеві, швидко розмножуються, часто мають типові реакції на небезпечні чинники середовища [2, 4].

У випадку біотестування стічних вод перевіряють ступінь інгібування проростання насіння, росту проростка, утворення коренів і стебел, вимірюючи їхні довжини та суху масу після певного часу інкубування зі зразками. Також, окрім цього, можуть визначати цитогенотоксичність – гальмування клітинної проліферації, а також фіксація випадків аномальної будови хромосом. Таким чином, визначають реакцію на стічні води – чи присутні у них важкі метали, фенол, токсичні солі, луґи, кислоти тощо [5].

1.1.3 Методи біотестування

В основі методу біотестування лежить оцінка токсичності середовища чи проб за допомогою універсальних критеріїв реагування тест-об'єкта на стресовий чинник, оскільки існує необхідність створення стандартних біотестів для широкого і більш простого використання.

Загалом методи біотестування за цілями можна поділити на дві групи: оцінка загальної токсичності і методи ідентифікації забруднювачів. Загальна токсичність визначається в ході аналізу даних щодо інтенсивності стресової реакції, тоді як при ідентифікації певних забруднюючих речовин оцінюють функціонування певних органів, тканин або інших «мішеней», або біомаркерів. Головне, щоб реакцію «мішені» було легко реєструвати. У

цьому випадку доцільно використовувати тест-об'єкти, які мають просту організацію (найпростіші, плоскі черви, тощо) [3].

Детальніше стосовно методів біотестування в залежності від мети:

- Біотестування ґрунтів: метод паростків для дослідження якості ґрунтів, реакції на добрива. На відібраних зразках ґрунту пророщують насіння обраного рослинного тест-об'єкта, через декілька днів вимірюють довжину надземної і підземної частини рослини, визначають швидкість проростання, кількість насінин, фіксують аномалії. Вологість необхідно підтримувати на рівні 70%. Важливо враховувати, що рослинні культури підбирають у відповідності з типом ґрунту, який є типовим для них. Наприклад, для вивчення ґрунтів степової зони доцільно використовувати насіння пшениці, люцерни, квасолі тощо [4, 6].
- Біотестування води: фіксують фізіологічні та цитологічні реакції організмів. Наприклад, визначають рухомість і виживання *Daphnia magna*, рівень пригнічення розмноження мікроводоростей, ріст форелі, поведінкові реакції коропа звичайного, визначення ембріотоксичності на ембріонах та личинках риб тощо [7].
- Біотестування продуктів харчування, кормів, добавок та ін.: цитологічні, фізіологічні та поведінкові реакції нижчих ракоподібних та найпростіших на водні екстракти зразків харчових продуктів, кормів, добавок [8].

1.1.4 Способи застосування біотестування

Біотестування, як вже було зазначено, наразі найчастіше використовується для токсикологічного дослідження ґрунтів, води з різних джерел, оцінки безпеки і якості харчових продуктів, кормів, добавок, хімічних сполук.

Двома найпоширенішими біотестами, які використовуються для оцінки токсичності забрудненого ґрунту, є біотест Microtox з використанням *Vibrio fischeri* – біолюмінесцентної бактерії – та біотест на

основі дощових черв'яків з використанням *Eisenia foetida*. Спочатку Microtox був розроблений для тестування стічних вод та води із забруднених джерел, але згодом був модифікований і для ґрунтів. Цей біотест проводили таким чином: організм поміщали у суспензію зі зразком ґрунту, інкубували, а потім фільтрували, щоб виміряти біolumінесценцію бактерій у фільтраті [9].

Стічні води містять багато забруднюючих речовин, і вони можуть бути не повністю видаленими при очищенні для наступного використання, а також можуть містити побічні продукти процесу дезінфекції. Недостатнє очищення води і контроль цього матиме несприятливі біологічні ефекти, серед яких токсичність, генотоксичність, репродуктивна токсичність порушення розвитку дітей, проблеми з ендокринною системою [10].

Наприклад, недопустиму концентрацію фтору і алюмінію можна визначати за допомогою біотестування зразків води тест-об'єктом *Cyprinus carpio* або коропом звичайним. Між концентрацією цих речовин і смертністю риб спостерігається кореляція, з чого можна було визначити концентрації ЛД50 алюмінію і фтору. Також, при знаходженні у цих зразках води, у риб спостерігалась аномальна поведінка: швидких рух очей, хаотичне переміщення, надмірне виділення слизу [11].

3.4 Біотестування харчових продуктів, кормів, добавок

Біотестування харчових добавок є актуальним, оскільки відомо, що вони можуть бути негативним чинником, що впливає на здоров'я людини. Через активний розвиток харчової промисловості і зростання потреб людства у її продукції, виробники обирають стратегію використання речовин, які збільшують термін придатності, покращують органолептичні показники. Але при цьому існує вірогідність, що ці речовини не будуть якісними і повністю безпечними для людського організму. Неякісні і небезпечні харчові добавки можуть мати вплив на структурно-функціональну організацію компонентів молекулярного, клітинного, тканинного і органного рівнів організму. Вплив може виражатися у

канцерогенних, мутагенних, імунотоксичних, нейротоксичних ефектах, розладах травлення і роботи репродуктивної системи, провокувати розвиток певних патологій [12].

Біотестування проводять на обраному тест-об'єкті, визначаючи концентрації харчової добавки, що викликає гостру та хронічну токсичні дії. Зразки добавок зазвичай готують у формі водних розчинів, у яких потім будуть знаходитись тест-об'єкти протягом перевірки зразка на гостру та хронічну токсичність. У дослідженні [12] біотестування найбільш поширених харчових добавок проводилось на *Daphnia magna* Straus. Ці ракоподібні, які є планктонними представниками з ряду гіллястовусих, використовуються завдяки їхній доступності, простоті культивуванню в лабораторних умовах, можливості швидкого отримання у великій кількості. У водних розчинах харчових добавок містились їх максимально допустимі рівні (МДР) концентрацій у харчових продуктах. Перевірка на гостру летальну токсичність (ГТ) показала, що відсоток загиблих організмів *Daphnia magna* Straus не перевищував 25%, що означає, що обрані харчові добавки не чинять гострої токсичної дії. Однак було виявлено ефект хронічної токсичності, який полягав у зниженій здатності до розмноження. Це дослідження показало перспективи біотестування як доступного, швидкого, простого способу тестування зразків харчових добавок поряд з методами на основі аналітичної хімії.

У іншому дослідженні [13] як тест-об'єкт використовували інфузорій *Tetrahymena pyriformis*, перевіряючи ростову і поведінкову реакцію на підвищені концентрації харчових добавок. Визначались порогові і смертельні дози, щоб встановити діапазон токсичності речовин. Отримані результати корелювали з даними інших досліджень, у яких використовували ссавців у якості тест-об'єктів (щурів, мишей, кроликів і т.д.). Це дозволяє розглядати інфузорій як зручні об'єкти для проведення біотестування.

Біотестування можливо застосовувати для перевірки якості харчових продуктів, наприклад, хлібобулочних виробів та виробів з зерна пшениці. Відомо, що ці харчові продукти можуть піддаватися швидкому псуванню через недотримання умов зберігання, неякісну сировину, що становить небезпеку для споживачів через накопичення мікотоксинів цвілевих грибів. У дослідженні [8] проводиться біотестування водних екстрактів вищезазначених харчових продуктів декількох виробників за допомогою тест-об'єктів інфузорій *Colpoda Steini* та дафній *Daphnia Magna*. На цих організмах перевіряють токсичність продукту методом визначення відсотку загибелі організмів. Обидва організми загалом використовуються у дослідженні токсикологічної безпеки води, а *Colpoda Steini* – також у аналізі харчових продуктів, кормових сумішей, добавок, визначенні факту отруєння сільськогосподарських тварин за патматеріалом [8].

Результатами дослідження [8] було встановлення рівня токсичності виходячи з того, чи лишаються рухомими більшість інфузорій через 3 години після початку біотестування. Відповідно визначався відсоток загибелі організмів. У дафній – аналогічно. Було встановлено, що більшість зразків хлібу і пластівців від різних виробників відповідали вимогам нетоксичних показників, але один з них – зразок пшеничних пластівців – показав токсичний вплив на обидва види організмів.

Корми для тварин мають обов'язково проходити перевірку на безпечність і нетоксичність, оскільки якісні корми є однією зі складових добробуту тварин. Токсичність кормів часто обумовлена наявністю в них мікотоксинів, пестицидів та інших сполук, які можуть здійснювати негативний вплив на організм тварин [14].

У дослідженні [14] для біотестування зразків кормів були використані біоломінесцентні мікроорганізми *Photobacterium phosphoreum*. Спочатку готували спиртові (етанол 96%) витяжки наважок корму (зерносуміш пшениці і ячменю). Етанол був використаний як екстрагент тому, що у кормах можуть бути токсичні речовини органічного походження.

Після екстракції відбувалось центрифугування зразків для отримання надосадової рідини. Для проведення біотестування вносили певний об'єм екстракту у культуральну рідину, де культивувались *Ph. Phosphoreum*. Через певний час перевіряли рівень біоломінесценції за допомогою люмінометра. Результати показали дозозалежне зниження світіння бактерій, що дозволяє у подальшому розробити методику виявлення токсичних концентрацій.

Біотестування кормів за допомогою фотобактерій може значно знизити вартість виконання тестування іншими методами, будучи при цьому також високочутливим і відтворюваним, а також швидким [14].

Загалом біотестування продуктів харчування, кормів, харчових добавок є більш швидким, простим і дешевим методом, ніж хімічний аналіз, використання піддослідних тварин та дорогого обладнання [8, 12].

1.2 Калюсна культура – нова біологічна модель

Калюсна культура – культура дедиференційованих рослинних клітин, що характеризується неупорядкованим ростом і розмноженням. Для одержання таких культур отримують фрагмент тканин з органів вищої рослини – експлант – і розміщують його на штучному середовищі з фітогормонами або без регуляторів росту [15].

Калюсні культури *in vitro* є перспективними біологічними моделями, експериментальними системами для вивчення процесів морфогенезу, проведення генетичної інженерії, отримання вторинних метаболітів, регенерації сільськогосподарських, садових рослин. На сьогодні відомо, що здатність утворювати калюс присутня у представників багатьох родів рослин. Численні дослідження встановили, що існує можливість використання різних вегетативних, генеративних і ембріональних органів у якості експлантів для отримання калюсу [16].

Використання моделей рослинних клітин, тканин, стебел, а також органів при культивуванні *in vitro* дозволяє наближатися до розуміння особливостей, закономірностей морфогенезу інтактних рослин. Модельний

підхід дозволяє вивчати деталі комплексних морфогенетичних процесів (з деяким спрощенням, оскільки молекулярні механізми, що лежать в основі цього, ще недостатньо вивчені) у контрольованих умовах експерименту. Завдяки наявним знанням про утворення калюсної культури *in vitro* та відтворення повноцінних регенератів з неї розроблено біотехнологічні методи масового отримання цінних для господарства рослин [17].

3.5 Отримання первинного калюсу

Первинний калюс – дедиференційовані клітини в умовах *in vitro*, що характеризується неорганізованим ростом і проліферацією. Це відбувається завдяки росту на живильних середовищах з високим вмістом фітогормонів ауксинів або їх синтетичних аналогів, що призводить до дедиференціації та активного поділу. Дедиференціація означає, що клітини втрачають початкові функції і морфологічні ознаки. Чим менше вихідні клітини хімічно і морфологічно диференційовані, тим легше отримати первинний калюс. Калюс, що культивується поверхневим способом, має вигляд аморфної маси паренхімних клітин з тонкими клітинними стінками. Структура не є строго визначеною. Клітини або не мають кольору, або мають світло-жовтий, світло-зелений, світло-коричневий колір [18].

Для отримання первинного калюсу обраний експлант стерилізують, виконують надрізи на поверхні та переносять на поживне середовище, забезпечуючи контакт пошкоджених ділянок з поверхнею середовища. Джерелами майбутнього первинного калюсу можуть бути: листки, стебла, корінці, асептичні проростки, зародки, насіння тощо [19].

При отриманні первинного калюсу з асептичних проростків спочатку відбувається шляхом пророщування попередньо простерилізованого насіння у чашках Петрі з живильним середовищем без фітогормонів. Далі проростки розрізають на різні експланти, які поміщають у живильне середовище для індукції калюсогенезу. Окрім проростків, використовують і насіння рослин, яке теж ретельно стерилізують і розміщують на

середовищі з фітогормонами ауксинами, які індукують утворення первинного калюсу.

Зрілі зародки також застосовують з метою отримання первинної калюсної культури, оскільки найкраще і найлегше вводяться в культуру саме меристематичні тканини, з яких складається зародок. Його, після виконання маніпуляцій, пов'язаних зі стерилізацією і утриманням у термостаті, відокремлюють від насіння і переносять на середовище для індукції калюсогенезу [18].

Меристематичні тканини – твірні тканини рослин, які є недиференційованими і здатними до активного, безперервного поділу. Вони згодом утворюють більш спеціалізовані тканини шляхом поступового диференціювання. Клітини цієї тканини є дрібними, тонкостінними, з великим ядром, а деякі органели перебувають на стадії формування (пластиди, ЕПР, мітохондрії). Клітинний поділ у меристематичних тканинах стимулюється ауксинами, які здійснюють підготовку клітини до поділу. Утворюються у процесі метаболізму або надходять з інших тканин [20].

Листя більшості видів рослин придатне для отримання калюсу. Для цього експлант має бути простерилізованим відповідно до методики, мати зону поранення, на якій буде відбуватися калюсогенез. Важливим є те, що індукція калюсогенезу відбувається за повної відсутності світла і при визначеній температурі [18].

Утворений на експлантах первинний калюс субкультивують на свіже поживне середовище в середньому через чотири-шість тижнів, в залежності від методики [15].

1.2.2 Умови культивування

Умови культивування калюсних культур відрізняються для кожного виду, сорту рослин, і тому обрані рослини часто мають протоколи введення в культуру *in vitro* [18]. На ріст культури впливають такі зовнішні фактори як освітленість, температура, рН середовища, аерація, склад живильного середовища. Зазвичай калюсні культури отримують на твердому

агаризованому середовищі, що доповнене спеціальними поживними речовинами, солями, вітамінами, фітогормонами.

Добре відомі такі культуральні середовища: середовище Мурасіге та Скуга (MS), середовище Уайта, середовище Гамборга, середовище Шенка-Хільденбранта та інші. У більшості випадків для індукції росту калюсу в середовище необхідно додавати спеціальні фітогормони, які поділяються на ауксини, цитокініни та гібереліни [16, 18].

Серед ауксинів найбільш вживаними є 2,4-дихлорфеноксиоцтова (2,4-Д) та індолілоцтова (ІОК) кислоти. Високі концентрації ауксинів важливі для індукції утворення первинного калюсу, а подальші пасажі мають відбуватися на середовища з нижчою концентрацією цих фітогормонів. [19]. Ауксини регулюють поділ клітин, їх подовження та диференціацію. Цитокініни регулюють клітинну проліферацію, а також стимулюють розвиток адвентивних пагонів. Гібереліни переривають стан спокою рослини і стимулюють поділ клітин [21].

Оптимальний рівень освітлення залежить від методики, експланту, мети культивування калюсної культури. Світло є найважливішим фактором успішного росту і розвитку рослин, у деяких випадках має вирішальне значення для культур рослинних клітин *in vitro*. Інтенсивність світла, тривалість періодів світла і темряви (часто фотоперіод складає 16 годин світла та 8 годин темряви), спектральний склад мають особливе значення для оптимального росту рослинних клітин. Однак особливості розвитку рослин за присутності світла відрізняються від рослини до рослини, і це також характеризує обраний експлант для утворення калюсної культури. У деяких випадках присутність світла не є важливою для росту калюсу, оскільки доведена можливість індукції калюсу у різних видів рослин у темряві.

Світло інтенсивністю 2000-2500 лк здатне викликати посилений синтез антиоксидативних ферментів, поліфенольних сполук, флавоноїдів, однак проліферація калюсної культури може бути нижчою у порівнянні з

культивуванням при розсіяному світлі (500-1000 лк). Ферменти-антиоксиданти та інші сполуки з такими ж властивостями синтезуються у відповідь на стресові умови. Підвищена кількість таких сполук продукується у повній темряві (0 лк), а за розсіяного та нормального освітлення продукція знижується. Це пояснюється тим, що в умовах темряви підвищується виробництво активних форм кисню (АФК), що викликає деградацію фотосинтетичного апарату. Це може зашкодити росту і розвитку клітини. При культивуванні калюсної культури, якщо методика передбачає використання освітлення, потрібно поступово переводити культуру на нормальне освітлення для уникнення сильного стресу [22].

Калюсна культура при освітленні є міксотрофною, оскільки світло впливає на роботу фотосинтетичних пігментів. У повній темряві відбувається перехід до гетеротрофного живлення, для якого необхідні додаткові джерела вуглецю і нітрогену [23].

Оптимальною температурою для калюсогенезу є значення +20...+27°C, однак необхідно враховувати видові особливості рослин, від яких отримують калюсну культуру. Обрану температуру або підтримують на одному рівні протягом культивування, або знижують протягом нічної частини циклу. Високі температури здатні пригнічувати вплив цитокінінів, а низькі – гальмують ріст культур. Типове значення температури при культивуванні у термостаті – +25...+26°C [24].

Аерація є важливим параметром для суспензійних культур. Вона забезпечується за допомогою подачі повітря у біореактор або ж постійному перемішуванні на шейкері. Суспензійна культура – калюсна культура у рідкому поживному середовищі. Рослинні клітини рідко можуть бути поодинокими – вони утворюють різноманітні агрегати завдяки клітинній адгезії. Відомо, що потреба в аерації суспензійних культур є нижчою, а ще за умови використання ерліфтних біореакторів та біореакторів з барботажними колонами виникає ризик пошкодження клітин, піноутворення, блокування повітряних фільтрів через утворення клітинних

агрегатів. Тому більш доцільним є використання біореакторів з перемішуванням або шейкерів, щоб уможливити культивування суспензійних культур, у тому числі і високої щільності [25].

1.2.3 Характеристика калюсної культури

Калюсна культура, що вирощується поверхневим способом, має вигляд аморфної маси клітин з тонкою клітинною стінкою, без конкретних анатомічних структур. Існує певна варіабельність кольору і структури, які залежать від багатьох факторів і можуть змінюватись протягом культивування [19].

Калюс може набувати різних кольорів, які можуть змінюватись з часом та під впливом умов середовища. На колір впливає вік калюсної культури, умови освітлення, склад середовища, а також вид рослини, з якої було отримано екплант. Потемніння калюсу пов'язують зі старінням та пригніченням росту, оскільки коричневий колір зумовлюють поліфенольні сполуки, що є токсичними для клітин. Вони синтезуються у відповідь на оксидативний стрес, вплив повітря та інтенсивного освітлення. Також темний колір калюсу вказує на зниження здатності клітин до поділу [19, 23].

Структура калюсу може бути пухкою, середньої щільності, компактною, загалом – аморфною, без конкретної форми. Пухка структура калюсу вказує на те, що наявний активний поділ клітин. Ця структура також супроводжується розсипчастістю, високим вмістом вологи, є крихкою. Клітини видовжені, оводнені, розпадаються на агрегати. Компактні калюси складаються з щільних і дрібних клітин, які погано відокремлюються, мають відносно гладку поверхню, є твердими, в них відмічаються елементи редукованого камбію та провідної системи [23, 26].

Крива росту калюсної культури є S-подібної форми і має шість фаз. У циклі вирощування калюсу після декількох поділів починається звичайний для рослинних клітин онтогенез. Фаза росту характеризується розтягненням клітин, їх диференціювання як зрілих калюсних клітин і деградацією, причинами якої є вичерпання поживних речовин, накопичення токсичних

метаболітів, виснаження кисню, висихання твердих середовищ тощо [15, 23].

Фази кривої росту калюсної культури:

1. Латентна або лаг-фаза: помітний ріст культури не спостерігається.
2. Експоненціальна фаза: максимально швидкий ріст, мітотична активність калюсу, переважно наявні дрібні меристематичні клітини.
3. Фаза лінійного росту: регульований, монотонний ріст культури.
4. Фаза уповільненого росту: сповільнення росту калюсної культури, його незбалансованість. Причиною є виснаження поживного середовища та накопичення метаболітів клітин.
5. Стаціонарна фаза: швидкість деградації клітин врівноважується швидкістю поділу клітин, триває біосинтез і біотрансформація [15]. На цьому етапі необхідно проводити субкультивування для підтримки клітинної лінії у нормальному стані [23].
6. Фаза деградації: відмирання клітин, загибель культури [15].

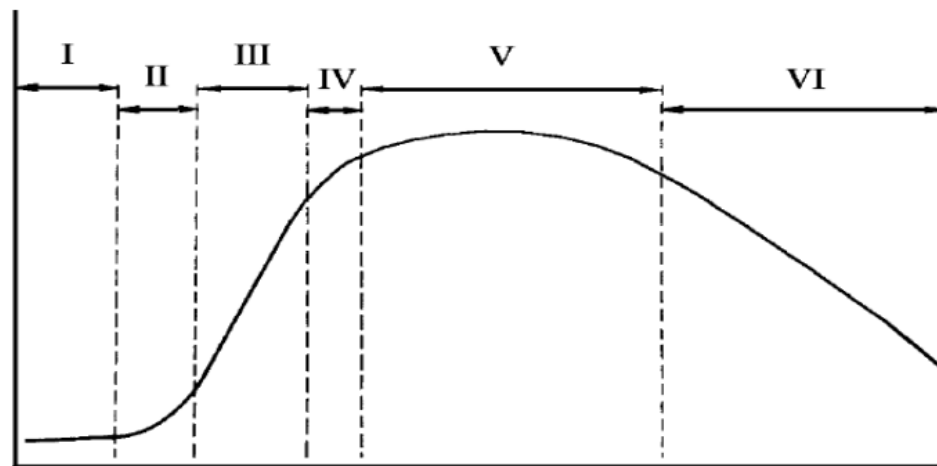


Рис. 1.1. Фази кривої росту калюсної культури: I – лаг-фаза, II – експоненціальна фаза, III – фаза лінійного росту, IV – фаза уповільненого росту; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання [15].

Однак, калюсні культури мають генетичну гетерогенність і фізіологічну асинхронність. Фізіологічна асинхронність виражається у

тому, що клітинний цикл, у порівнянні з рослинами у нормальних умовах, є довшим, у культурі присутні як і молоді, так і старі клітини, ріст є неорганізованим [26].

Вже було зазначено, що клітини експланту перед калюсогенезом зазнають дедиференціації під впливом факторів поживного середовища. Дедиференціація – процес, за якого зрілі або спеціалізовані клітини втрачають свої властивості, переходячи до недиференційованого стану, який ще називають плюрипотентністю. Дедиференціація підвищує потенціал розвитку рослинної клітини. Це явище тісно пов'язане з утворенням калюсу.

Лише деякі клітини калюсної культури можуть брати участь у регенерації органів та ембріогенезі, що підтримує гетерогенний склад культури. Тут слід зазначити, що потенціал розвитку є терміном, що стосується клітини, і, отже, весь калюс не може бути плюри- або тотипотентним, але може мати плюри- або тотипотентні клітини. Калюсні культури, що культивують достатньо довго, стають все більш і більш однорідними, часто з подальшою втратою потенціалу розвитку, особливо в суспензійних культурах клітин [27].

Існують калюсні культури з високим морфогенетичним потенціалом. Особливостями їх структури є компактність, наявність хлорофілвмісних ділянок зеленого кольору, матова поверхня, структурованість. На хлорофілвмісних ділянках з часом і за відповідних умов формуються пагони і згодом – рослини-регенеранти. Тоді як пухкі калюси не мають здатності до органогенезу або ж утворюють лише коріння. Пухкі калюси можуть вводити в суспензійну культуру [24]. Калюсні культури, що створені для регенерації *in vitro* рослин, культивують на середовищах, які доповнені регуляторами росту, що задають певний морфогенетичний шлях [28].

Суспензійні культури – клітинні агрегати та окремі клітини, які перебувають у рідкому живильному середовищі при постійному перемішуванні та аерації за допомогою шейкера або біореактора. Їх

отримують шляхом переміщення пухкої, крихкої первинної калюсної культури у рідке середовище. Важливо використовувати калюс саме такої структури, оскільки легше утворити суспензійну культуру з калюсу, який піддається фрагментації. Суспензійні культури використовують у біохімічних, молекулярно-біологічних дослідженнях, а також для отримання вторинних метаболітів, оскільки на метаболізм і ріст таких культур легше впливати [19].

1.3 Біологічні добавки як компоненти поживного середовища для культивування рослин

У якості біологічних добавок для індукції первинного калюсу та його подальшого культивування іноді використовують рослинні екстракти, що мають складати 10–15 % від загального об'єму середовища. Серед них – кокосова вода (інша назва – рідкий ендосперм кокосового горіху), солодовий та дріжджовий екстракти, гідролізат казеїну, молозиво та інші менш вживані біологічні добавки, методи використання яких знаходяться на стадії розробки [29, 30].

1.3.1 Кокосова вода (рідкий ендосперм кокосового горіха)

Кокосова вода – рідка частина ендосперму кокосового горіху, яка проявляє цитокініноподібну дію, стимулюючи ріст тканин рослин. Цю добавку активно використовували ще під час формування методу мікроклонального розмноження рослин *in vitro* завдяки різноманітному складу. Цю біологічну добавку вважають найкращим варіантом у порівнянні з іншими [30, 31].

Кокосова вода містить антиоксиданти, що представлені поліфенольними сполуками, різноманітний амінокислотний і мінеральний склад, вітаміни групи В, вітамін С, органічні кислоти, що регулюють рН, вуглеводи (глюкоза, фруктоза, сахароза) [32]. Окрім цих речовин, кокосова вода містить велику кількість цитокінінів (зеатин, який стимулює поділ клітин, кінетин), які є природними фітогормонами [33].

Кокосова вода придатна для доповнення поживного середовища як і для отримання первинної калюсної культури, так і для субкультивування. Показано, що кокосова вода у концентрації 1,5% від об'єму середовища стимулює максимальне зростання біомаси калюсу, а також підвищує відсоток утворення первинного калюсу на експлантах. Ці результати залежать від фітогормонального складу середовища, виду рослини і типу експланту, що важливо враховувати [34].

Кокосова вода придатна і в якості біологічної добавки для вирощування рослин. Завдяки фітогормонам і джерелам азоту у складі цієї добавки спостерігається збільшення висоти пагонів, кількості листя, більш активний розвиток кореневої системи. У поєднанні з ауксинами відбувається прискорений розвиток рослин [33].

1.3.2 Дріжджовий екстракт

Дріжджовий екстракт є джерелом вітамінів, амінокислот та інших сполук. Цей екстракт часто застосовують у культурі рослинних клітин *in vitro* з метою стимулювання виділення вторинних метаболітів дріжджовий екстракт також називають еліситором – фактором, який здатен стимулювати вироблення вторинних метаболітів. Еліситорами є фактори, що спричиняють стрес, і бувають біологічного, як у випадку дріжджового екстракту, фізичного і хімічного походження [19, 35].

Дріжджовий екстракт або гідролізат отримують переважно з дріжджових відходів (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* та *Kluuveromyces marxianus*) після руйнування клітинних стінок, часто механічним, ферментативним способами. Характеризується вмістом білка більше 60%, низьким вмістом ліпідів, нуклеїнових кислот, наявністю незамінних амінокислот, антиоксидантів [36].

Клітинна стінка дріжджів також містить манопротеїни, β -1,3- і β -1,6-глюкани і хітин, тоді як клітинна мембрана містить ліпіди, стерини та білки. Ці сполуки можуть викликати захисну реакцію рослин, активуючи різні біосинтетичні шляхи.

Згідно дослідження [35], дріжджовий екстракт може викликати збільшення біомаси калюсної культури (у даному випадку вивчалось калюсоутворення м'якоті яблука *Malus pumila* cv. *Annurca*), що пояснювали впливом глюкану, хітину, ергостеролу, вітамінів групи В, глікопротеїнів на проліферацію клітин. Окрім цього, дріжджовий екстракт стимулював синтез антиоксидантів, найбільше – хлорогенової кислоти. Результат залежав від типу експланту – калюсна культура з м'якоті яблука утворювала менше поліфенольних сполук, аніж з листкових експлантів.

1.3.3 Гідролізат казеїну

Гідролізат казеїну – суміш амінокислот, що додають до калюсної культури як додаткове джерело органічного нітрогену у вигляді білків та пептидів. Важливим є використання саме гідролізату, а не необроблених білків казеїнів, оскільки ферментативне розщеплення білків підвищує використання амінокислот калюсною культурою [29, 37].

Цінність цієї біологічної добавки полягає у тому, що вона виступає багатим джерелом азоту, який має вирішальне значення для синтезу амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, фітогормонів. Для рослин він доступний у формі нітратів (NO_3^-) з ґрунту, а також – у формі органічних нітрогеновмісних сполук (протеїно- і непротеїногенні амінокислоти, нуклеотиди, білки і пептиди), які здебільшого метаболізуються мікроорганізмами. Органічний азот може бути доступним для рослин завдяки позаклітинним протеазам клітин коріння, які розщеплюють білки на малі пептиди та амінокислоти.

При пророщуванні рослин у стерильному, а отже вільному від симбіотичних мікроорганізмів, середовищі з гідролізатом казеїну було показано, що він сприяє росту, зменшенню дії стресових чинників, стимулює і регулює метаболізм С і N.

Клітини калюсних культур здатні виділяти протеази, що уможливило використання гідролізату казеїну як джерела нітрогену. Ця біологічна

добавка зменшує вплив абіотичного стресу, стимулює метаболізм С та N, може впливати на ефекти фітогормонів [37].

Зазвичай гідролізат казеїну додають до базового середовища Мурасіге і Скуга (MS) разом з необхідними фітогормонами. У випадку утворення первинного калюсу – 2,4-D, який є синтетичним ауксином. Зазначається, що у взаємодії з гідролізатом казеїну досягається краща індукція калюсу, а при використанні у подальшому культивуванні – більш успішна регенерація рослин з нього. Спостерігається залежність між концентрацією гідролізату казеїну та результатом експерименту – чим вища концентрація цієї біологічної добавки, тим краща індукція калюсогенезу [38].

1.3.4 Молозиво

У якості біологічної добавки, що стимулює калюсогенез і подальший соматичний ембріогенез можливо використовувати молозиво. У дослідженні [31] відбулося пророщування соматичних ембріонів рослини туберози (*Agave amica L.*) на середовищі MS, що доповнили різними концентраціями козячого молозива. Молозиво у якості біологічної добавки індукує осмотичний тиск, є багатим джерелом органічного азоту та кальцію, забезпечує підвищення виживання проростків. У цьому випадку молозиво виступає як біостимулятор.

Козяче молозиво можливо додавати як органічну, біологічну добавку до культуральних середовищ за допомогою мембранних фільтрів з діаметром пор 0,45 мкм.

Згідно дослідження [31] найкраще проростання соматичних ембріонів туберози спостерігалось на середовищі MS з додаванням козячого молозива. Спостерігалась найбільша кількість пророслих ембріонів з регенованим листям на культуральну ємність. Цей ефект пояснювали насиченим складом молозива (високим вмістом кальцію, нітрогену, амінокислоти глютаміну, яка широко використовується у культурах рослинних клітин та тканин), високій щільності, що забезпечувало осмотичні умови.

Молозиво може бути придатною біологічною добавкою не тільки у культивуванні рослин *in vitro*, але і для позакореневого живлення рослин у природному середовищі [31].

1.3.5 Солодовий екстракт

Солодовий екстракт – багате джерело поживних речовин, отримане шляхом екстракції водорозчинних речовин з пророслого зерна (солоду). Він має широке застосування не тільки у харчовій промисловості, але і у біотехнології, зокрема для культивування деяких груп мікроорганізмів, наприклад, молочнокислих. Однак, завдяки своєму складу, солодовий екстракт також використовують як біологічну добавку при культивуванні калюсних культур. Добавка характеризується високим вмістом вуглеводів, присутні білки, пептиди та вільні амінокислоти, мінеральні сполуки, органічні кислоти та вітаміни групи В, а також поліфенольні сполуки, які є антиоксидантами [39, 40]

Солодовий екстракт є джерелом вуглеводів, що може бути використане для індукції первинного калюсогенезу, соматичного ембріогенезу та регенерації рослин при додаванні до основного середовища з мікро- і макросолями, фітогормонами. Сприятливий вплив солодового екстракту спостерігається при високих концентраціях, викликаючи підвищений відсоток калюсоутворення на середовищах з 2,4-D. Калюси мають компактний вигляд, без сильної гідратації, при цьому спостерігається висока клітинна проліферація, утворення проембріонів. Результати культивування калюсної культури на середовищі з солодовим екстрактом різняться в залежності від виду рослини, типу експланта та умов середовища [40].

1.4 Молозиво – унікальна суміш біологічно активних речовин

Молозиво – складна біологічна рідина, секрет, що утворюється у молочних залозах самок ссавців перед пологам та протягом наступних декількох днів. Склад молозива відрізняється від складу звичайного молока

вмістом унікальних сполук, які забезпечують необхідними поживними речовинами нещодавно народжену тварину у перинатальний період. У складі молозива присутні висока концентрація білків, жирів, дещо знижена – вуглеводів та оптимальний склад вітамінів, макро- та мікроелементів. Варто зазначити, що фізико-хімічний склад молозива поступово змінюється з часом, а також залежить від виду, породи тварини. Окрім поживної цінності, найголовніший ефект, який має молозиво – формування та дозрівання імунітету у новонароджених ссавців, стимулювання розвитку організму [41, 42].

Відомо, що біологічно активні компоненти – імуноглобуліни, деякі фактори, що стимулюють ріст і розвиток – не здатні проникати через плаценту у великої рогатої худоби, тоді як у більшості ссавців проходять через неї та дозволяють імунітету плоду формуватися ще внутрішньоутробно. Таким чином, телята, народившись, не мають захисту від інфекцій. Щоб стимулювати імунітет, молозиво повинне почати надходити до їх організму протягом перших годин життя, найкраще – відразу (0,5-1 годин після народження). Це пов'язано з тим, що частка засвоєння імуноглобулінів молозива знижується на 1/3 через приблизно 6 годин від моменту народження через анатомічні особливості телят [43].

Споживання новонародженим телям молозива стимулює ріст, початок анаболічних процесів у деяких тканинах, розвиток внутрішніх органів, формує імунну систему та сприяє дозріванню шлунково-кишкового тракту. Останнє є необхідною умовою для подальшого засвоєння корисних та біологічно активних речовин з молозива, а потім – молока, щоб у результаті мати змогу харчуватися твердою їжею.

Відомо, що фактори росту, гормони молозива стимулюють ріст ворсинок слизової оболонки тонкого кишківника, синтезу білка в ентероцитах у новонароджених ссавців, а також позитивно впливають на синтез білків у скелетних м'язах. Завдяки цьому посилюється всмоктувальна здатність тонкого кишківника, і організм теляти може

оптимально перетравлювати і засвоювати вуглеводи. Споживання молозива у перші години життя має велике значення для засвоєння глюкози.

Окрім цього, надходження молозива в організм новонародженого теляти сприяє підвищенню секреції інсуліну та загалом регулює чутливість до нього. В цих процесах задіяні гормон адипонектин та цитокін адипокін [44].

Таким чином, молозиво є цінним продуктом, багатим джерелом мікро- та макроелементів, жирних кислот, вітамінів, амінокислот, білків, що має безпосередній і визначальний вплив на стан різних систем організму новонароджених ссавців у перші дні життя [43].

1.4.1 Біохімічний склад молозива

Коров'яче молозиво – густа, злегка кисла (рН 6,4) рідина жовтого кольору, що містить поживні, антимікробні, противірусні, протигрибкові, імунорегуляторні речовини [41].

Варто зазначити, що склад молозива є варіативним навіть у межах виду ссавців через генетичні фактори та умови навколишнього середовища. Порода, фізичні характеристики середовища (наприклад, температура), режим харчування, сухостійний період (проміжок часу між завершенням доїння корови і початком пологів, що необхідний для підготовки до наступної лактації, відновлення організму тварини), особливості метаболізму, харчування, хвороби також мають вплив на склад і можуть призводити до суттєвих відмінностей у зразках молозива [45].

У таблиці нижче зазначено, що з кожною годиною після отелення склад молозива змінюється, що негативно впливає на його поживну цінність і скорочує позитивні ефекти [41].

Таблиця 1.1.

Хімічний склад молозива (у %) корів у певні години після пологів [41]

Час після пологів	Вміст сполук, %				
	Загальний білок	Казеїн	Альбумін, глобулін	Жир	Лактоза
0	16,8	4,1	12,7	6,7	2,9
6	11,7	3,5	8,0	6,1	3,5
12	6,3	3,1	3,2	4,4	3,9
24	5,5	2,9	2,6	4,1	4,1
48	4,8	2,8	2,0	3,9	4,2
120	3,6	2,7	0,9	0,8	4,5

У наступній таблиці продемонстровано відмінності середніх показників хімічного складу коров'ячого молозива у порівнянні з молоком. Різниця між показниками означає, що молоко має меншу поживну цінність, ніж молозиво, і майже вдвічі більшу концентрацію лактози.

Таблиця 1.2.

Основний хімічний склад молозива та молока (г/100 мл) [41]

Компонент	Молозиво	Молоко
Білок	14,56	3,3
Сироватковий білок	10,87	0,6
Жири	5,35	4,0
Лактоза	2,03	4,8
Мінеральні речовини	1,2	0,65

До складу молозива входять біологічно активні, бактеріостатичні речовини, які представлені ферментами, гормонами, поліамідами, похідними нуклеїнових кислот, амінокислотами та імуноглобулінами,

лактоферином, лізоцимом, елементами клітинного імунітету (лейкоцити), відповідно. Найбільше уваги приділяють білковим молекулам, особливо імуноглобулінам, оскільки саме вони є джерелом пасивного імунітету від бактеріальних інфекцій, які становлять особливу небезпеку на початку життя ссавця [41].

1.4.2 Мінеральні речовини та вітаміни

Найпоширенішими мінеральними речовинами в молозиві є Ca, P, K, Na та Mg, які є макроелементами. Zn, Fe, Cu та Mn присутні в меншій кількості, тому є мікроелементами. Молозиво має високу концентрацію Ca, P, Na, Mg, Fe, Se, Cu та Zn порівняно з молоком, але нижчу концентрацію K та Mn. Також відомо, що з кожними наступними пологами ссавця дещо знижується концентрація мінералів Ca, P і Mg.

Нормальні рівні мінеральних речовин необхідні для росту і розвитку новонароджених ссавців, оскільки кожен мінерал виконує певні фізіологічні функції в організмі. Наприклад, кальцій (Ca) необхідний для розвитку скелету, і він найкраще засвоюється у перші декілька днів після народження [46].

Молозиво містить від 2 до 10 разів більше мінеральних речовин, ніж молоко, але винятком є калій. Загалом вміст мінеральних речовин залежить від того, чи були задоволені потреби організму ссавця протягом перинатального періоду виношування плоду [41].

До складу молозива входять жиророзчинні (A, D, E і K) і водорозчинні (тіамін, рибофлавін, піридоксин, кобаламін, ніацин, біотин, пантотенова кислота, фолієва кислота, нікотинова кислота та холін) вітаміни. Разом з мінеральними речовинами вітаміни грають важливу роль у формуванні імунної системи і розвитку інших систем організму. Дефіцит A, D і E призводить до зниження імуносупресивної здатності організму. Вітамін A регулює швидкість транскрипції генів, а також необхідний для синтезу мукополісахаридів, що використовуються для побудови сполучної тканини.

Вітамін А сприяє стабілізації та регуляції проникності білково-ліпідних клітинних мембран [41].

1.4.3 Білки

Білки займають найбільший відсоток вмісту, ніж інші категорії речовин у молозиві. Мають розчинну та нерозчинну фракцію – сироваткові білки та казеїни відповідно [46].

Сироваткові білки. Здебільшого мають біологічну і бактеріостатичну активність, і до них відносять імуноглобуліни, фактори росту, лізоцим, лактоферин, лактопероксидазу, цитокіни [41, 47].

Імуноглобуліни – білки, утворені двома легкими і двома важкими поліпептидними ланцюгами, що з'єднуються дисульфідними зв'язками в Y-подібну структуру. Імуноглобуліни поділяються на класи, що відрізняються за фізико-хімічними, біологічними та імунологічними властивостями [41]. Імуноглобуліни IgG, IgA та IgM присутні в молозиві великої рогатої худоби та інших ссавців у високих концентраціях – існують дані, що приблизно у 100 разів більше, ніж у молоці. На IgG припадає приблизно 80% від загальної кількості імуноглобулінів. Основною функцією імуноглобулінів у молозиві є забезпечення пасивного імунітету новонародженого ссавця у перші дні життя, які є вразливим періодом, до тих пір, поки не почне формуватися і функціонувати адаптивний імунітет [41, 47].

Молозиво містить близько 50 поліпептидів, які називають факторами росту. Ця категорія складу молозива включає такі сполуки: епідермальний фактор росту (EGF), бетацелюлін (BTC), інсуліноподібний фактор росту (IGF-1), трансформуючий фактор росту $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), фактор росту фібробластів 1 і 2 (FGF1 і FGF2), тромбоцитарний фактор росту (PDGF). Вони виконують численні функції в організмі новонародженого ссавця, є стабільними при термічній обробці до 60°C та деякі з них поглинаються неушкодженими в шлунково-кишковому тракті [47].

EGF – білок з приблизно 53 амінокислот, що експресується фібробластами, ендотеліальними та епітеліальними клітинами. Відповідає

за проліферацію, диференціацію і виживання клітин. На рівні тканин і органів його функцією є підтримка цілісності слизової оболонки ротової порожнини, стравоходу і шлунку. Фактор росту PDGF має чотири ізоформи, які приєднують до відповідних рецепторів на поверхні клітини. активація рецептору і запуск сигнальних шляхів призводить до різних реакцій, наприклад, клітинної міграції, проліферації та виживання. IGF активує сигнальні шляхи, результатом чого є ріст і проліферація клітин, регуляція їх метаболізму. Загалом інсуліноподібний фактор росту є гормоном росту, який необхідний для нормального розвитку всього організму, впливаючи на ріст кісткових і м'язових тканин [48].

Лактопероксидаза – антимікробний глікопротеїн, який здатен пригнічувати метаболічні процеси бактерій. Лактопероксидаза є токсичною для багатьох грампозитивних і грамнегативних бактерій через вироблення активних форм кисню. Ці АФК можуть взаємодіяти з певними амінокислотами в мікробних білках, що призводить до інгібування метаболізму та реплікації ДНК.

Лізоцим спричиняє антибактеріальну дію, викликаючи лізис клітин грамнегативних бактерій, а також пригнічуючи ріст грампозитивних бактерій. Механізм дії заснований на гідролізі пептидогліканового шару клітинної стінки бактерій.

Лактоферин – глікопротеїн, що зв'язує залізо. Лактоферин викликає численні ефекти, включаючи посилення засвоєння заліза, а також антимікробну активність, імуномодулювання, стимулювання росту епітеліальних клітин кишківника і фібробластів. Лактоферин також забезпечує зменшення патогенного мікробного навантаження. Біологічна активність лактоферину пов'язана з його основним N-кінцевим доменом, який взаємодіє з різними мікроорганізмами [47, 49].

Казеїни – фосфопроїєїни, які формують міцели у молозиві і молоці. Поділяють на чотири типи – α S1, α S2, β , κ . В одній міцелі містяться білкові молекули з високофосфорильованими залишками, що приєднують і

утримують значну кількість кальцію, таким чином формуючи нанокластери фосфату кальцію. Приблизно $2/3$ загального кальцію, $1/2$ неорганічного фосфату, $1/3$ магнію та менша частина цитрату перебувають у зв'язаному стані з міцелами казеїну [50].

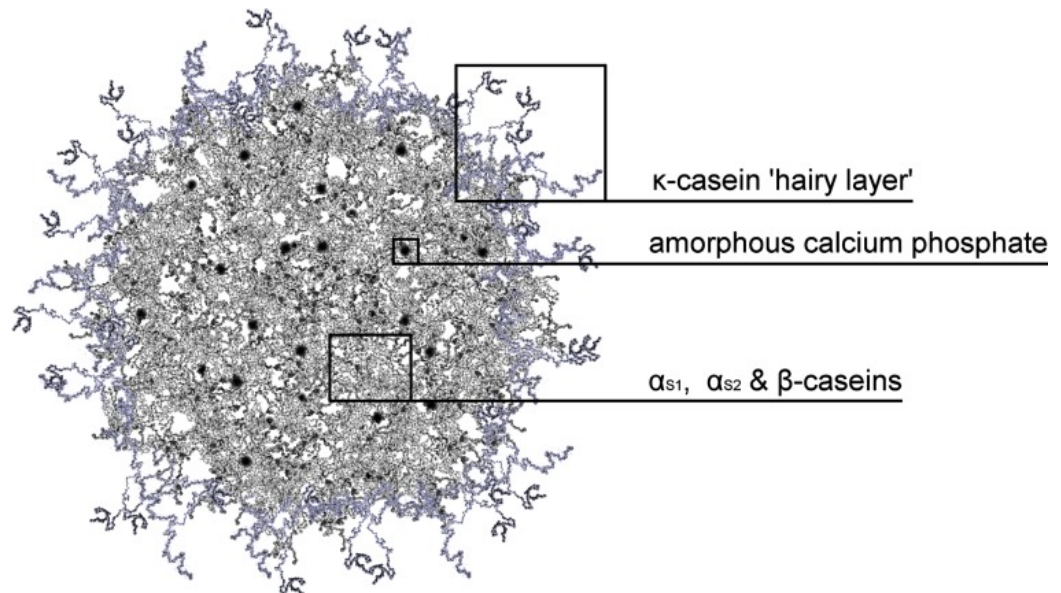


Рис. 1.2. Графічне зображення міцел казеїну [51].

Основною функцією казеїнів молозива є забезпечення організму новонародженого ссавця необхідними амінокислотами. До того ж, ці білки мають високий ступінь збалансованості амінокислотного складу, однак присутній певний дефіцит сірковмісних амінокислот. Наступна функція – транспорт і запасання мінеральних речовин, що також підвищує їх біодоступність. Завдяки пористій структурі казеїнових міцел вони є доступними для дії протеаз шлунково-кишкового тракту. А завдяки міцелярній будові можуть коагулювати та затримуватись у шлунку для кращого і повільнішого перетравлення [52].

1.4.4 Жири, вуглеводи

Жири є важливим і основним джерелом енергії в молозиві. Водночас, цей компонент є доволі варіативним і його вміст може коливатися від 0 до 26%. Основними класами ліпідної фракції є триацилгліцерини, які є

основним класом, фосфоліпіди (два основні класи – гліцерофосфоліпіди та сфінголіпіди), вільні жирні кислоти (коротко- та довголанцюгові, насичені та ненасичені), ейкозаноїди та стерини (найпоширенішим є холестерин). Як вже зазначалось, ліпіди є джерелом енергії, але також служать структурними елементами мембран, попередниками інших молекул. Окислення жирних кислот забезпечує енергією для підтримки гліюконеогенезу. Це джерело енергії особливо важливо для новонароджених, оскільки отримання лактози з молозива недостатнє для задоволення потреби в глюкозі.

Вуглеводи у молозиві присутні у вигляді лактози, олігосахаридів, глікопротеїнів, гліколіпідів. Концентрація лактози у молозиві є нижчою, ніж у молоці, але вона поступово зростає з часом, що пояснюється необхідністю збільшення вмісту води у молозиві для зменшення його щільності. Лактоза викликає рух води з цитоплазми епітелію молочної залози в секреторні везикули.

Лактоза є основним вуглеводом, що надає під час гідролізу глюкозу і галактозу як джерело енергії. Ссавці, а в даному випадку для пояснення ролі лактози наводиться приклад з телятами, народжуються з гіпоглікемією, і споживання лактози з молозива не задовольняє потреби в глюкозі. Тому метаболізм телят повинен швидко налагодити ендогенну продукцію глюкози (процеси гліюгенолізу та гліюконеогенезу). Протягом перших годин життя теля може використовувати печінковий гліюкоген для підтримки нормального рівня глюкози в крові. Лактоза є основним субстратом для гліюконеогенезу на ранніх стадіях життя [46].

1.4.5 Використання секрету молозива у медицині

Молозиво великої рогатої худоби можна застосовувати як біологічно активну добавку до основного харчування завдяки її компонентам, що чинять позитивний вплив на стан здоров'я як і досліджуваних новонароджених телят, так і модельних об'єктів, а також – людей під час клінічних досліджень.

Терапевтичні можливості молозива полягають у його імуномодулюючій дії, здатності до загоєння ран за допомогою вмісту факторів росту, цитокінів (запальні захворювання ШКТ, пошкодження шкірного покриву), полегшення проявів аутоімунних хвороб (ревматоїдний артрит). Населення, яке не має перерахованих хвороб і станів, також може вживати біологічно активні добавки молозива, щоб покращити імунну, травну та гормональну системи, а також – фізичні показники. Для лікування пошкодження шкіри використовують лосьйони, креми проти старіння чи для зволоження. Інші способи застосування – використання як добавок до харчування, у комбінації з препаратами [46, 53].

Коров'яче молозиво можливо застосовувати для відновлення шлунково-кишкового тракту людини після захворювань. Є данні, які свідчать про посилення відновлення слизових оболонок ШКТ шляхом активної проліферації і міграції клітин. Окрім цього, компоненти, які мають імуномодулюючу дію, здатні обмежувати запальні реакції. Молозиво демонструє терапевтичний потенціал для лікування таких станів ШКТ як запалення кишківника, ураження нестероїдними протизапальними препаратами, мукозит, що індукований хіміотерапією. Також є дані, що грудне вигодовування немовлят людини призводить до зменшення ризику виникнення некротизуючого ентероколіту немовлят і інших запальних захворювань ШКТ, а також допомагає розвитку корисної мікробіоти [46, 54].

Молозиво, як вже було зазначено, має імуномодулюючу дію. Ця дія стосується модуляції функцій лімфоцитів, макрофагів, дендритних клітин, нейтрофілів, а також може стимулювати підвищення концентрації цитокінів (наприклад, ІЛ-10).

Основне призначення молозива – вигодовування новонароджених ссавців, забезпечення їх джерелом живлення, пасивним імунітетом, корисними для розвитку речовинами. У якості біологічно активної добавки високо цінується молозиво великої рогатої худоби, оскільки демонструє

корисні нутрицевтичні властивості, які було виявлено експериментально. Молозиво можна застосовувати у якості харчової добавки, включати у схеми лікування та профілактики різних захворювань шлунково-кишкового тракту, імунної системи [53].

1.5 Калюс як тест-система для оцінки дії стресових факторів

1.5.1 Типи стресових факторів, що досліджуються на калюсних культурах

Екстремальні умови здатні викликати пошкодження рослинних клітин, гальмування, порушення та зупинку їх розвитку через зміни у морфологічних, фізіологічних, біохімічних процесах. Наприклад, часто стреси призводять до окисного пошкодження рослинних клітин внаслідок надмірного утворення активних форм кисню (АФК), що, відповідно, викликає посилену роботу системи антиоксидантного захисту [55].

Всі стресові фактори, які можуть впливати на культури рослин *in vitro*, поділяють на абіотичні та біотичні. До абіотичних стресових факторів, дію яких досліджують на калюсних культурах з точки зору загальної реакції, зміни рівнів продукування вторинних метаболітів, дослідження біохімічних і морфологічних механізмів захисту, належить вплив хімічних речовин (важкі метали, солі), високої та низької температури, інтенсивності освітлення, ультрафіолетового випромінювання. Біотичні стресові фактори – це вплив патогенних організмів на рослинні клітини. До них відносять вірусів, бактерій, грибів та їхні метаболіти [56].

У рослин було визначено лімітуючі стресові фактори, які впливають на їх розвиток, врожайність, стійкість тощо. До цих факторів відносять нестачу вологи (посухи), засолення ґрунтів (викликає осмотичний стрес та токсичну дію іонів), несприятливі температури (холод, спека), токсини хімічного походження (важкі метали, пестициди). Біотичні лімітуючі стресові фактори – патогенні організми, що вражають рослин, викликаючи місцеві та системні захворювання (бактерії, гриби, нематоди, комахи). Всі

ці фактори також можливо досліджувати на калюсних культурах в контрольованих умовах, що дає змогу судити про їхній загальний вплив на рослину обраного виду, шукати способи мінімізації впливу стресу на них [57, 58].

1.5.2 Калюсна культура як тест-система при оцінці дії абіотичних стресових факторів: приклади та методи

Методи культивування калюсних культур корисні для оцінки дії стресових факторів, оскільки дозволяють створити контрольовані умови і регулювати їх відповідно меті дослідження. Окрім цього, культивування рослинних клітин *in vitro* дозволяє контролювати рівномірний вплив стресового фактору та проводити характеристику його дії з точки зору поведінки клітин, поза залежністю від регуляторних систем рослинного організму. Оцінюється вплив стресу на калюсну культуру, рівень її толерантності до нього, вивчаються фізико-біохімічні механізми відповіді на стрес.

Такий абіотичний фактор як дефіцит води здатен знизити продуктивність рослин, викликаючи порушення на рівні морфології, фізіології та біохімічних показників, а тривала посуха може призвести до загибелі рослинного організму. Рослинні клітини мають вищі концентрації поживних речовин через знижений тургор клітин. Для моделювання умов дефіциту вологи використовують середовища з додаванням маніту, який викликає осмотичний стрес.

Вплив дефіциту вологи чи посухостійкість обраного виду рослин, клітини якого ввели в культуру *in vitro*, оцінюють за відносною швидкістю росту, накопиченням іонів Na^+ і K^+ , вмісту проліну та особливостями формування пагонів і коренів. Зазначені іони та амінокислота, накопичуючись, виступають як осмопротектори, концентруючись у вакуолях, впливаючи на електричний потенціал клітинної мембрани, утримуючи молекули води [57].

Ультрафіолетове випромінювання типів UV-A, UV-B, UV-C застосовують для перевірки реакції калюсної культури, а також – збільшення продукування нею певних метаболітів, а саме поліфенольних сполук і флавоноїдів. Такі зміни пов’язані з реакцією на стресовий фактор у вигляді утворення вільних радикалів при короткочасній дії ультрафіолетового випромінювання різного типу [56].

Важкі метали, пестициди та інші хімічні речовини, що здатні індукувати стресову реакцію калюсних культур, використовують для дослідження їх морфологічних, біохімічних змін, швидкості росту, стресостійкості та захисних механізмів [56]. Важкі метали (кадмій, олово, свинець, меркурій, мідь, хром, нікель, кобальт і т.д.) здатні накопичуватись у компартментах рослинних клітинах, впливаючи на їхні фізіолого-біохімічні процеси (фотосинтез, осмотичний режим, дихання тощо), викликаючи стресову реакцію та/або загибель рослинного організму через свою токсичність [59].

При дослідженні реакції на важкі метали та інші токсичні хімічні речовини калюсні культури можуть тестуватися на вміст антиоксидантів (наприклад, поліфенольні сполуки – за допомогою спектрофотометра, флавоноїди – колориметричний аналіз, тест на активність поглинання вільних радикалів), досліджуватись стосовно морфологічних змін [56].

Інтенсивне освітлення може виступати стресовим фактором, викликаючи підвищений синтез антиоксидантів калюсною культурою. Це корисно не тільки для отримання даних щодо умов продукування вторинних метаболітів, але і для визначення оптимальних умов культивування калюсу обраного виду рослин [22].

1.5.3 Калюсна культура як тест-система при оцінці дії біотичних стресових факторів: приклади та методи

До біотичних стресових факторів, як вже було зазначено, відносять вплив патогенних організмів та їх метаболітів на рослинний об’єкт чи культуру рослинних клітин *in vitro*. У контексті використання калюсної

культури як тест-системи щодо дії стресу, спричиненого життєдіяльністю організмів, можуть проводити безпосередню гістологічну, біохімічну, морфологічну оцінку наслідків інокуляції культури. Це може бути важливим для дослідження захворювань рослин у контрольованих умовах, загального впливу не тільки патогенних, але і непатогенних організмів. Останнє може бути цінним стосовно отримання вторинних метаболітів з калюсних культур внаслідок використання непатогенних мікроорганізмів як еліситорів [60, 61].

Наприклад, існує дослідження [60] особливостей розвитку аскохітозу (збудник – *Ascochyta rabiei*) у деяких звичайних і стійких сортів нуту *Cicer arietinum*. Це захворювання істотно впливає на урожайність бобових культур, якість, кількість насіння. Воно загрожує багатьом сортам, тому потрібні дані про етапи і особливості розвитку захворювання, механізми захисту рослин, наявність стійких рослин для подальшої селекції з метою виведення стійких до ураження сортів. Результати показали, що у перші 48 годин *Ascochyta rabiei* проникає у калюсну тканину обраного звичайного сорту нуту, проліферуючи у міжклітинному просторі. Тоді як у калюсної культури більш стійкого до аскохітозу сорту було виявлено, що гіфи патогена у міжклітинному просторі розвинені слабо, не проникаючи глибше 2-3 шарів клітин. Було виявлено, що резистентність сорту пов'язана з посиленням виробленням фенольних сполук в клітинах, близьких до міцелію *Ascochyta rabiei*, що призупиняло подальшу колонізацію і утворення великої кількості спор. Таким чином можливе виведення більш стійких до аскохітозу сортів, оскільки відомий механізм резистентності. При проведенні дослідження були взяті і описані гістологічні зрізи калюсних культур, що фарбували 0,05% розчином толуїдинового синього. За допомогою цього барвника було визначено накопичення фенольних сполук у клітинах.

Вже було згадано, що іноді непатогенні організми та екстракти біологічного походження використовують як еліситори, що індукують

стресову реакцію у калюсної культури, викликаючи посилений синтез вторинних метаболітів. Біотичні елісатори можуть мати походження від мікроорганізму (цвілевих грибів, бактерій, дріжджів). Вони або мають чітко визначений склад, такий як полісахариди, глікопротеїни, інактивовані ферменти, чистий хітозан, хітин, альгінат, або складний склад, як у дріжджового екстракту. Наприклад, хітозан у поживному середовищі стимулює синтез ферментів, необхідних для вироблення фенольних сполук калюсними культурами [61].

Під час аналізу наукової літератури останніх років стало відомо, що наразі існують різні методи і цілі проведення біотестування із залученням різноманітних організмів, які виступають у ролі тест-об'єктів. Тестуються елементи навколишнього середовища (грунт, вода з природних джерел, стічні води), харчові продукти, добавки, корми з метою визначення наявності небезпечних сполук і рівня їх токсичності, зрозуміти їх ефекти на тест-об'єкт і мати розуміння того, як це може впливати на інших організмів, які з тих чи інших причин неможливо піддавати прямому контакту з об'єктом, який перевіряється.

Тест-об'єктами можуть бути найпростіші, бактерії, гриби і актиноміцети, водорості, безхребетні, риби, вищі рослини. Рослини як тест-об'єкти використовуються у контексті спостереження впливу зразків, що тестуються, на проростання насіння, особливості будови, розвиток і швидкість їх росту. Також, як відомо з наукових джерел, постійно присутня увага стосовно використання культур рослинних клітин у якості тест-об'єктів.

Калюсна та суспензійна культури можуть бути оптимальними тест-об'єктами для визначення ефектів і рівня токсичності певних сполук. Це пов'язано з тим, що ці два типи культур рослинних клітин мають високу чутливість до компонентів середовищ і стресових факторів, часто є

однорідними, швидко проліферують, культивуються у контрольованих асептичних умовах. Окрім цього, тестування проводиться на рівні окремих клітин, які є дедиференційованими. На відміну від біотестування на рослинах, у яких можлива регуляція процесів завдяки організменному рівню організації, культурі рослинних клітин це не притаманно.

Також було розглянуто поняття біологічно активних добавок, які додають до середовищ культивування калюсної та суспензійної культур. Окрім цього, біологічно активні добавки використовуються і у процесі вирощування рослин. Численні дослідження показали, що добавки біологічного походження до середовищ сприяють кращому приросту біомаси, накопиченню вторинних метаболітів, біохімічним змінам у калюсних культурах. Це часто пов'язано з їх оптимальним складом – високим вмістом необхідних для рослинних клітин поживних сполук.

Серед цих біологічних добавок присутні такі варіанти: кокосова вода, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, солодовий екстракт, молозиво. Всі вони мають різний біохімічний склад, однак дослідження показали, що вони можуть бути важливими компонентами поживних середовищ.

Остання біологічна добавка – молозиво – найбільш відома скоріше як важлива біологічна рідина, яка секретується у ссавців за декілька днів до пологів і після. Молозиво надає новонародженому ссавцю поживні речовини, впливає на формування імунітету, на ріст і розвиток організму. Окрім цього, відоме застосування цієї біологічної рідини у харчовій і медичній галузі – у якості біологічно активних добавок до основного раціону харчування та компоненту терапії деяких захворювань.

Біологічно активні добавки повинні проходити перевірку на токсичність перш ніж потрапляти до споживачів. Існують різні методи тестування цих речовин, серед яких, виходячи з даних наукових досліджень, наявні також методи біотестування. Відповідно, таку біологічно активну

добавку як молозиво можливо тестувати за допомогою ще одного тест-об'єкта – культури рослинних клітин *in vitro*. Це необхідно для виявлення можливих токсичних, стресових ефектів, що можуть чинити вплив на культуру.

Таким чином, ціллю цієї кваліфікаційної роботи є аналіз впливу постказеїнової фракції молозива на калюсну та суспензійну культури, з метою встановлення її ефектів і розгляду культури рослинних клітин *in vitro* як тест-об'єкта для біологічно активних сполук.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Характеристика об'єктів дослідження

2.1.1 Характеристика рослинного матеріалу – насіння гороху посівного *Pisum sativum* L. сорту Гайдук

Горох *Pisum sativum* L. є розповсюдженою культурою в Україні, яка вирощується за різних ґрунтово-кліматичних умов. Його використання є різноманітним – як і у фазі зрілого насіння, так і технічної зрілості: промислове (консервований і свіжий зелений горох, зріле насіння), кормове (корми для сільськогосподарських тварин з подрібнених зерен, а також – горохова солома). Окрім цього, горох посівний має важливе агротехнічне значення – збагачення ґрунту азотом завдяки бульбочковим бактеріями, котрі з'являються на коренях рослини. Відбувається засвоєння азоту з повітря і переведення його у біодоступну форму [62].

Pisum sativum L. або горох посівний – важлива бобова культура, насіння якої є багатим джерелом білків (20-25%), вуглеводів (59-69%, з них крохмаль – 39-46%), вітамінів, біологічно активних сполук, мінеральних речовин. У насінні гороху також містяться поліфенольні сполуки, які зумовлюють забарвлення насінневої оболонки – чим темніша, тим вища концентрація цих речовин.

Білки насіння гороху представлені чотирма категоріями: глобуліном (55-65% від загального білка), альбуміном, проламіном і глютенном. Ці білки мають збалансований вміст амінокислот, і найбільше в них лізину [63].

Сорт Гайдук був внесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні з 2019 року в лісостеповій і степовій зонах. Цей сорт вважається середньостиглим, з тривалістю вегетаційного періоду в 75-81 діб. Висота рослин досягає 55-75 см, тож цей сорт є напівкарликовим. Число міжвузлів до першого суцвіття складає 13-14 [64]. Є стійким до вилягання – здатен зберігати вертикальне положення всупереч несприятливим погодним умовам у вигляді сильних вітрів, дощів, а також –

масі рослини. Стійкість до вилягання важлива, оскільки посіви, які вилягли, ускладнюють збір урожаю, можуть піддаватися процесам гниття, розвитку хвороб [64, 65].

Насіння сорту Гайдук округле, жовтого кольору, маса 1000 зерен складає 220-260 г. Вміст білка – 21-23%, але може сягати і 25%. Вміст ліпідів – приблизно 5%, переважно складаються з поліненасичених жирних кислот [63, 64].

2.1.2 Характеристика препарату молозива корів

Препарат молозива є висушеною постказеїною фракцією, що була отримана в експерименті №2 по осадження казеїну від 12.12.2024 (НДІ ХНУ ім. В.Н. Каразіна). Молозиво від корови S2 фірми «Альфа», надій 30.08.2024 (вигляд рідини: світла, помірно густа). Щільність молозива до знежирення складала 1,14 кг/л, а після знежирення – 1,06 кг/л.

Знежирення проводилось за допомогою центрифугування. Обладнання: центрифуга ЦЛС-31М, при 3000 об/хв протягом 15 хвилин.

Було також виміряно електропровідність до та після знежирення (позначка 1.1 – до знежирення, 1.2 – після знежирення. По горизонталі графіка – частота, виміряна в Гц, по вертикалі – питома електрична провідність в Ом/м).

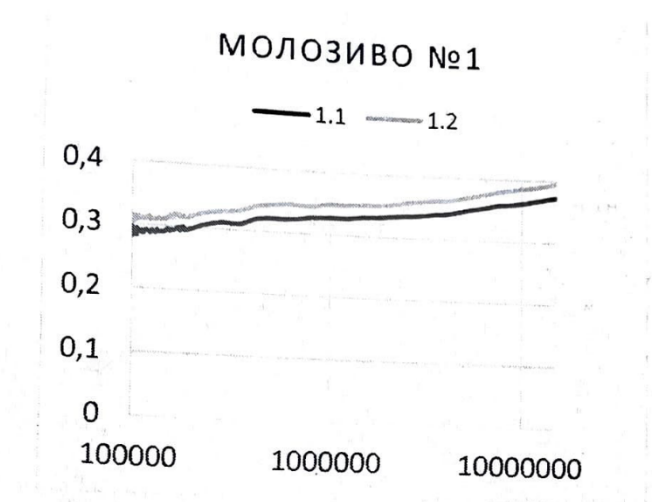


Рис. 2.1 Електропровідність молозива до (1.1) та після (1.2) проведення знежирення

Осадження казеїну проводилось шляхом доведення рН молозива до 4,6 за допомогою додавання 1Н оцтової кислоти з використанням магнітної мішалки. При цьому вихідне значення рН молозива після знежирення складало 6,8.

Отримані розчини знаходились 30 хв при 20°C, а потім – 2 години при 4-5°C у холодильнику. Спостерігалось видиме розшарування розчину і випадіння осаду. Осадження казеїну відбулося за допомогою центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хвилин.

Вміст сухих речовин в рідкій постказеїновій фракції до висушування складав 46,8 г/л. Тобто препарат масою 1,10 г містився у 23,5 мл рідкої постказеїнової фракції. Кількість сухої маси речовини постказеїнової фракції відносно маси всього вихідного зразка молозива складала 16,6%.

Визначено спектр поглинання в діапазоні 200-400 нм рідкої постказеїнової фракції при розведенні 1:10:

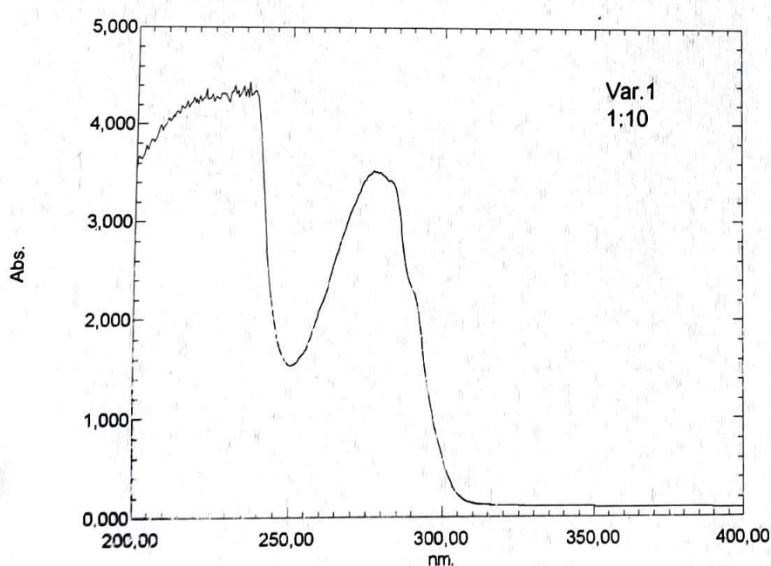


Рис. 2.2. Спектр поглинання рідкої постказеїнової фракції (розведення 1:10) в діапазоні 200-400 нм.

Постказеїнова фракція молозива, яку отримують шляхом знежирення і осадження казеїну, містить низькомолекулярні компоненти, серед яких присутні пептиди, амінокислоти, фактори росту на інші сполуки. Ці

компоненти чинять різноманітні ефекти на біологічні системи. До складу постказеїнової фракції входять білки з різною молекулярною масою – від 5 до 8 кДА. Також можуть бути присутні слідові концентрації РНК [66].

2.1.3 Характеристика суспензійної культури

Суспензійна культура – окремі клітини або їх агрегати, які культивують у рідкому поживному середовищі за умов постійного перемішування, а також аерації. Типовим способом отримання суспензійної культури рослинних клітин є занурення пухкого калюсу певної маси (2-3 г) у рідке середовище (60-100 мл). Оптимальним є використання саме пухкого калюсу, оскільки він легко фрагментується на окремі клітини та клітинні агрегати. Склад живильного середовища для суспензійної культури часто є таким ж, як і для отримання калюсної культури, з додаванням ауксинів (наприклад, 2,4-Д) [19, 67].

Суспензійна культура хорошої якості характеризується високим ступенем дезагрегації (групи клітин мають по 5-10 клітин) і морфологічними характеристиками клітин, серед яких – невеликі розміри клітин, які є сферичної чи овальної форми, з щільною цитоплазмою, загальна однорідність клітин) і високою швидкістю розмноження. Крива росту є S-подібною, має шість фаз: латентну, експоненціальну, фазу лінійного росту, уповільненого росту, стаціонарну та фазу деградації. Особливості кривої росту залежать від характеристик рослини, з якої було взято експлант для отримання калюсної тканини, від кількості інокулюму, умов культивування [67].

Суспензійні культури можуть характеризувати за декількома параметрами: сирою та сухою масою для моніторингу росту суспензії клітин; загальною кількістю клітин або щільністю культури, яку визначають за допомогою лічильної камери; біохімічними показниками (проводять визначення вмісту розчинних цукрів та білків); життєздатністю клітин; ступенем агрегованості; обсягом осаджених клітин [18, 68].

Суспензійні культури на практиці використовують як і для отримання вторинних метаболітів, так і для проведення біохімічних, молекулярно-біологічних досліджень, оскільки на метаболізм і ростові процеси рослинних клітин у суспензійній культурі легше впливати різними чинниками. Вивчаються метаболічні шляхи, ферментативна активність, експресія певних генів, реакція на компоненти середовища тощо [19].

Для проведення дослідження було отримано суспензійну культуру *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Для цього спочатку отримали калюсну культуру, використовуючи у якості експланту сім'ядолі насіння гороху. Для введення в суспензійну культуру використовували первинний калюс та калюс 1-го пасажу на свіже поживне середовище МС + 10 мг/л 2,4-Д.

Первинний калюс та калюс після 1-го пасажу можна було класифікувати за щільністю як твердий, від світло-жовтого до коричневого кольору. Відомо, що для отримання суспензійної культури використовують пухкий, розсипчастий калюс, який розпадається на окремі клітини та їх агрегати [19]. У цьому випадку було використано подрібнений щільний калюс, хоча зазвичай застосовується калюс більш пухкої структури [18]. Час культивування суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук – 6 тижнів, від її створення до аналізу за певними показниками.

2.1.4 Характеристика калюсної культури

Калюсну культуру для цього дослідження отримували з експлантів, які представляли сім'ядолі насіння *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Спочатку їх розміщували на агаризованому середовищі для індукції калюсогенезу.

Для культивування калюсу на середовищі з додаванням різних концентрацій препарату молозива корів (постказеїнової фракції) було взято калюс 1-го пасажу, що також був спочатку утворений на експлантах насіння *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Його характеристику див. 2.1.1.

Калюсну культуру можна досліджувати за наступними показниками: морфологічні параметри (колір, щільність, інтенсивність зростання, здатність до позеленіння), цитологічними – наприклад, кількість клітин в 1

г калюсу, біохімічні показники (вміст розчинних білків та вуглеводів), ростова реакція [18]. У цьому дослідженні визначається ростова реакція калюсу (площа калюсу) на середовище з препаратом молозива корів (постказеїнова фракція) та вміст легкорозчинного білку.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Біотехнологічні методи

Приготування середовища для отримання первинного калюсу. Базовим середовищем для індукції утворення первинного калюсу на експлантах рослин є середовище Мурасіге-Скуга (МС). Середовище складається з мікро- та макросолей, Fe-хелату, вітамінів, агар-агару та інших речовин. У Додатку Б наведені точні концентрації необхідних речовин для маточних розчинів мікро-та макросолей на 100 мл та 1 л розчину відповідно.

Приготування маточних розчинів. Наважки кожної макросолі зважують та розчиняють у 1л дистильованої води, кожної мікросолі – у 100 мл дистильованої води, отримуючи таким чином 5 і 7 розчинів відповідно. Далі їх зберігають у холодильнику при 2-4 °С протягом одного місяця.

Розчин Fe-хелату готується наступним чином: наважки $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (557 мг) та $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (745 мг) розчиняють окремо у дистильованій воді, доводять до 100 мл, зливають і доводять до кипіння. Після охолодження зберігають при 2-4 °С у холодильнику протягом одного місяця.

Також готуються маточні розчини вітамінів та фітогормонів, у концентраціях 1 мг/мл.

У середовищі МС також присутні мезоінозит та сахароза. Наважки мезоінозиту (100 мг) та сахарози (30 г) окремо розчиняють у дистильованій воді.

Таким чином, на 1 л середовища Мурасіге-Скуга необхідні наступні компоненти:

- По 100 мл кожного маточного розчину макросолей;
- По 1 мл – мікросолей;
- Fe-хелат – 5 мл;
- В1 – 1 мг (1 мл маточного розчину)
- В6 – 1 мг (1 мл маточного розчину)
- РР – 0,5 мг (0,5 мл маточного розчину)
- Сахароза та мезоінозит

Вказані компоненти поєднують у колбі або склянці на 1 л. рН доводять до 6,6-6,8 за допомогою 1Н КОН або 1Н НСІ. Готують наважку агар-агару масою 7 г (заливають холодною водою об'ємом 50-100 мл і залишають на 20 хв). . Готовий розчин додають до об'єму середовища і доводять його дистильованою водою до мітки в 1 л.

Середовище розливають у колби для автоклавовання, закривають ватно-марлевими пробками. Стерилізація відбувається під тиском 0,8-1 атм та температурі 115-120°C протягом 20-30 хв.

Стерилізація рослинного матеріалу. Обов'язково проводять обробку поверхонь ламінар-боксу стерилізаційними розчинами, 70% етанолом, УФ-випромінюванням до моменту здійснення маніпуляцій, що потребують стерильних умов. Інструменти, що використовуються, повинні знаходитись у склянці з 70% етанолом, який змінюють після завершення роботи. Всі дії здійснюються за полум'ям спиртового пальника, після обробки рук 70% етанолом. Інструменти необхідно стерилізувати у полум'ї пальника після кожної маніпуляції.

Рослинний матеріал – насіння гороху *Pisum sativum* L. сорту Гайдук – поміщають у марлеві мішечки і зав'язують ниткою. Далі кладуть у

лабораторні склянки з мильним розчином з метою промивання від пилу і часточок з використанням шейкера. Промивають проточною водою.

Наступний етап – обробка 70% етанолом протягом 1 хвилини 15 секунд, з метою стерилізації та видалення воскової плівки з насіння. Подальша стерилізація відбувається за допомогою гіпохлориду натрію (комерційний розчин препарату «Білизна» у концентрації 15-30%) протягом 15 хвилин. Далі розчин зливали, наливали у лабораторні склянки стерильну дистильовану воду, витримували 10 хвилин, повторювали ще два рази.

Отримання первинної калюсної культури з насіння рослин. У якості експлантів було обрано сім'ядолі гороху *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Простерилізоване насіння у мішечку з марлі виклали на внутрішню поверхню стерильної чашки Петрі, яка є робочою поверхнею. Насіння гороху звільнили від плівки стерильними пінцетом та скальпелем, розділили на сім'ядолі, зробили на кожній по 3-4 поверхневих надрізи і виклали на середовище МС + 10 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л гліцину у стерильних чашках Петрі. Чашки Петрі поставили у термостат за температури 26°C без доступу світла.

Субкультивування калюсної культури. Через 5 тижнів було досягнуто оптимального рівню калюсу на експлантах гороху для субкультивування. Було використано аналогічне середовище до того, що готувалося для отримання первинного калюсу.

Калюс переноситься на стерильну внутрішню поверхню чашки Петрі в умовах ламінар-боксу. Від його маси відділяються сім'ядолі та зародки. Калюс ділять навпіл та розташовують на середовищі у чашках Петрі у оптимальній кількості. Культивування відбувалось у термостаті за температури 26°C без доступу світла протягом 2,5 тижнів.

Приготування маточного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції). Отримали наважку масою 45 мг висушеного

препарату молозива (постказеїнової фракції) на торсіонних вагах. У якості розчинника була використана стерильна дистильована вода об'ємом 45 мл. Шляхом енергійного розмішування, струшування досягли максимального розчинення. Таким чином, була отримана концентрація 1 мг/мл постказеїнової фракції молозива.

Приготування середовища для суспензійної калюсної культури. Для культивування суспензійної калюсної культури необхідне рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС). Тобто, під час його приготування відсутній етап додавання агар-агару, а всі інші етапи були виконані так само.

Автоклавоване середовище розливають по чотирьом колбам Ерленмейера, які були висушені і стерилізовані у сушильній шафі при 160-170°C протягом 1-1,5 год. Колби закривають стерилізованими ватно-марлевими пробками.

Таким чином, отримали наступні колби з середовищем:

1. Контроль: МС+5 мг/л 2,4-Д;
2. МС+5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції);
3. МС+5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції);
4. МС+5 мг/л 2,4-Д+10 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції).

Введення калюсу до суспензійної культури на середовищі з препаратом молозива (постказеїнова фракція). У кожному з чотирьох колб Ерленмейера з об'ємом середовища 100 мл додавали по 2 г калюсу. Калюс 1-го пасажу виклали на стерильну внутрішню поверхню чашки Петрі, а її розташували на електронних вагах. Далі калюс подрібнювали на шматочки 5×5 мм. Ці фрагменти поміщали у колби з середовищем.

Колби з суспензійними культурами розмістили на шейкері при 250 об/хв за постійної роботи, за кімнатної температури.

Отримання калюсної культури на середовищі з препаратом молозива (постказеїнова фракція). Для отримання калюсної культури на середовищі з препаратом молозива (постказеїнова фракція) спочатку було підготовлене і розлите у чашки Петрі середовище Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням 2,4-Д та препарату молозива (постказеїнова фракція).

Таким чином, отримали наступні чашки Петрі з середовищем:

1. Контроль: МС+5 мг/л 2,4-Д;
2. МС+5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції);
3. МС+5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції);
4. МС+5 мг/л 2,4-Д+10 мг/л водного розчину препарату молозива (постказеїнової фракції).

Використовували первинний калюс та калюс 1-го пасажу. Калюс переносили на стерильну чашку Петрі, відділяли сім'ядолі і зародки, ділили навпіл, розкладали на середовищі. Культивування відбувалось у термостаті за температури 26°C без доступу світла.

2.2.2 Біохімічні методи

Визначення вмісту водорозчинних білків за методом Бредфорда. Вміст водорозчинних білків було визначено за методом Бредфорда [70], з використанням реактиву Кумасі. Метод заснований на зв'язуванні реактиву Coomassie brilliant blue G-250 з амінокислотними залишками білків – у першу чергу з аргініном, а також з гістидином, тирозином, триптофаном, фенілаланіном. При зв'язуванні барвника з амінокислотними залишками

відбувається зсув максимуму поглинання з 465 нм (поглинання у вільного барвника) до 595 нм (поглинання у зв'язаного барвника).

Для здійснення екстракції білків осаджені клітини (у випадку суспензійної культури) і калюс (у випадку калюсної культури) було гомогенізовано у фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4). Гомогенат інкубували протягом 1 години, після чого центрифугували при 8000 об/хв протягом 10 хв. Утворену надосадову рідину використовували для визначення вмісту білків.

У пробірки переносили по 0,2 мл екстракту, додавали 0,8 мл буферу, 1 мл реактиву Кумасі (кімнатної температури). Інкубували при кімнатній температурі 10 хв. Контроль: пробірка з 0,8 мл буферу, 1 мл реактиву Кумасі. Оптичну щільність розчинів визначали, використовуючи фотоелектроколориметр КФК-2МП при довжині хвилі 595 нм. Вміст білків розраховували за калібрувальним графіком, що був побудований на бичачому сироватковому альбумін (виробник: «Хімлаборреактив»).

Формула розрахунку вмісту білків:

$$A = \frac{(c \times V)}{(V_1 \times m)}$$

де А – вміст білків, мг/мл;

с – концентрація білка у дослідному розчині, визначена за калібрувальним графіком, мг/мл;

V – загальний об'єм витяжки, мл;

V¹ – об'єм витяжки взятий для аналізу, мл

m – маса наважки, г.

Визначення вмісту фенолів і флавоноїдів. Визначення цих сполук відбувалось наступним чином [71]. Спочатку зразки калюсу (калюсна культура) масою 0,5 г було гомогенізовано у ступці зі 100% ацетоном. Ним же було доведено зразки у пробірках до мітки 5 мл. Зразки закрили фольгою і інкубували протягом 1 години, після чого центрифугували при 8000 об/хв

протягом 10 хв. Утворену надосадову рідину використовували для визначення вмісту фенолів і флавоноїдів.

Для визначення фенолів підготували наступні реактиви: лужний розчин карбонату натрію Na_2CO_3 (7,5%), реактив Фоліна-Чокальта ч.д.а. (виробник: «Хімлаборреактив»), 96% етанол. До дослідних пробірок додавали по 500 мкл витяжки, 2,5 мл дистильованої води, 250 мкл реактиву Фоліна, 750 мкл 7,5% Na_2CO_3 . Оптичну щільність визначали через 30 хв після інкубації, використовуючи фотоелектроколориметр КФК-2МП при довжині хвилі 760 нм. Калібрувальний графік складали за пірокатехіном, визначали за ним вміст фенолів у 1 мл витяжки. Проводили перерахунки за розведенням і виражали у мкг/г.

Для визначення флавоноїдів готували наступні реактиви: 5% NaNO_2 , 10% AlCl_3 , 1М NaOH . До дослідних пробірок додавали по 2 мл витяжки, 150 мкл 5% NaNO_2 (витримували 5 хв), 150 мкл 10% AlCl_3 (витримували 6 хв), 1 мл 1М NaOH . Оптичну щільність визначали, використовуючи фотоелектроколориметр КФК-2МП при довжині хвилі 510 нм. Калібрувальний графік складали за кверцетином, визначали за ним вміст фенолів у 1 мл витяжки. Проводили перерахунки за розведенням і виражали у мкг/г.

2.2.3 Цитологічні методи

Визначення щільності клітин у суспензійній культурі. Підрахунок кількості клітин або щільності клітин у суспензійній культурі проводили за допомогою лічильної камери Горяєва [18]. Параметри камери, яку було використано: довжина сторони малого квадрату – 0,05 мм, довжина сторони великого квадрату – 0,2 мм, глибина камери – 0,1 мм. Об'єм суспензії клітин для підрахунку – 5 мкл на кожену площадку. Кількість клітин було підраховано у 5 великих квадратах, тричі, у різних полях зору, для кожного варіанта.

Формула для підрахунку щільності суспензійної культури:

$$X = \frac{M}{4} \times 10^6$$

де X – щільність суспензійної культури, кл/мл

M – середня кількість клітин у 5 квадратах камери Горяєва.

Визначення життєздатності клітин у суспензійній культурі.

Життєздатність клітин визначали фарбуванням метиленовим синім 0,1% [18]. Відомо, що цей барвник проникає у мертві клітини, оскільки у них порушена цілісність клітинних мембран, і тому визначити нежиттєздатні клітини легко завдяки набуття ними яскравого забарвлення. Тоді як на живі клітини метиленовий синій не діє [72].

На предметне скельце наносили аліквоту суспензійної культури об'ємом 100 мкл, додавали 10 мкл барвника та 10 мкл дистильованої води. Накривали покривним скельцем, притискали, збирали зайву рідину. Проводили підрахунки кількості життєздатних і нежиттєздатних клітин у п'яти полях зору на варіант, визначали їх відсоток (%) у кожному полі зору, а також відношення життєздатних і нежиттєздатних клітин.

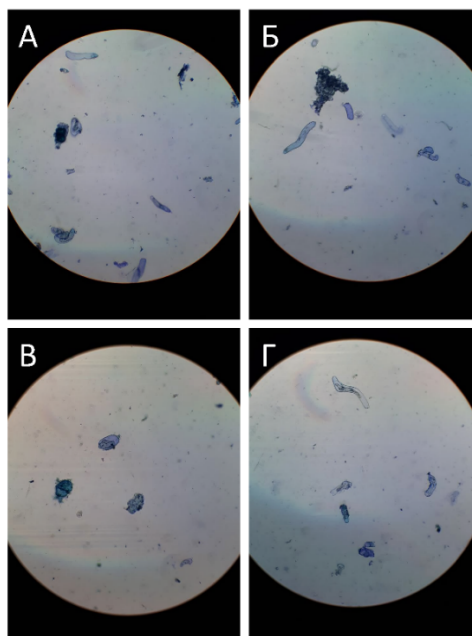


Рис. 2.3 Визначення життєздатності суспензійної культури. А – контроль; Б – концентрація препарату молозива 0,1 мг/л у середовищі; В – концентрація препарату молозива 1 мг/л; Г – концентрація препарату молозива 10 мг/л

Визначення площі клітин у суспензійній культурі. Площі клітин було визначено за допомогою програмного забезпечення ImageJ [73]. Було обрано інструмент «Polygon selection» для більш точного обведення меж клітин на фотознімках. Було отримано результати у пікселях (пікс²), однак це програмне забезпечення дозволяє виставити довжину певного відрізка у обраних одиницях вимірювання, тож було отримано результат у мкм².

Визначення обсягу осаджених клітин (ООК) у суспензійній культурі. У центрифужні пробірки (по дві на варіант) було відібрано аліквоти об'ємом 10 мл кожного варіанту. Далі їх центрифугували при 3000 об/хв протягом 8 хвилин. Надосадову рідину відбирали, визначали об'єм осаду, розраховували ООК (%) [18].

Визначення площі калюсу у калюсній культурі. Площі калюсу було визначено за допомогою програмного забезпечення ImageJ [73]. Було обрано інструмент «Polygon selection» для більш точного обведення меж калюсу на фотознімках. Було отримано результати у пікселях (пікс²), однак це програмне забезпечення дозволяє виставити довжину певного відрізка у обраних одиницях вимірювання, тож було отримано результат у мм².

Визначення відносного приросту площі калюсу. Ростовий індекс (PI). Відносний приріст площі калюсу [18] визначається за формулою:

$$\Delta S = \frac{S_t - S_0}{S_0} \times 100\%$$

де ΔS – відносний приріст площі калюсу

S_0 – початкова площа калюсу, см²

S_t – кінцева площа калюсу, см²

3.6 Статистичні методи

Статистичну обробку отриманих даних було проведено у програмному забезпеченні Microsoft Excel 2021 (повна назва – Microsoft Office Excel 2021).

Середнє арифметичне розраховане за формулою:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 \dots x_n}{n}$$

де \bar{x} – середнє значення;

x_n – значення з вибірки;

n – загальна кількість вимірювань.

Стандартне відхилення розраховане за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

де \bar{x} – середнє значення;

x_n – значення з вибірки;

n – загальна кількість вимірювань.

Стандартна помилка розрахована за формулою:

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$$

де σ – стандартне відхилення;

n – загальна кількість вимірювань.

Для визначення статистичної значущості відмінностей між експериментальними групами та контролем використовувався t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Оскільки проводилося множинне порівняння, було застосовано поправку Бонфероні для корекції рівня значущості. Обчислення проводилися з використанням програмного забезпечення Statistica (StatSoft). Враховуючи чотири варіанти, що порівнюються, скориговане значення рівня значущості становило 0,017. Результати вважалися статистично значущими при $p < 0,017$.

Розрахунки і статистична обробка результатів проводились стосовно щільності клітин в культурі, життєздатності клітин, площі клітин, площі калюсу, відносного приросту площі калюсу, аналізу суспензійної культури

(обсяг осаджених клітин (ООК), вміст розчинного білку у біомасі клітин), аналізу калюсної культури (вміст розчинного білку у біомасі клітин, вміст фенолів і флавоноїдів).

2.3 Дизайн дослідження

Дослідження було експериментальним та спрямованим на вивчення впливу різних концентрацій препарату молозива корів (постказеїнова фракція) на ростову реакцію, цитологічні, біохімічні показники суспензійної та калюсної культур *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Метою цього є оцінка використання молозива корів (а саме – постказеїнової фракції) як біологічно активної добавки до поживного середовища для культивування калюсної та суспензійної культури *Pisum sativum* L. Водночас досліджувалось використання суспензійної культури як тест-об'єкта у тестуванні біологічно активних речовин.

До середовищ культивування додавали препарат молозива корів (постказеїнова фракція) у концентраціях 0, 0,1, 1, 10 мг/л. Протягом періоду культивування проводилось дослідження щільності, життєздатності, морфології клітин (визначення площі, форми клітин) суспензійної культури; стосовно калюсної культури визначали площу калюсу; по завершенню культивування було визначено вміст легкокорозчинного білка, обсяг осаджених клітин (ООК).

Для початку було отримано первинну калюсну культуру шляхом введення експлантів насіння гороху *Pisum sativum* L. сорту Гайдук в культуру *in vitro*. На одній чашці Петрі з агаризованим середовищем для індукції калюсогенезу (МС + 10 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л гліцину) розташовували по 10-14 сім'ядоль насіння, кількість чашок Петрі – 4. Через 5 тижнів відбулося субкультивування на свіже поживне середовище такого ж складу. Кількість калюсів на одну чашку Петрі – 10-11. Кількість чашок Петрі – 4. Цей калюс було використано для отримання суспензійної культури, тож для отримання калюсної культури на середовищі з різними концентраціями

препарату молозива знову було введено до культури *in vitro* цілі насінини гороху у кількості 16-18 на одну чашку Петрі (загалом було 4 чашки Петрі). Всі інші дії були виконані аналогічно.

У суспензійну культуру вводили первинний калюс і калюс 1-го пасажу масою 2 г на одну колбу Ерленмейера. Використовувалось рідке поживне середовище МС+5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л, 1 мг/л та 10 мг/л водного розчину препарату постказеїнової фракції молозива. Таким чином, було отримано 4 колби Ерленмейера з суспензійною культурою. Одна колба є контролем, з наступним складом поживного середовища: МС+5 мг/л 2,4-Д. Культивування відбувалось протягом 6-ти тижнів. Починаючи з 2-го тижня культивування відбирались аліквоти для підрахунку кількості клітин у 1 мл середовища (щільність культури), життєздатності клітин, фотографування клітин під мікроскопом для обробки за допомогою програмного забезпечення ImageJ – для визначення площ клітин. Наприкінці 6-го тижня культивування було відібрано аліквоти для аналізу суспензійної культури щодо обсягу осаджених клітин (ООК) та вмісту легкорозчинного білку.

Для отримання калюсної культури на агаризованому середовищі з препаратом молозива (постказеїнова фракція) було використано калюс 1-го пасажу. Калюс у кількості 5-10 пасували на поживне середовище зі складом: МС+5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л, 1 мг/л та 10 мг/л водного розчину препарату постказеїнової фракції молозива. Одна чашка Петрі була контролем (МС+5 мг/л 2,4-Д). Таким чином, було отримано чотири варіанти по дві чашки Петрі на кожен. Культивування відбувалось протягом 5-ти тижнів. Калюсну культуру аналізували за зміною площ калюсу за допомогою програмного забезпечення ImageJ декілька разів протягом всього періоду культивування. Наприкінці 5-го тижня культивування провели аналіз культури шляхом визначення вмісту білку, фенолів та флавоноїдів; визначили відносний приріст площі калюсу.

Для статистичної обробки даних використовували середнє арифметичне, стандартне відхилення за допомогою програмного

забезпечення Microsoft Excel 2021. Для визначення істотності відмінностей експериментальних груп з контролем використовувався t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок з поправкою Бонфероні ($p < 0,017$) для корекції рівня значущості. Обчислення проводилися з використанням програмного забезпечення Statistica (StatSoft).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив молозива (потсказеїнової фракції) на калюсну культуру

3.1.1 Морфологічний аналіз калюсної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук за впливу препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища

У *контрольному варіанті* калюс був компактним, мав щільну структуру, світло-коричневий колір. Елементи морфогенезу спостерігались у 15,38% калюсу.

Концентрація препарату молозива 0,1 мг/л. Калюс компактний, мав щільну структуру, світло-коричневий колір з ділянками блідо-жовтого кольору. Елементи морфогенезу спостерігались у 62,50% калюсу.

Концентрація препарату молозива 1 мг/л. Калюс був компактним, мав щільну структуру, світло-коричневий колір з ділянками блідо-жовтого кольору. Елементи морфогенезу спостерігались у 50% калюсу.

Концентрація препарату молозива 10 мг/л. В чашці Петрі №1 калюс був компактним, мав щільну структуру, коричневий колір з світло-коричневими ділянками. Елементи морфогенезу спостерігались у 57,14% калюсу. В чашці Петрі №2 калюс мав дещо пухку структуру середньої щільності, блідо-жовтий колір. Елементи морфогенезу спостерігались у 14,29% калюсу.

Найвищий відсоток морфогенезу спостерігався у калюсу, який культивувався на середовищі з концентрацією препарату молозива 0,1 мг/л. Калюс в усіх варіантах мав здебільшого щільну структуру, світло-коричневий колір. У варіанті з концентрацією препарату молозива 10 мг/л в одній з чашок Петрі калюс відрізнявся від калюсу в іншій ї у тому ж варіанті. У контрольному варіанті спостерігався найнижчий відсоток морфогенезу у порівнянні з іншими варіантами.

Таблиця 3.1.

**Морфологічна характеристика калюсних тканин за дії препарату
МОЛОЗИВА**

Варіант	Колір	Щільність	Структура	Морфогенез, %
Контроль	Світло-коричневий	Щільний	Компактна, гетерогенна	15,38
+ 0,1 мг/л	Світло-коричневий з ділянками блідо-жовтого кольору	Щільний	Компактна, гетерогенна	62,50
+ 1 мг/л	Світло-коричневий з ділянками блідо-жовтого кольору	Щільний	Компактна, гетерогенна	50
+ 10 мг/л	Коричневий з світло-коричневими ділянками; блідо-жовтий	Щільний; середньої щільності	Компактна, гетерогенна	57,14; 14,29

Більш темний колір зумовлений накопиченням поліфенольних сполук, може говорити про зниження здатності клітин до поділу, старіння і пригнічення культури. Щільна структура калюсу може вказувати на знижену проліферацію клітин [19, 23, 26].

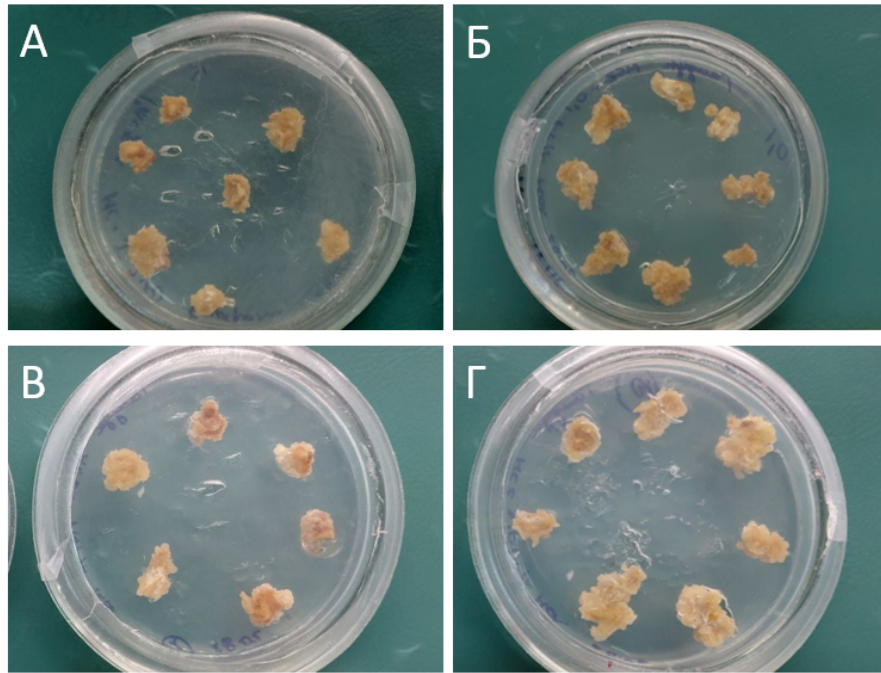


Рис. 3.1. Калюсна культура *Pisum sativum* L. сорту Гайдук наприкінці 5 тижня культивування. А – контроль; Б – концентрація препарату молозива 0,1 мг/л у середовищі; В – концентрація препарату молозива 1 мг/л; Г – концентрація препарату молозива 10 мг/л

3.1.2 Ростова реакція пересадкової калюсної культури за дії постказейнової фракції молозива як компонента поживного середовища

Зміна площі калюсу. У всіх варіантах спостерігалось зростання площі калюсу, окрім контрольного – зростання площі виявилось незначним і після 2-го тижня культивування площа не збільшувалась. Найбільше зростання спостерігалось у варіанті з концентрацією препарату молозива 10 мг/л, досягнувши максимуму наприкінці культивування. Подібне спостерігалось і у варіантах з концентрацією 0,1 і 1 мг/л (Табл. 3.2, Рис.3.2).

Таблиця 3.2.

Вплив компонентів молозива на площу калюсу у калюсній культурі *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, мм²

Варіант	Дата аналізу				Відносний приріст площі калюсної культури
	07.03.2025	11.03.2025	22.03.2025	01.04.2025	
Контроль**	72,16±7,32	78,9±8,08	78,79±7,65	79,97±6,79	10,82%
+ 0,1 мг/л	102,26±7,1	108,39±7,17	110,11±7,94	129,48±8,38	26,61%*
+ 1 мг/л	65,7±4,96	102,66±6,81	101,34±5,53	117,03±5,33	78,13%*
+ 10 мг/л	72,91±6,24	87,98±8,85	118,52±11,78	133,35±14,99	82,89%*

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

***) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

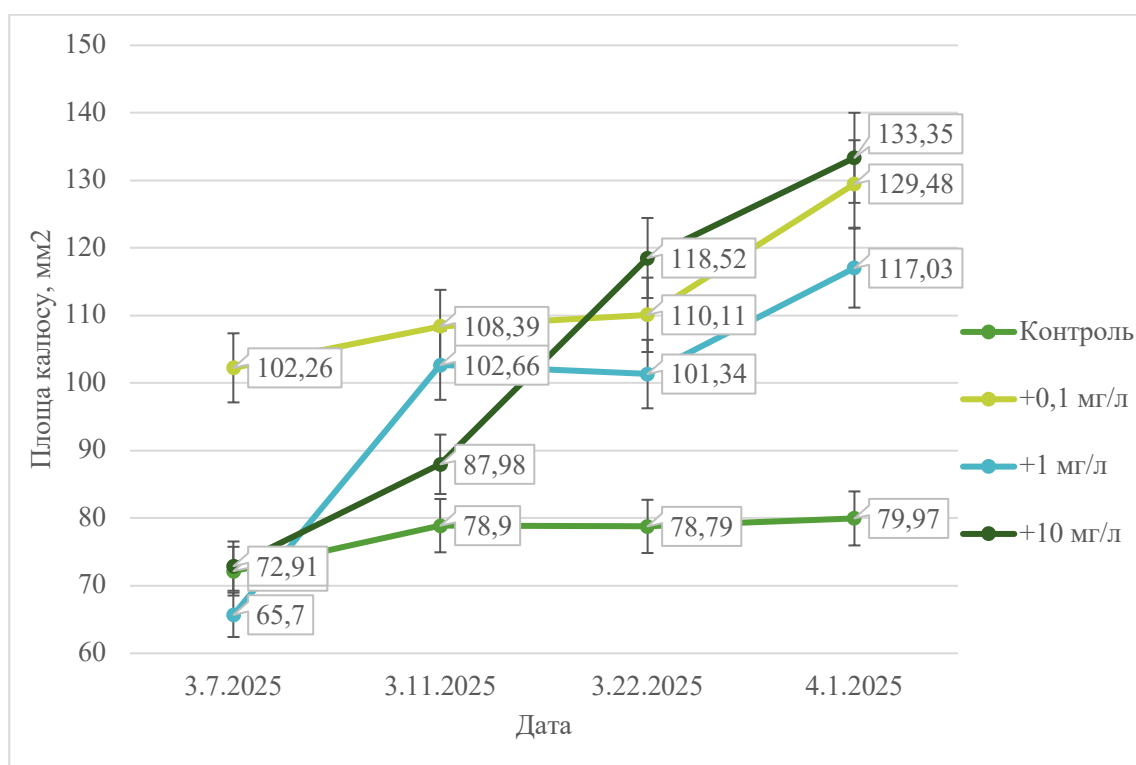


Рис. 3.2. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на площу калюсу у калюсній культурі *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, мм²

Було виявлено, що зі збільшенням концентрації препарату молозива у поживному середовищі збільшувалась і площа калюсу. Таким чином, компоненти постказеїнової фракції стимулювали калюсну культуру, викликаючи посилену проліферацію клітин калюсу.

Ростовий індекс (PI). Спостерігались істотні відмінності відносного приросту площі калюсу (у %) у порівнянні з контролем у всіх варіантах з препаратом молозива у середовищі (Табл. 3.3). Найвищі значення відносного приросту площі мали варіанти з концентрацією препарату 1 та 10 мг/л.

Таблиця 3.3.

**Відносний приріст площі калюсної культури *Pisum sativum* L. сорту
Гайдук, %**

Варіант	Дата аналізу		
	11.03.2025	22.03.2025	01.04.2025
Контроль*	9,34	-0,14	1,50
+ 0,1 мг/л	5,99	1,59	17,59
+ 1 мг/л	56,26	-1,29	15,48
+ 10 мг/л	20,67	34,71	12,51

*) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

Аналізуючи відносний приріст площі калюсу у динаміці, можна відмітити, що його найвищі показники спостерігались приблизно на 2-му тижні культивування (Табл. 3.2, Рис. 3.3). Надалі відбулося уповільнення відносного приросту площі калюсу, окрім варіанту з концентрацією препарату 10 мг/л. Наприкінці культивування спостерігалось збільшення цього показника у варіантах з концентрацією препарату 0,1 та 1 мг/л. Ймовірно, така динаміка пов'язана з різною за інтенсивністю стимулюючою дією компонентів препарату молозива, а також з їх вичерпанням протягом культивування.

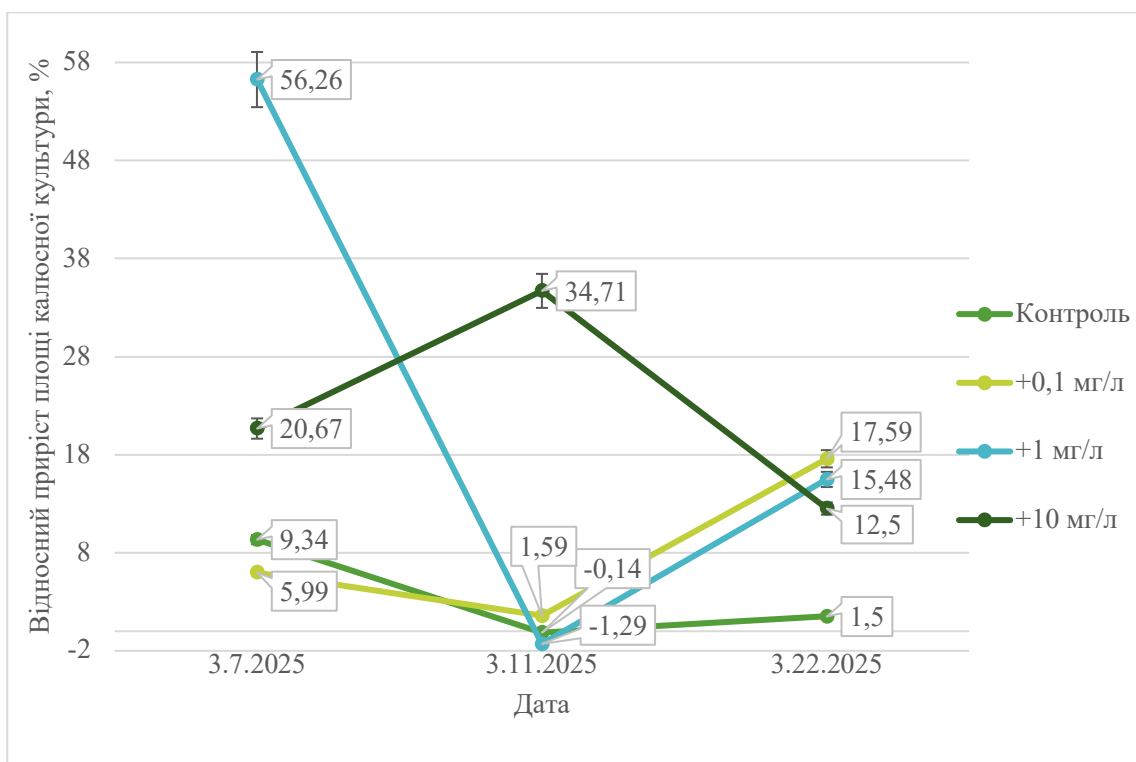


Рис. 3.3. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на відносний приріст площі калюсу у калюсній культурі *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, %

3.7 Вплив препарату молозива різних концентрацій на біосинтетичну активність пересадкової калюсної культури

Розчинний білок. Істотні відмінності з контролем у вмісті розчинного білку у біомасі клітин калюсної культури спостерігались у варіантів з концентрацією препарату молозива 0,1 та 1 мг/л. Знижений вміст білку спостерігався у варіантах з концентрацією препарату 0,1 та 10 мг/л. Найвищий вміст білку спостерігався у варіанті з концентрацією препарату 1 мг/л (Табл. 3.4 і Рис. 3.4)

**Вміст розчинного білку у біомасі клітин калюсної культури
гороху посівного сорту Гайдук, мг/г біомаси**

Варіант	Розчинні білки, мг/г біомаси
Контроль**	6,79±0,01
+0,1 мг/л	4,26±0,42*
+1 мг/л	7,07±0,18*
+10 мг/л	1,28±1,15

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4

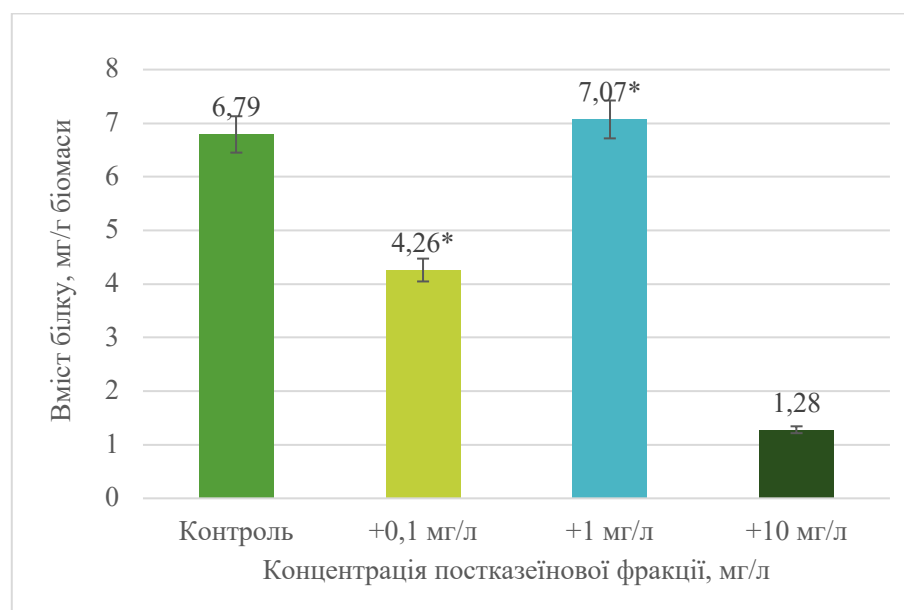


Рис. 3.4. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на вміст розчинного білку у калюсній культурі *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, мг/г біомаси

Феноли та флавоноїди. Вміст фенолів у калюсній культурі істотно відрізнявся від контролю у варіантах з концентрацією препарату молозива 0,1 та 1 мг/л. Дещо знижений вміст фенолів спостерігався у варіанті з концентрацією препарату 10 мг/л (Табл. 3.5, Рис. 3.5).

Таблиця 3.5.

**Вміст фенолів у біомасі клітин калюсної культури гороху
посівного сорту Гайдук, мкг/г біомаси**

Варіант	Феноли, мкг/г біомаси
Контроль**	396,5±5,7
+0,1 мг/л	466,5±8,6*
+1 мг/л	468,2±3,8*
+10 мг/л	393,2±14,2

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4

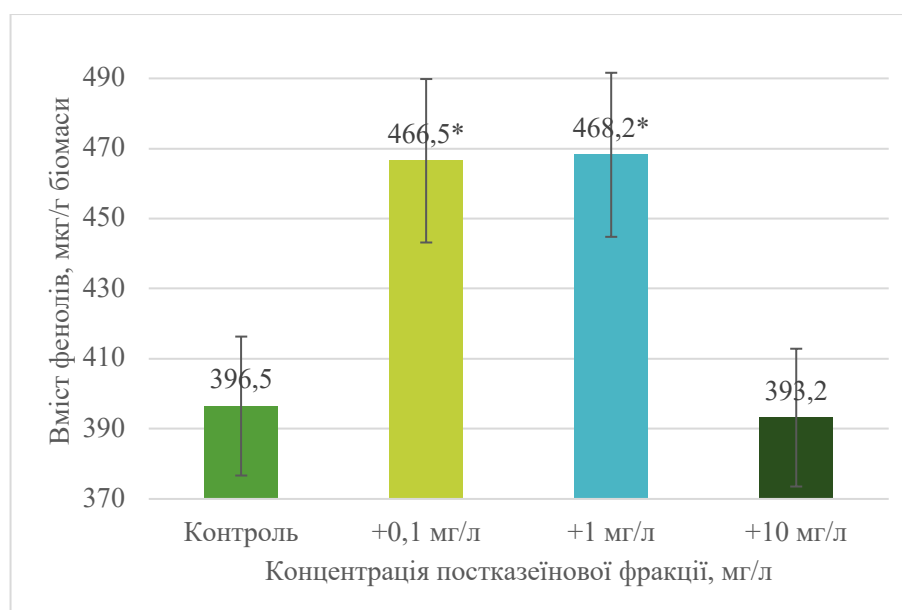


Рис. 3.5. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на вміст фенолів у калюсній культурі *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, мкг/г біомаси

Вміст флавоноїдів у калюсній культурі істотно відрізнявся від контролю у варіанті з концентрацією препарату молозива 1 мг/л (Табл. 3.6, Рис. 3.6)

**Вміст флавоноїдів у біомасі клітин калюсної культури гороху
посівного сорту Гайдук, мкг/г біомаси**

Варіант	Флавоноїди, мкг/г біомаси
Контроль**	13,3±0,48
+0,1 мг/л	11,3±0,03
+1 мг/л	16,3±0,29*
+10 мг/л	12,3±1,21

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4

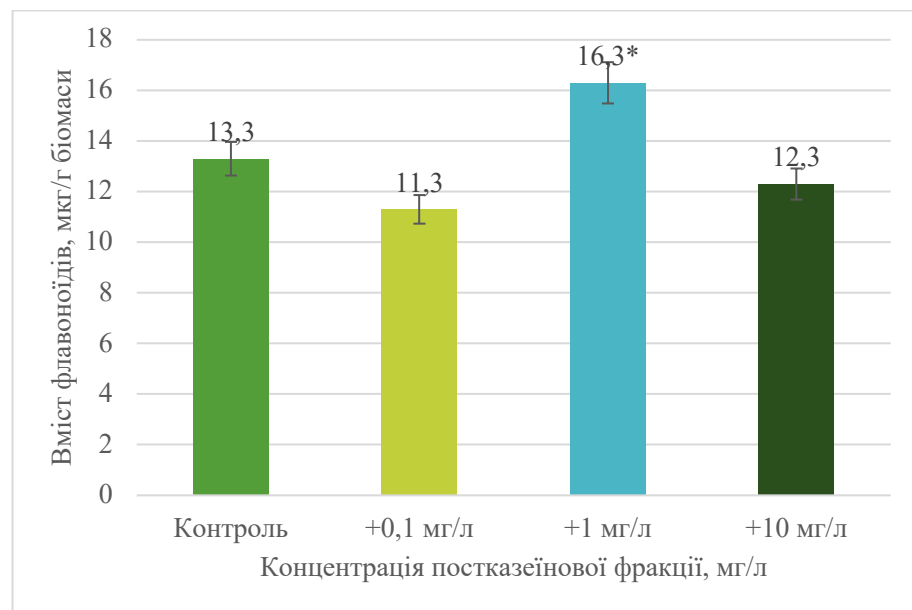


Рис. 3.6. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на вміст флавоноїдів у калюсній культурі *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, мкг/г біомаси

Фенольні сполуки та флавоноїди (підклас поліфенольних сполук) використовуються рослинами для захисту від активних форм кисню. Підвищений біосинтез флавоноїдів зазвичай відбувається у відповідь на стресові умови середовища і безпосередньо не пов'язаний з ростом і розвитком рослинних тканин. Зростання вмісту фенольних сполук

відбувається, згідно досліджень, під час росту і стабілізації калюсних культур [74, 75]. Підвищений вміст фенольних сполук також пов'язують зі старінням і пригніченням метаболізму калюсної культури [19, 23].

3.2 Вплив молозива (постсказеїнової фракції) на суспензійну культуру *in vitro*

3.2.1 Аналіз морфології клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук за впливу препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища

У *контрольному варіанті* спостерігались здебільшого середні і великі клітини, сильно вакуолізовані. Утворювали дрібні агрегати з декількох клітин. Форма клітин – червоподібна, видовжена.

Концентрація препарату молозива 0,1 мг/л. Спостерігались клітини здебільшого середніх розмірів, але були присутні і великі. Сильно вакуолізовані, червоподібні клітини. У полях зору були присутні дрібні агрегати клітин.

Концентрація препарату молозива 1 мг/л. Клітини здебільшого дрібних розмірів, округлої форми, але зустрічались і дрібні червоподібні клітини. У полі зору спостерігалось помітне зменшення кількості клітин у порівнянні з контролем та варіантом з концентрацією препарату 0,1 мг/л. Клітини поодинокі.

Концентрація препарату молозива 10 мг/л. Клітини дрібних розмірів, округлої форми, однак зустрічались великі червоподібні клітини, що сильно вакуолізовані. У полі зору спостерігалось помітне зменшення кількості клітин у порівнянні з контролем та варіантами з концентрацією препарату 0,1 та 1 мг/л. Клітини поодинокі.

**Морфологічна характеристика суспензійної культури за дії препарату
МОЛОЗИВА**

Варіант	Розмір клітин	Форма клітин	Особливості будови клітин	Агрегованість культури
Контроль	Середні і великі	Червоподібна, видовжена	Сильно вакуолізовані	Низька
+ 0,1 мг/л	Здебільшого середні, є великі	Округла	Сильно вакуолізовані	Середня
+ 1 мг/л	Дрібні	Округла, є червоподібної форми	Менш вакуолізовані	Низька, поодинокі клітини
+ 10 мг/л	Дрібні, є великі	Округла, є червоподібної форми	Менш вакуолізовані, присутні сильно вакуолізовані	Низька, поодинокі клітини

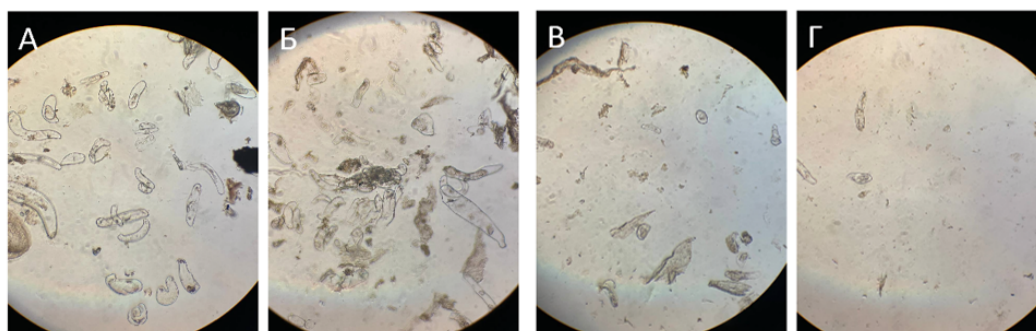


Рис. 3.7. Морфологія клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. А – контрольний варіант; Б – за концентрації препарату молозива 0,1 мг/л у середовищі; В – за концентрації препарату молозива 1 мг/л; Г – за концентрації препарату молозива 10 мг/л

3.2.2 Динаміка росту суспензійної культури за дії препарату молозива різних концентрацій у складі поживного середовища

Щільність. Було проведено визначення щільності суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Встановлено, що найвище значення щільності спостерігалось при концентрації препарату молозива 0,1 мг/л у поживному середовищі на 4-му тижні культивування (Табл. 3.8 Рис. 3.8). Також високе значення щільності спостерігалось у контрольному варіанті, досягнувши піку на 4-му тижні культивування, стрімко знижуючись згодом. Виходячи з цього, можна говорити про стимулюючу дію на щільність суспензійної культури концентрації препарату молозива 0,1 мг/л.

Таблиця 3.8.

**Вплив компонентів молозива на щільність суспензійної культури
Pisum sativum L. сорту Гайдук, 10^5 клітин / мл**

Варіант	Дата аналізу		
	11.02.2025	26.02.2025	07.03.2025
Контроль**	4,17±0,14	4,33±0,49	3,17±0,14
+ 0,1 мг/л	4,75±0,18*	5,33±0,95	4,17±0,14*
+ 1 мг/л	3,00±0,00*	3,17±0,44	3,67±2,17
+ 10 мг/л	3,25±0,18*	3,17±0,61	3,17±0,17

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

***) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

При концентрації препарату молозива 1 мг/л спостерігалось повільне зростання щільності суспензійної культури від початку культивування.

При концентрації препарату молозива 10 мг/л спостерігалась виражене інгібування суспензійної культури. Тобто щільність не зростала, знижувалась протягом культивування, її значення були найнижчими за інших концентрацій препарату молозива. Ймовірно, компоненти постказеїнової фракції низької молекулярної маси у більш високій концентрації здатні пригнічувати ростові процеси суспензійної культури.

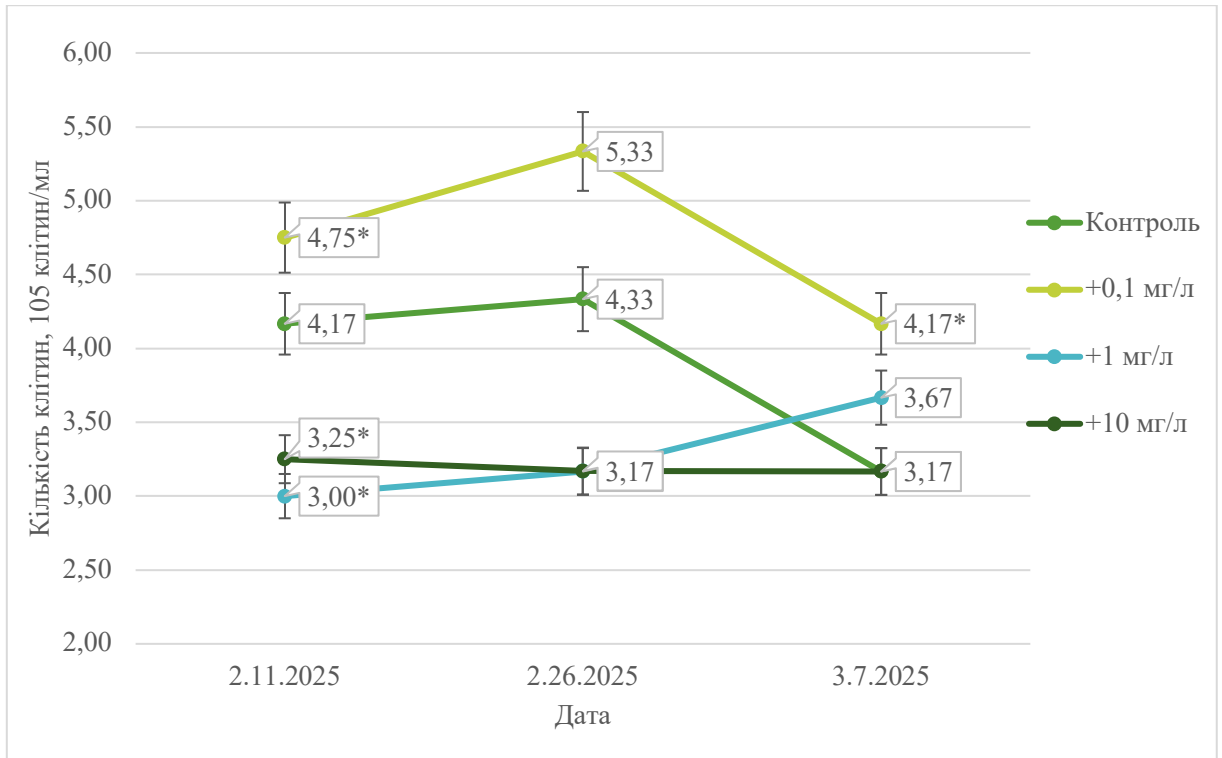


Рис. 3.8. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на щільність суспензійної культури *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, 10^5 клітин/мл

Таким чином, концентрація препарату молозива 0,1 мг/л стимулювала суспензійну культуру, сприяючи зростанню її щільності.

Розмір клітин. Визначення площ клітин показало, що клітини суспензійної культури демонструють максимальні розміри при наявності у середовищі препарату молозива у концентрації 0,1 мг/л на 4-му тижні культивування. У контрольному варіанті також спостерігалось збільшення розмірів клітин у аналогічний період культивування. Варіанти з концентрацією препарату молозива 1 та 10 мг/л продемонстрували менші розміри клітин у порівнянні з іншими варіантами (Табл. 3.9, Рис 3.9).

Таблиця 3.9.

Вплив компонентів молозива на площу клітин суспензійної культури

Pisum sativum L. сорту Гайдук, $\times 10^3$ мкм²

Варіант	Дата аналізу			
	11.02.2025	21.02.2025	26.02.2025	07.03.2025
Контроль**	2,51 ± 0,64	4,11 ± 0,64	6,59 ± 1,91	4,36 ± 1,31
+ 0,1 мг/л	2,46 ± 0,7	2,13 ± 0,64	8,41 ± 4,32	5,06 ± 0,72
+ 1 мг/л	1,15 ± 0,1*	1,86 ± 0,48*	2,51 ± 0,33*	2,56 ± 0,43
+ 10 мг/л	1,51 ± 1,18	1,23 ± 0,18*	2,83 ± 0,55*	2,35 ± 0,82

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

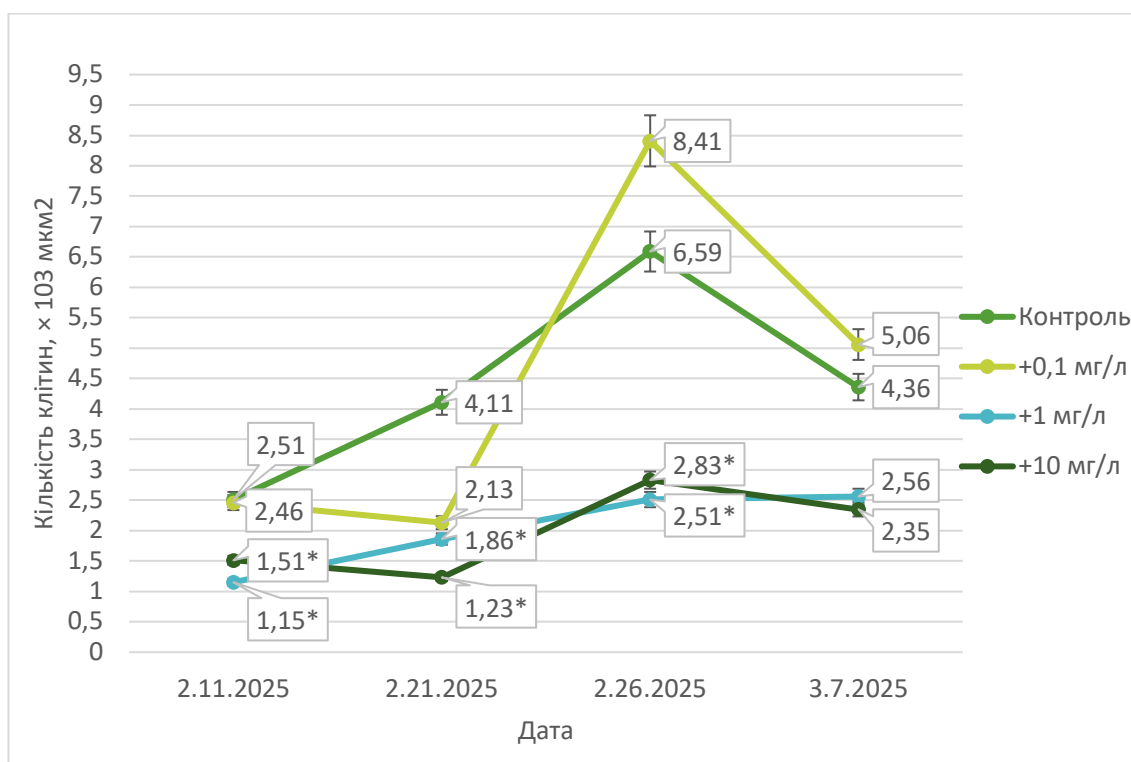


Рис. 3.9. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на площі клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, $\times 10^3$ мкм²

Ріст або збільшення рослинних клітин є наслідком їх перебування у сприятливих умовах, високої швидкості метаболізму та стабільного синтезу макромолекул [76]. Враховуючи результати стосовно щільності

суспензійної культури, можна припустити, що за концентрації препарату молозива 0,1 мг/л були створені оптимальні і сприятливі умови для росту, метаболічної активності і поділу клітин суспензійної культури.

Життєздатність (вітальність) клітин. Зростання життєздатності суспензійної культури спостерігалось як і у контролі, так і за всіх концентрацій препарату молозива у поживному середовищі (Табл. 3.10, Рис. 3.10). Найкраще стимулювання життєздатності спостерігалось за концентрації препарату 10 мг/л. За концентрації препарату 0,1 мг/л також спостерігались високі показники життєздатності культури, причому приблизно з 4-го тижня культивування і до його завершення життєздатність суттєво не знизилась.

Таблиця 3.10.

Вплив компонентів молозива на життєздатність клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, %

Варіант	Дата аналізу		
	11.02.2025	26.02.2025	07.03.2025
Контроль**	23,33±10,9%	69,33±4,73%	80,5±5,93%
+ 0,1 мг/л	40±21,91%	82±9,96%	81,23±7,69%
+ 1 мг/л	30±17,89%	70±17,89%	63,33±9,14%
+ 10 мг/л	66,67±17%*	87,62±6,81%*	73,9±8,42%

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

У контрольному варіанті життєздатність суспензійної культури продовжувала зростати до кінця культивування. У варіанті з концентрацією препарату молозива 1 мг/л після 4-го тижня культивування спостерігалось зниження життєздатності клітин до найнижчого рівня серед інших дослідних варіантів.

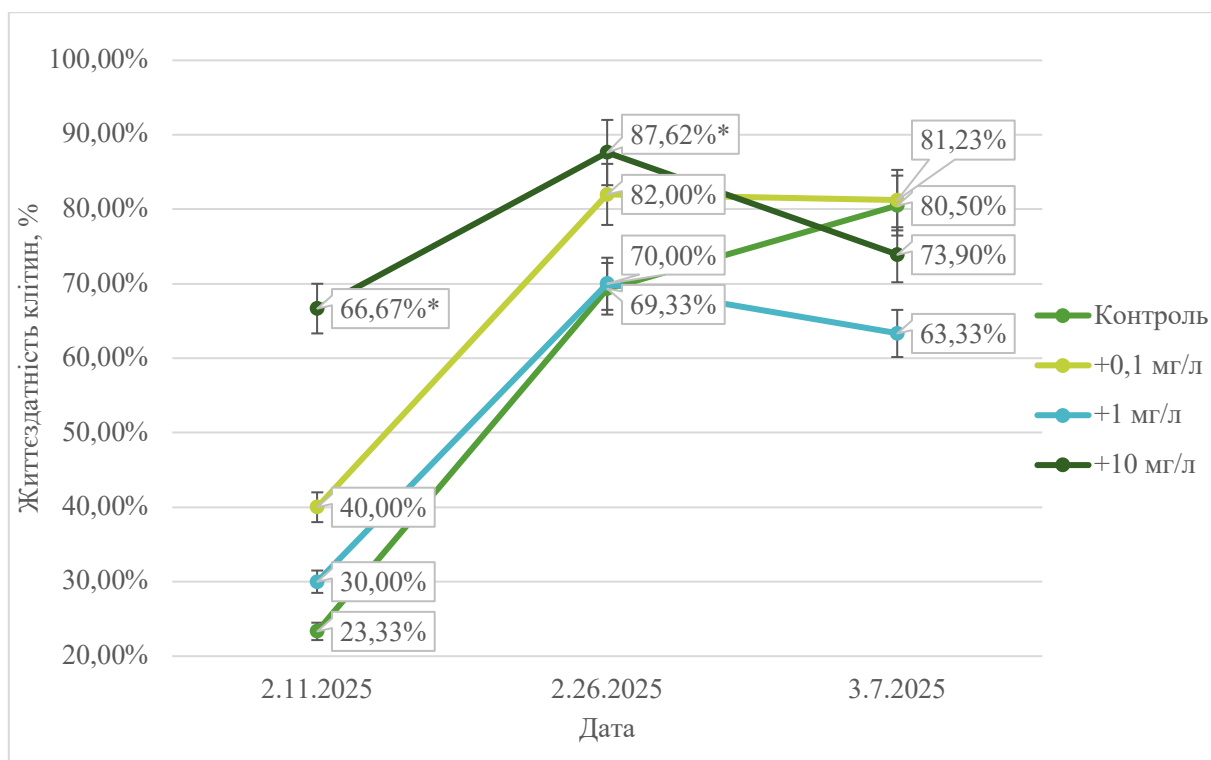


Рис. 3.10. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на життєздатність суспензійної культури *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, %

Таблиця 3.11

Вплив компонентів молозива на співвідношення життєздатних/нежиттєздатних клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук

Варіант	Дата аналізу		
	11.02.2025	26.02.2025	07.03.2025
Контроль*	0,30	2,26	4,13
+ 0,1 мг/л	0,67	2,73	4,33
+ 1 мг/л	0,43	2,33	1,73
+ 10 мг/л	5,00	7,08	2,83

*) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4 D

Загалом співвідношення життєздатних і нежиттєздатних клітин суспензійної культури було низьким станом на 2-й тиждень культивування, однак за концентрації препарату 10 мг/л спостерігались суттєві відмінності

за цим показником у порівнянні з іншими дослідними варіантами – співвідношення виявилось вищим (Табл. 3.11). Такий ж ефект спостерігався і на 4-му тижні культивування. Найвище співвідношення життєздатних і нежиттєздатних клітин у всіх варіантах, окрім варіанту з концентрацією препарату молозива 10 мг/л, спостерігалось наприкінці культивування.

Отже, було показано, що компоненти препарату молозива у найвищій дослідній концентрації – 10 мг/л – стимулюють життєздатність суспензійної культури. Окрім цього, стимулюючий ефект здійснювала і найнижча концентрація – 0,1 мг/л. Серед всіх варіантів лише у контролі спостерігалось подальше зростання життєздатності клітин до моменту завершення культивування.

Обсяг осаджених клітин (ООК). По завершенню культивування суспензійної культури було визначено обсяг осаджених клітин (ООК, %). Було показано, що при концентрації препарату молозива 10 мг/л було істотне інгібування росту у порівнянні з контролем. За концентрацій препарату 0,1 та 1 мг/л спостерігались найвищі значення ООК (Табл. 3.12, Рис. 3.11).

Таблиця 3.12.

Вплив компонентів молозива на обсяг осаджених клітин (ООК) 6-ти тижневої суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук, %

Варіант	ООК, %
Контроль**	3,38 ± 2,38
+ 0,1 мг/л	3,98 ± 2,79
+ 1 мг/л	3,98 ± 2,87
+ 10 мг/л	0,52 ± 0,46*

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

**) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4

Згідно наукових досліджень [77], вищий відсоток ООК свідчить про більший приріст біомаси за рахунок активного поділу клітин. Таким чином, у всіх варіантах, окрім варіанту з концентрацією препарату молозива 10 мг/л спостерігалась вища інтенсивність ростових процесів протягом періоду культивування.

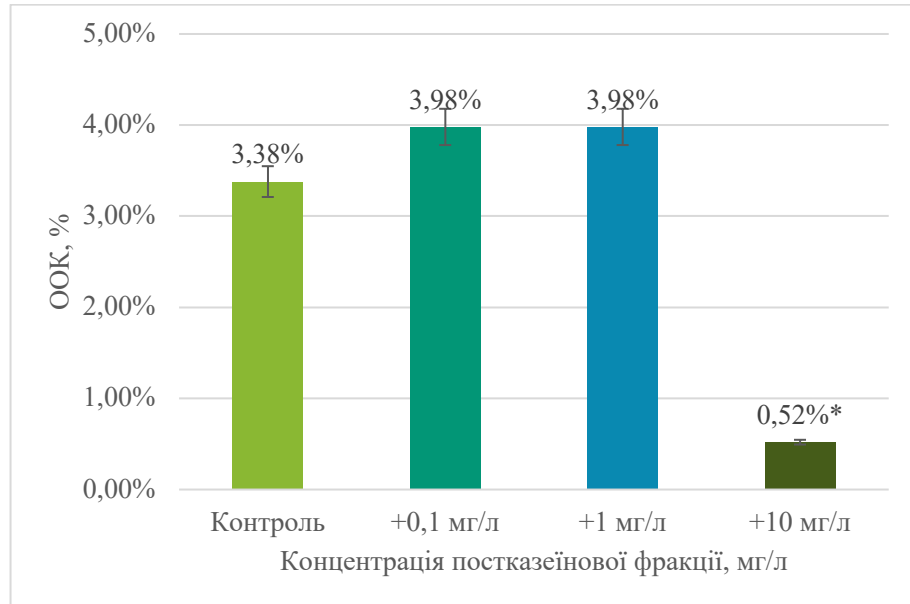


Рис. 3.11. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на обсяг осаджених клітин (ООК) суспензійної культури *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, %

3.2.3 Вплив препарату молозива різних концентрацій на біосинтетичну активність пересадкової калюсної культури

Розчинний білок. За всіх концентрацій препарату молозива спостерігалось зниження вмісту розчинних білків у порівнянні з контролем, де спостерігався їх найвищий вміст (Табл. 3.13, Рис. 3.12). Істотне зниження вмісту білків продемонстрував варіант з концентрацією препарату молозива 10 мг/л.

Таблиця 3.13.

**Вміст розчинного білка у біомасі клітин суспензійної культури гороху
посівного сорту Гайдук, мг/г біомаси**

Варіант	Розчинні білки, мг/г біомаси
Контроль**	15,62±0,5
+0,1 мг/л	10,32±0,5
+1 мг/л	10,7±0,9
+10 мг/л	7,89±0,2*

*) відмінності з контрольним варіантом істотні за $P \leq 0,017$

***) – склад поживного середовища МС + 5 мг /л 2,4

Це може бути пов'язано зі зниженням біосинтетичної активності на користь посилення ростових процесів. Загалом зростання вмісту розчинного білку свідчить про те, що відбувається посилення росту і метаболічної активності культури рослинних клітин у відповідь на склад поживного середовища [78].

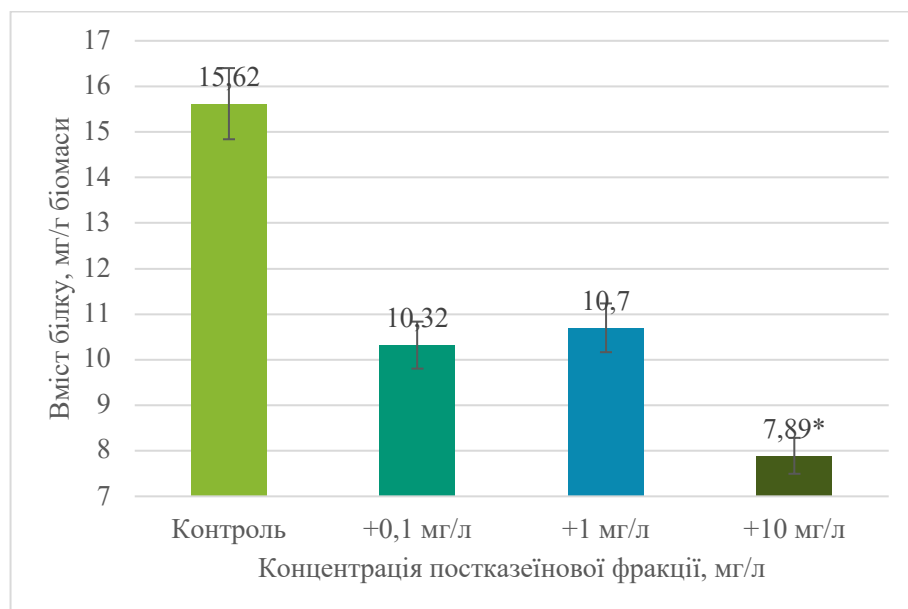


Рис. 3.12. Вплив компонентів препарату молозива концентрацією 0, 0,1, 1 і 10 мг/л на вміст розчинного білка у біомасі клітин суспензійної культури *Pisum sativum* L. Сорту Гайдук, мг/г біомаси

3.3 Порівняльний аналіз впливу препарату молозива на ростову реакцію калюсної та суспензійної культури

У калюсній культурі *Pisum sativum* L. сорту Гайдук спостерігались наступні ефекти: за найвищої концентрації препарату молозива у поживному середовищі – 10 мг/л – спостерігалась найбільша площа калюсу наприкінці культивування. Тобто відбулося стимулювання ростової реакції калюсної культури за високих значень концентрації препарату. За концентрацій пепарату 0,1 та 1 мг/л теж спостерігалось стимулювання збільшення площі калюсу. Відносний приріст площі калюсу був найвищим за концентрації препарату молозива 10 мг/л, однак за всіх дослідних концентрацій спостерігались істотні відмінності з контролем. Біосинтетична активність калюсної культури характеризувалась збільшенням вмісту розчинного білку за концентрації препарату 1 мг/л, зменшення – при 0,1 та 10 мг/л; найбільший вміст фенолів спостерігався за концентрацій 0,1 та 1 мг/л; вміст флавоноїдів у варіанті з концентрацією 1 мг/л істотно відрізнявся від контролю.

У Табл. 3.14 наведений аналіз зміни показників калюсної культури за дії препарату молозива у поживному середовищі.

Таблиця 3.14.

Аналіз зміни показників калюсної культури за дії препарату молозива (ростовий цикл – 28 діб)

Параметри	Зміна до контролю, %		
	0,1 мг/л	1 мг/л	10 мг/л
Площа калюсу	+61,91	+46,34	+66,75
РІ	+145,93	+622,09	+666,08
Білок	-37,26	+4,12	-81,15
Феноли	+17,65	+22,62	+17,65
Флавоноїди	-15,04	+22,56	-7,52

Виходячи з цих даних, можна відмітити, що у всіх варіантах з препаратом молозива у середовищі наявне збільшення площі калюсу у порівнянні з контролем. Максимальне збільшення спостерігалось за впливу концентрації препарату молозива 10 мг/л (+66,75%). Також спостерігалось виражене зростання ростового індексу (PI) за всіх концентрацій препарату молозива, однак найвищим воно було при 10 мг/л (+666,08%). Найвища зміна до контролю стосовно вмісту розчинного білку спостерігалась за концентрації препарату молозива 1 мг/л, тоді як за концентрацій 0,1 та 10 мг/л спостерігалось різке зниження вмісту білку, з найменшим значенням (-87,15%) при 10 мг/л препарату молозива. Загалом спостерігались суттєві коливання вмісту розчинного білку. Підвищення вмісту фенолів і флавоноїдів у порівнянні з контролем спостерігалась за концентрації препарату молозива 1 мг/л. Причому у фенолів підвищення відбувалось за всіх дослідних концентрацій, а у флавоноїдів це мало нерівномірний характер, набуваючи зниження за концентрації препарату молозива 0,1 мг/л та 10 мг/л.

Було встановлено, що на ростову реакцію суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук позитивний вплив чинять низькі концентрації препарату молозива. Відмічались вища щільність, більші розміри і високий відсоток життєздатних клітин у варіанті з концентрацією препарату молозива 0,1 мг/л у середовищі. Показник обсягу осаджених клітин (ООК) також продемонстрував стимулювання ростової реакції культури за цієї концентрації. За концентрації препарату 10 мг/л спостерігалось інгібування ростової реакції, яке виражалось у зниженні щільності культури, дрібних розмірах клітин, найнижчому значенні ООК. Однак встановлено, що ця концентрація найкраще стимулювала життєздатність суспензійної культури у порівнянні з іншими варіантами. Концентрація препарату 1 мг/л за деякими параметрами (щільність, розміри клітин) теж інгібувала культуру. Стосовно біосинтетичної активності (вміст розчинного білку): відмічено її

пригнічення за всіх дослідних концентрацій препарату молозива. Це свідчить про зниження біосинтетичних процесів на користь ростових.

У Табл. 3.15 наведений аналіз зміни показників суспензійної культури за дії препарату молозива у поживному середовищі.

Таблиця 3.15.

Аналіз зміни показників суспензійної культури за дії препарату молозива (ростовий цикл – 24 доби)

Параметри	Зміна до контролю, %		
	0,1 мг/л	1 мг/л	10 мг/л
Щільність	+31,55	+15,77	+0,00
Розмір клітин	+16,06	-41,28	-46,10
Життєздатність	+1,47	-20,89	-7,68
ООК	+17,75	+17,75	-84,62
Білок	-33,93	-31,50	-49,49

Виходячи з даних, зазначених у таблиці, можна охарактеризувати реакцію суспензійної культури на препарат молозива у середовищі. Відмічається зростання щільності культури (+31,55%) за концентрації препарату молозива 0,1 мг/л, і цей показник знижується у інших варіантах, і при концентрації 10 мг/л щільність культури по завершенню ростового циклу була на рівні контролю. Життєздатність клітин незначно збільшувалась у порівнянні з контролем при концентрації препарату 0,1 мг/л (+1,47%). У інших варіантах вона знижувалась. Збільшення розмірів клітин спостерігалось за концентрації препарату молозива 0,1 мг/л, але за 1 та 10 мг/л розміри клітин зменшувались (-41,28 та -46,10% відповідно). Обсяг осаджених клітин (ООК) різко зменшився у порівнянні з контролем (-84,62%). Біосинтетична активність (вміст розчинного білку), як вже було зазначено, знижувався за всіх концентрацій препарату молозива у порівнянні з контролем.

Повертаючись до теми кваліфікаційної роботи, суспензійну культуру, завдяки результатам, можна охарактеризувати як тест-об'єкт для біологічно активних речовин. За нашими результатами суспензійна культура *Pisum sativum* L. сорту Гайдук виявилась чутливою щодо додавання різних концентрацій препарату молозива (постказеїнова фракція). Оскільки чітко помітне інгібування культури при збільшенні концентрації препарату, що, виходячи з визначення поняття «тест-об'єкт», говорить про негативний вплив на ростову реакцію і біосинтетичну активність суспензійної культури. Це можна пояснити властивостями суспензійної культури: клітини оточені рідким поживним середовищем, завдяки чому відбувається їх прями́й контакт з його компонентами і чітка реакція на них, що залежить від концентрації досліджуваної речовини; середовище культивування є однорідним, асептичним, його основні параметри контролюються.

Якщо розглядати препарат молозива у якості біостимулятора росту калюсної та суспензійної культур, можна відмітити стимулюючий ефект збільшення концентрації препарату молозива у калюсній культурі. Натомість суспензійна культура зазнає інгібування. Для суспензійної культури оптимальними виявились більш низькі концентрації препарату молозива – вони стимулювали ростову реакцію, однак біосинтетична активність знижувалась. У випадку калюсної культури препарат молозива дійсно мав ефект біостимулятора – компонента поживного середовища, який чинить позитивну дію на культуру рослинних клітин. Тому молозиво (а саме – постказеїнова фракція) зокрема може бути застосовано як біологічно активна добавка до поживних середовищ культур рослинних клітин *in vitro*, враховуючи реакцію калюсної та суспензійної культур *Pisum sativum* L. сорту Гайдук на різні його концентрації.

ВИСНОВКИ

1. Було введено в культуру *in vitro* та отримано пересадкову калюсну та суспензійну культури *Pisum sativum* L.
2. Вплив препарату молозива різних концентрацій (0, 0,1, 1 та 10 мг/л) на калюсну культуру *Pisum sativum* L. можна охарактеризувати як стимулюючий, оскільки, виходячи з результатів, спостерігалось зростання площі, ростового індексу зі збільшенням його концентрації у поживному середовищі.
3. Спостерігалось зниження біосинтетичної активності калюсної культури за більш високих концентрацій препарату молозива.
4. Препарат молозива викликав у суспензійної культури *Pisum sativum* L. інгібування ростової реакції та біосинтетичної активності зі збільшенням його концентрації. Однак низький вміст препарату у середовищі стимулював культуру.
5. Порівнюючи калюсну та суспензійну культуру, можна зробити висновок, що суспензійна культура виступає кращим тест-об'єктом завдяки отриманим результатам щодо впливу різних концентрацій препарату молозива, а також завдяки її властивостям. Окрім цього, було визначено, що препарат молозива має властивості біостимулятора, який можливо застосовувати для стимулювання ростової реакції культур рослинних клітин *in vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Маленко Я.В., Ворошилова Н.В., Кобрюшко О.О., Перерва В.В. Загальна екологія: навчальний посібник. Кривий Ріг: КДПУ. 2023. 231 с. URL: <https://elibrary.kdpu.edu.ua/bitstream/123456789/7093/1/%D0%9F%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D0%BA.pdf> (дата звернення 26.12.2024)
2. Бондарчук І.Ю. Застосування методів біотестування при оцінці якості довкілля. *Сучасні проблеми екології*: Тези XII Всеукраїнської наукової on-line конференції студентів, магістрів та аспірантів з міжнародною участю, 17 травня 2016 р. Житомир, 2016. С. 19. URL: <https://conf.ztu.edu.ua/wp-content/uploads/2016/07/14.pdf> (дата звернення 26.12.2024)
3. Никифоров В.В., Дігтяр С.В., Мазницька О.В., Козловська Т.Ф. Біоіндикація та біотестування: навчальний посібник. Кременчук: Видавництво ПП Щенбатих О.В. 2016. 76 с. URL: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/398031/mod_resource/content/1/B_V.pdf (дата звернення: 26.12.2024)
4. Козар М. Ю., Зубченко Л.С. Екобіотехнологія та біоенергетика: Лабораторний практикум: навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» та 163 «Біомедична інженерія». Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського. 2021. 63с. URL: <https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/d4fee558-8bc5-4e5a-9dbedbc8a29fc1c9/content> (дата звернення 26.12.2024)
5. Наг І., Ажай S. Kalamdhad A. S. Phytotoxicity and cyto-genotoxicity evaluation of organic and inorganic pollutants containing petroleum refinery wastewater using plant bioassay // *Environmental Technology & Innovation*. Vol. 23. 2021. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186421002996> (дата звернення 26.12.2024)

6. Тригуб В. І., Домусчи С. В. Біотестування як метод дослідження токсичності ґрунтів // Вісник Одеського національного університету. Географічні та геологічні науки. Вип. 25(2(37)). 2020. С. 112-127. URL: <https://dspace.onu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/0585fb3f-aed5-40bc-82b8-c5d03a1662f5/content> (дата звернення 27.12.2024)
7. Бедункова О. О. Токсикологічна оцінка води річкових екосистем за тест-реакцією «інтенсивність дихання риб» // Водні біоресурси та аквакультура: науковий журнал. Вип. 2. 2018. С. 126-128. URL: http://wra-journal.ksauniv.ks.ua/archives/2018/2/2_2018.pdf (дата звернення: 27.12.2024)
8. Kurnosova K., Krusir G., Zaderey O., Rusanova O., Mardar M. Biotesting in assessing the safety of grain products // Grain Products and Mixed Fodder's. Vol. 20(3). 2020. P. 20-27. URL: <https://journals.ontu.edu.ua/index.php/gpmf/article/view/1845> (дата звернення 27.12.2024)
9. Domínguez-Rodríguez V. et al. Soil contact bioassay for rapid determination of acute toxicity with *Eisenia foetida* // Heliyon. Vol. 6, Issue 1. URL: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(19\)36790-8](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(19)36790-8) (дата звернення 27.12.2024)
10. Xu J., Wei D., Wang F., Chenzhong Bai C., Du Y. Bioassay: A useful tool for evaluating reclaimed water safety // Journal of Environmental Sciences. Vol. 88. 2020. P. 165-176. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074219314883> (дата звернення 27.12.2024)
11. Das R. K., Ray N. Acute toxicity of fluoride and aluminium on the freshwater fish, *Cyprinus carpio* L. // Indian Journal of Experimental Biology (IJEV). Vol. 60(02). 2022. P. 150-154. URL: <https://or.niscpr.res.in/index.php/IJEV/article/view/1897> (дата звернення 27.12.2024)
12. Никифоров В., Василенко А., Молоштан С. Результати біотестування харчових консервантів і барвників // Вісник КрНУ імені Михайла

Остроградського, вип. 4. 2022. С. 24-28. URL: <https://doi.org/10.32782/1995-0519.2022.4.3> (дата звернення 18.02.2025)

13. Діль К. В., Оковитий С. І., Чернушенко О. О. Проблеми екологічної безпеки харчових добавок та визначення їх токсичності методом біотестування. *Проблеми функціонування та підвищення продуктивності водних екосистем*: Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, 25–27 березня 2020 р. Дніпро, 2020. С. 109-111. URL: https://www.researchgate.net/profile/Oleh-Marenkov/publication/348759628_Problemi_funkcionuvanna_ta_pidvisenna_bioproductivnosti_vodnih_ekosistem/links/600fceb45851553a06fe656/Problemi-funkcionuvanna-ta-pidvisenna-bioproduktivnosti-vodnih-ekosistem.pdf#page=109 (дата звернення 18.02.2025)

14. Курбацька О. В., Оробченко О. Л. Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* // Науково-технічний вісник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок та інституту біології тварин, 22 (2). 2021. С. 217-224. URL: <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.24> (дата звернення 18.02.2025)

15. Андрєєва В.В., Бортнік Т.П., Рибак Ю.Л., Шепелюк М.О. Біотехнологія: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 091 «Біологія». Луцьк : Волинський національний університет імені Лесі Українки. 2022. 47 с. URL: <https://evnuir.vnu.edu.ua/handle/123456789/21336> (дата звернення 29.12.2024)

16. Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // Engineering. 2019. Vol. 5, Issue 1. P. 50-59. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809918306131> (дата звернення 29.12.2024)

17. Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. [Methods in Molecular Biology] Plant Cell Culture Protocols Volume 1815 // Cellular and Morpho-histological

- Foundations of In Vitro Plant Regeneration. 2018. Vol. 1815. P. 47-68. URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8594-4_3 (дата звернення 29.12.2024)
18. Авксентьева О.О., Чумакова В.В. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*: навчально-методичний посібник, вид. 2-ге. Харків : ХНУ імені В.Н. Каразіна. 2021. 88 с.
19. Рябовол Л.О., Рябовол Я.С. Калюсна культура та культура клітинних суспензій: методичні рекомендації для проведення лабораторно занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201 «Агрономія» освітнього рівня доктор філософії. Умань: УНУС. 2020. 18 с. URL: <https://genetics.udau.edu.ua/assets/files/01.2020-silab-doktora-fylosofy/metodichka-doktor-filosofii-biotehnologiya-1.pdf> (дата звернення 02.01.2025)
20. Гасинець Я.С., Кіш Р.Я., Вакерич М.М. Анатомія рослин. Лабораторний практикум: навчальний посібник. Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла». 2024. 132 с. URL: <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/63670> (дата звернення 02.01.2025)
21. Sharma A., Zheng B. Molecular Responses during Plant Grafting and Its Regulation by Auxins, Cytokinins, and Gibberellins // Biomolecules. 2019. Vol. 9(9). 397 P. URL: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/9/397> (дата звернення 02.01.2025)
22. Mohammad S., Khan A.M., Ali A.A., Khan L., Khan M.S., Mashwani Z. Feasible production of biomass and natural antioxidants through callus cultures in response to varying light intensities in olive (*Olea europaea. L*) cult. Arbosana // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2019. Vol. 193. P. 140-147. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134418313952> (дата звернення 03.01.2025)

23. Wahyuni D.K., Huda A., Faizah S., Hery Purnobasuki, Wardoyo B. P. E. Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* *Burm.f.* // *Biotechnology Reports*. 2020. Vol. 27. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20301028> (дата звернення 03.01.2025)
24. Августинович М.Б. Біотехнології: електронний посібник. Луцьк : Луцький національний технічний університет. 2023. URL: https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%90%D0%B2%D0%B3%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%87/index.html (дата звернення 03.01.2025)
25. Su R., Sujarani M., Shalini P., Prabhu N. A review on bioreactor technology assisted plant suspension culture // *Asian J. Biotechnol. Bioresour. Technol.* 2019. Vol. 5. P. 1-13. URL: https://www.researchgate.net/profile/Nandhi-Prabhu/publication/336632009_A_Review_on_Bioreactor_Technology_Assisted_Plant_Suspension_Culture/links/5e74d25ea6fdcc6347865430/A-Review-on-Bioreactor-Technology-Assisted-Plant-Suspension-Culture.pdf (дата звернення 03.01.2025)
26. Корнієнко І.М. Біотехнологія рослинних і тваринних клітин: конспект лекцій для здобувачів вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. Кам'янське : Дніпровський державний технічний університет. 2017. 133 с. URL: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl2.pdf> (дата звернення 04.01.2025)
27. Fehér A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00536> (дата звернення 05.01.2025)
28. Rocha D.I., Vieira L.M., Koehler A.D., Otoni W.C. Cellular and Morpho-histological Foundations of In Vitro Plant Regeneration // *Methods Mol Biol.*

2018. Vol. 1815. P. 47-68. URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8594-4_3 (дата звернення 05.01.2025)
29. Манушкіна Т.М. Основи біотехнології у рослинництві: методичні рекомендації для виконання практичних робіт здобувачами першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Агрономія» спеціальності 201 «Агрономія» денної форми здобуття вищої освіти. Миколаїв : Миколаївський національний аграрний університет. 2023. 48 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/14076/1/osnovi-biotehnologiyi-u-roslinnictvi-metod-bakalavr-201.pdf> (дата звернення 06.01.2025)
30. Циганський В., Тинько В. Біотехнологія: методичні вказівки до виконання практичних робіт здобувачами вищої освіти факультету агрономії та лісівництва денної та заочної форми навчання галузі знань: 20 «Аграрні науки та продовольство», спеціальності: 201 «Агрономія», першого (бакалаврського) освітнього рівня. Вінниця : ВНАУ. 2023. 59 с. URL: <http://socrates.vsau.org/b04213/html/cards/getfile.php/33858.pdf> (дата звернення 06.01.2025)
31. Pourkhaloee A., Khosh-Khui M., Barba-Gonzalez R. Somatic embryogenesis of Tuberose (*Agave amica L.*) was improved by milk as a potential biostimulant in plant tissue culture // International Journal of Horticultural Science and Technology. 2023. Vol. 10(3). P. 257-268. URL: https://ijhst.ut.ac.ir/article_90232.html (дата звернення 06.01.2025)
32. Karunasiri A.N., Gunawardane M., Senanayake C.M., Jayathilaka N. Seneviratne K.N. Antioxidant and Nutritional Properties of Domestic and Commercial Coconut Milk Preparations // International Journal of Food Science. 2020. Vol. 1. 9 p. URL: <https://doi.org/10.1155/2020/3489605> (дата звернення 07.01.2025)
33. Akhiriana E., Samanhudi, Yunus A. Coconut Water and IAA Effect on the In Vitro Growth of *Tribulus terrestris L.* // Acta Universitatis Agriculturae et

- Silviculturae Mendeliana Brunensis. 2019. Vol. 67(1). P. 9-18. URL: <https://doi.org/10.11118/actaun201967010009> (дата звернення 07.01.2025)
34. Kumari R. Induction of callus from different explants of bacopa monnieri and effect of adjuvant on the growth rate of the calli // Indian Journal of Scientific Research. 2019. Vol. 10(1). 113 p. URL: https://www.researchgate.net/publication/335941768_Induction_Of_Callus_From_Different_Explants_Of_Bacopa_monnieri_And_Effect_Of_Adjuvant_On_The_Growth_Rate_Of_The_Calli (дата звернення 07.01.2025)
35. Laezza C., Imbimbo P., D'Amelia V., Marzocchi A., Monti D.M., Di Loria A., Monti S.M., Novellino E., Tenore G.C., Rigano M.M. Use of yeast extract to elicit a pulp-derived callus cultures from Annurca apple and potentiate its biological activity // Journal of Functional Foods. 2024. Vol. 112. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464623005881> (дата звернення 08.01.2025)
36. Tao Z., Yuan H., Liu M., Liu Q., Zhang S., Liu H., Jiang Y., Huang D., Wang T. Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives // J Microbiol Biotechnol. 2023. Vol. 33(2). P. 151-166 URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9998214/#sec20> (дата звернення 08.01.2025)
37. Bělonožníková K., Černý M., Hýsková V., Synková H., Valcke R., Hodek O. et al. Casein as protein and hydrolysate: Biostimulant or nitrogen source for *Nicotiana tabacum* plants grown in vitro? // Physiologia Plantarum. 2023. Vol. 175(4). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppl.13973> (дата звернення 06.01.2025)
38. Munawar S., Cecil I., Habib S., Anwar S. Synergistic effect of casein hydrolysate and 2, 4-D on in vitro callogenesis and subsequent regeneration in rice (*Oryza Sativa L.*) // Trends Biotech Plant Sci. 2024. Vol. 2(1). P. 6-10. URL: <https://doi.org/10.62460/TBPS/2024.011> (дата звернення 06.01.2025)
39. Хабленко А., Даниленко С., Дуган О. Ячмінно-солодовий екстракт як компонент поживних середовищ для культивування молочнокислих

бактерій. Сучасні тренди і перспективи в галузі переробки м'яса і молока: V міжнародна науково-практична конференція, 18 вересня 2024, Київ, 2024. С. 99-100. URL:

https://www.researchgate.net/publication/385652632_ACMINNO-SOLODOVIJ_EKSTRAKT_AK_KOMPONENT_POZIVNIH_SEREDOVIS_DLA_KULTIVUVANNA_MOLOCNOKISLIH_BAKTERIJ (дата звернення 08.01.2025)

40. Mazri M. A., Belkoura I. Effect of plant growth regulators and malt extract on somatic embryogenesis and in vitro grafting of Citrus plants // African and Mediterranean Agricultural Journal – Al Awamia. 2022. Vol. 130. P. 1–16. URL: <https://doi.org/10.34874/IMIST.PRSM/afrimed-i130.31376> (дата звернення 08.01.2025)

41. Puppel K., Gołębiowski M., Grodkowski G., Slószarz J., Kunowska-Slószarz M., Solarczyk P., Łukasiewicz M., Balcerak M., Przysucha T. Review Article. Composition and Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum // Animals. 2019. Vol 9. 1070 p. URL: <https://doi.org/10.3390/ani9121070> (дата звернення 20.12.2024)

42. Ayşenur A., Merve K., Hatice D., Ayşe B., Melih E., Bethany H. M., Steven F.A., Sercan K. Bovine. Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. Frontiers in Nutrition. 2021. Vol. 8. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2021.651721> (дата звернення 20.12.2024)

43. Mohamed Mansour El-Loly. Review article. Colostrum ingredients, its nutritional and health benefits // Clinical Nutrition Open Science. 2022. Vol. 44. P. 126-143, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667268522000389> (дата звернення 20.12.2024)

44. Hammon H. M., Liermann W., Frieten D., Koch C. Review article. Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and

systemic development in calves // *Animal*. 2020. Vol. 14, Supplement 1. P. 133-143. URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731119003148> (дата звернення 21.12.2024)

45. Mehra R., Singh R., Nayan V., Buttar H. S., Kumar N., Kumar S., Bhardwaj A., Kaushik R., Kumar H. Review article. Nutritional attributes of bovine colostrum components in human health and disease: A comprehensive review // *Food Bioscience*. 2021. Vol. 40. URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429221000328> (дата звернення 21.12.2024)

46. Silva F.G., Silva S.R., Pereira A.M.F., Cerqueira J.L., Conceição C. Review article. A Comprehensive Review of Bovine Colostrum Components and Selected Aspects Regarding Their Impact on Neonatal Calf Physiology // *Animals*. 2024. Vol. 14(7). 1130 p. URL: <https://doi.org/10.3390/ani14071130> (дата звернення 22.12.2024)

47. Rhaabe D.S. Gomes, Katya Anaya, Alyne B.S. Galdino, Juliana P.F. Oliveira, Marco A.S. Gama, Caroline A.C.X. Medeiros, Elaine C. Gavioli, Ana Lúcia F. Porto, Adriano H.N. Rangel. Review article. Bovine colostrum: A source of bioactive compounds for prevention and treatment of gastrointestinal disorders // *NFS Journal*. 2021. Vol. 25. P. 1-11. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352364621000249> (дата звернення 22.12.2024)

48. Yalçıntaş Y.M., Duman H., López J.M.M., Portocarrero A.C.M., Lombardo M., Khallouki F., Koch W., Bordiga M., El-Seedi H., Raposo A., et al. Review article. Revealing the Potency of Growth Factors in Bovine Colostrum // *Nutrients*. 2024. Vol 16(14). 2359 p. URL: <https://doi.org/10.3390/nu16142359> (дата звернення 23.12.2024)

49. Playford R.J., Weiser M.J. Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses // *Nutrients*. 2021. Vol. 13(1). 265 p. URL: <https://doi.org/10.3390/nu13010265> (дата звернення 22.12.2024)

50. Bijl E., Huppertz T., Van Valenberg H., Holt C. An article. A quantitative model of the bovine casein micelle: Ion equilibria and calcium phosphate sequestration by individual caseins in bovine milk // *European Biophysics Journal*. 2019. Vol. 48. P.45-59. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-018-1330-2> (дата звернення 23.12.2024)
51. Głąb TK, Boratyński J. Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents // *Topics in Current Chemistry (Cham)*. 2017. Vol. 375(4). 71 p. URL: <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0158-z> (дата звернення: 15.02.2025)
52. Юкало В. Г. Біологічна активність протеїнів і пептидів молока : монографія. Тернопіль : Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя. 2021. 372 с.
53. Costa A., Sneddon N.W., Goi A., Visentin G., Mammi L.M.E., Savarino E.V., F. Zingone F., Formigoni A., Penasa M., De Marchi M. Review article. Invited review: Bovine colostrum, a promising ingredient for humans and animals – Properties, processing technologies, and uses // *Journal of Dairy Science*. 2023. Vol. 106, Issue 8. P. 5197-5217. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030223003077> (дата звернення 23.12.2024)
54. Guberti M., Botti S., Capuzzo M.T., Nardozi S., Fusco A., Cera A., Dugo L., Piredda M., De Marinis M.G. Review article. Bovine Colostrum Applications in Sick and Healthy People: A Systematic Review // *Nutrients*. 2021. Vol. 13(7). 2194 p. URL: <https://doi.org/10.3390/nu13072194> (дата звернення 23.12.2024)
55. Leonetti P., Hanafy M. S., Tayade R., Ramakrishnan M., Sonah H., Jacobsen H.J. Editorial: Leveraging genomics, phenomics, and plant biotechnology approaches for improving abiotic and biotic stress tolerance in cereals and legumes // *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol.14. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1307390> (дата звернення 11.01.2025)
56. Karakas F.P., Bozat B.G. Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in in vitro callus cultures of goat's rue (*Galega*

- officinalis*) under different abiotic stress treatments // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2020. Vol. 142. P. 401–414. URL: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01870-x> (дата звернення 11.01.2025)
57. Nader R. Abdelsalam, Wafaa E. Grad, Nabawya S.A. Ghura, Ahmed E. Khalid, Rehab Y. Ghareeb, El-Sayed M. Desoky, Mostafa M. Rady, Hatim M. Al-Yasi, Esmat F. Ali. Callus induction and regeneration in sugarcane under drought stress // Saudi Journal of Biological Sciences. 2021. Vol. 28, Issue 12. P. 7432-7442. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21007361> (дата звернення 11.01.2025)
58. Umar O.B., Ranti L.A., Abdulbaki A.S., Bola A.L., Abdulhamid A.K., Biola M.R., Victor K.O. Stresses in plants: Biotic and abiotic // Current trends in wheat research. 2021. P. 1-8. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87473> (дата звернення 11.01.2025)
59. Alsherif E.A., Al-Shaikh T.M., AbdElgawad H. Heavy Metal Effects on Biodiversity and Stress Responses of Plants Inhabiting Contaminated Soil in Khulais, Saudi Arabia // Biology. 2022. Vol. 11(2). 164 p. URL: <https://doi.org/10.3390/biology11020164> (дата звернення 13.01.2025)
60. Kadiri A., Boukhatem Z. F., Halfaoui Y., Ighilhariz Z. Chickpea callus histology inoculated with *Ascochyta rabiei* blight causal agent spores // International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research. 2019. Vol. 3(1). P. 112-122. URL: <https://doi.org/10.29329/ijiaar.2019.188.11> (дата звернення 12.01.2025)
61. Nadaia Y. Jasim Jasim, Hadeel M. Habeeb. Effect of biotic and abiotic elicitors on *Salvadora persica* callus in vitro // Baghdad Sci.J. 2024. Vol. 21(9). 2829 p. URL: <https://bsj.uobaghdad.edu.iq/index.php/BSJ/article/view/9439> (дата звернення 12.01.2025)
62. Усов, р., Кривенко, а., Соломонов, р. Господарська цінність сортів гороху в умовах степової зони України // Аграрні інновації, вип. 27. 2024. С.

- 124-128. URL: <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2024.27.18> (дата звернення 06.02.2025)
63. Wu D-T., Li W-X., Wan J-J., Hu Y-C., Gan R-Y., Zou L. A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications // *Foods*. 2023. Vol. 12(13). 2527 p. URL: <https://doi.org/10.3390/foods12132527> (дата звернення 06.02.2025)
64. Мазур В.А., Ткачук О.П., Панцирева Г.В., Алексєєв О.О. Сортові ресурси зернобобових культур в Україні: сучасний стан і перспективи використання: монографія. Вінниця, 2022. 196 с. (дата звернення 06.02.2025)
65. Воронкова Г. М., Гамаюнова В. В. Особливості елементів технології вирощування гороху озимого в зоні південного Степу України. *Стан і перспективи розробки та впровадження ресурсоощадних, енергозберігаючих технологій вирощування сільськогосподарських культур: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 20 листопада 2019 р. Дніпро: ДДАЕУ. 2019. С. 28-29. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/7607> (дата звернення 06.02.2025)*
66. Ivanov I., Goltvjansky A., Bozhkov A., Gromovoy T. Selective-Integrative Technology for the Separation of Colostrum Into Components and the Possibilities of Obtaining Protein Substances From Different Sources // *Innov Biosyst Bioeng* [Internet]. 2024. Vol. 8(3). P. 60-7. URL: <https://ibb.kpi.ua/article/view/299293> (дата звернення 21.03.2025)
67. Корнієнко І.М. Методичні вказівки до виконання самостійних робіт з дисципліни "Біотехнологія рослинних і тваринних клітин " для здобувачів другого (магістерського) рівня зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Кам'янське: ДДТУ. 2017. 33с. URL: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-mzs1.pdf> (дата звернення 23.03.2025)
68. Mohamad Puad N.I., Abdullah T.A. Monitoring the Growth of Plant Cells in Suspension Culture // In: Amid A., Sulaiman S., Jimat D., Azmin N.

- Multifaceted Protocol in Biotechnology. Springer. 2018. URL: https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0_17 (дата звернення 23.03.2025)
69. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. 1962. P. 473-497. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> (дата звернення 26.03.2025)
70. Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. Vol. 72 (1-2). 1976. P. 248-254. URL: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) (дата звернення 05.04.2025)
71. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*, Academic Press. Vol. 299. 1999. P. 152-178. URL: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1) (дата звернення 05.04.2025)
72. Юлевич О.І. Культивування клітинних культур: методичні рекомендації. Миколаїв: МНАУ. 2024. 69 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/18817/1/kultivuvannya-klitinnih-kultur-162-magistr.pdf> (дата звернення 26.03.2025)
73. ImageJ. Image Processing and Analysis in Java [Електронний ресурс] // ImageJ.net. Режим доступу: <https://imagej.net/ij/> (дата звернення: 05.04.2025)
74. Trong T.T., Truong D.-H., Nguyen H. C., Tran D.-T., Nguyen Thi H.-T.N, Dang G.D., Huu H.N. Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Vol 10(9). 2017. P.907-915. URL: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.012> (дата звернення 04.05.2025)
75. Ali A.M.A.M.A., El-Nour M.E.M., Yagi S.M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors // *Journal of Genetic Engineering and*

- Biotechnology. Vol. 16(2). 2018. P. 677–682. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.003> (дата звернення 05.05.2025)
76. Sablowski R., Gutierrez C. Cycling in a crowd: Coordination of plant cell division, growth, and cell fate // *Plant Cell*. Vol. 34(1). 2022. P. 193-208. URL: <https://doi.org/10.1093/plcell/koab222> (дата звернення 01.05.2025)
77. Grant J.N., Burriss J.N., Stewart, C.N. *et al.* Improved tissue culture conditions for the emerging C₄ model *Panicum hallii* // *BMC Biotechnol.* Vol. 17. 2017. 39 p. URL: <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0359-0> (дата звернення 02.05.2025)
78. Kanthaliya B., Joshi A., Arora J., Alqahtani M.D., Abd-Allah E.F. Effect of Biotic Elicitors on the Growth, Antioxidant Activity and Metabolites Accumulation in In Vitro Propagated Shoots of *Pueraria tuberosa* // *Plants*. Vol. 12(6). 2023. 1300 p. URL: <https://doi.org/10.3390/plants12061300> (дата звернення 02.05.2025)

ДОДАТКИ

Додаток А

Тест-об'єкти, які залучають до біотестування [4]

Тест-об'єкт	Тест-реакція, що фіксується
Бактерії (<i>Bacillus cereus</i> <i>Benecke</i> <i>harveyi</i>)	Швидкість розмноження, активність, цілісність і проникність мембран, активність окислювальних ферментів, морфологія клітин
Гриби й актиноміцети (<i>Aspergillus</i> <i>niger</i> , <i>Streptomyces olivaceus</i>)	Швидкість і особливості росту, морфологія
Водорості (<i>Scenedesmus</i> <i>quadricauda</i> , <i>Sc. Acuminates</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Nitella flexilis</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>D.</i> <i>viridis</i> , <i>Cladophora fracta</i>)	Швидкість розмноження, рухова активність, цілісність і проникність мембран, знерухомлення клітин, морфологія клітин, фотосинтетична активність, імпеданс рідкого середовища з клітинами тощо
Найпростіші (<i>Tetrahymena</i> <i>pyroformus</i> , <i>Spirostomon</i> <i>ambiguum</i> <i>Euplotes sp.</i>)	Швидкість розмноження, рухова активність, морфологія, активний транспорт, таксис
Безхребетні (<i>Daphnia magna</i> , <i>Hydra</i> <i>attenuate</i> , <i>Hirudo medicinalis</i> , <i>Unio</i> <i>tumidus</i>)	Здатність до виживання, характеристика дихання та серцебиття, поведінка

Продовження таблиці

Риби (<i>Perca fluviatilis</i> , <i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Cyprinus carpio</i>)	Інтенсивність дихання і серцебиття, поведінка, рухова активність, зміни покривів
Вищі рослини (<i>Lactuca sativa</i> L., <i>Panicum miliaceum</i> L., <i>Raphanus</i> L., <i>Trifolium pratense</i> L., <i>Trifolium aestivum</i> L., <i>Hordeum</i> L.)	Енергія проростання, довжина та маса сухої речовини надземної частини і кореневої системи

Додаток Б.

Склад розчинів мікро- та макросолей базового середовища Мурасіге-Скуга
(МС) [69]

Назва і формула	Маса наважки, мг на 1 л поживного середовища
Макросолі	
Нітрат амонію NH_4NO_3	1650
Хлорид кальцію $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1900
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	330
Гідроортофосфат калію KH_2PO_4	370
Нітрат калію KNO_3	170
Мікросолі	
Борна кислота H_3BO_3	620
Сульфат мангану (III) $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2230
Сульфат цинку $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
Йодид калію KI	83
Молібдат натрію $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
Сульфат купрума (II) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
Хлорид кобальта (II), CoCl_2	2,5

Використання програми ImageJ для вимірювання площ клітин суспензійної культури та калюсів

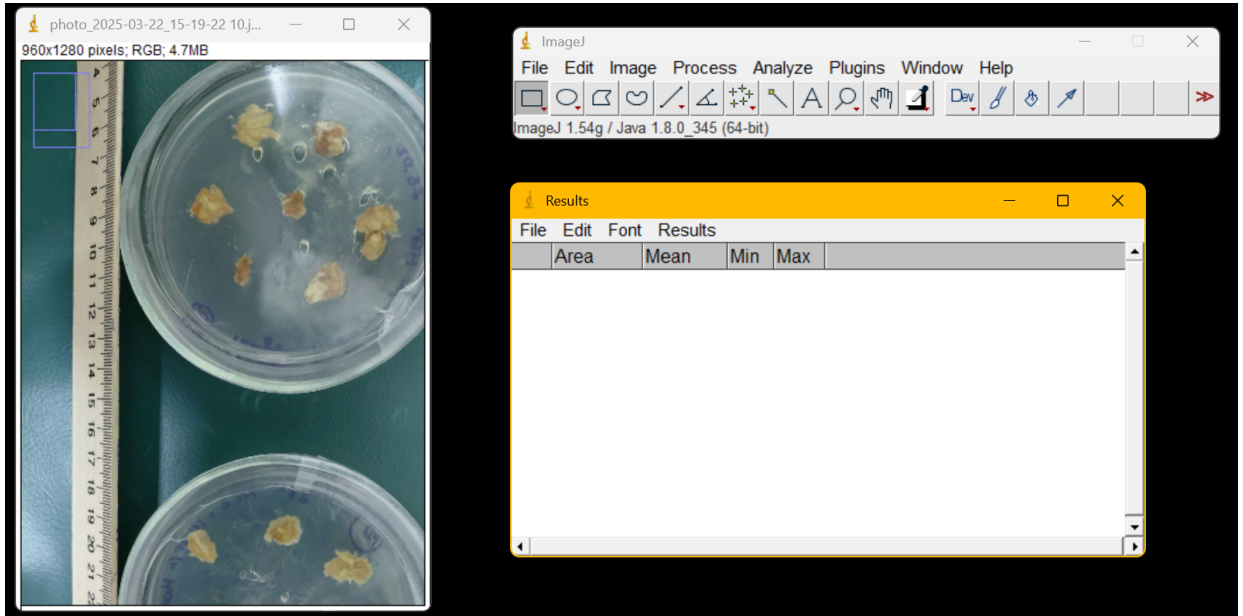


Рис. 1. Інтерфейс програми ImageJ з вікнами інструментів і налаштувань, результатами та зображенням, що аналізується

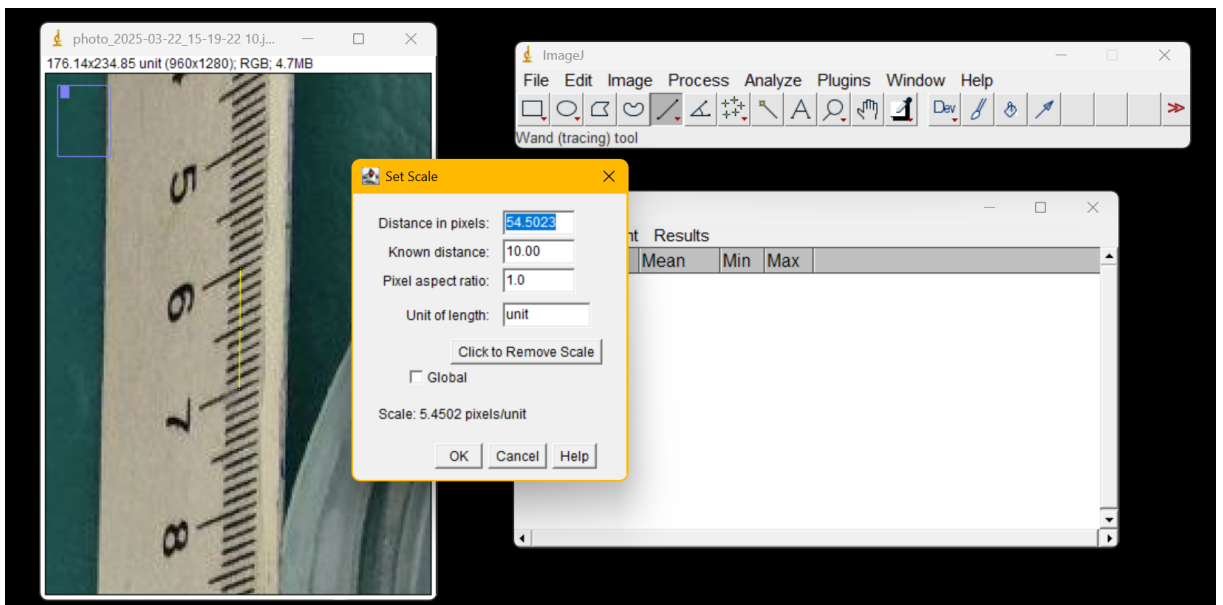


Рис. 2. Встановлення величини, в якій вимірюється площа калюсу, орієнтуючись на лінійку на фотографії. Виставлено значення в мм за допомогою інструмента «Straight» та налаштувань «Set scale→Known distance»

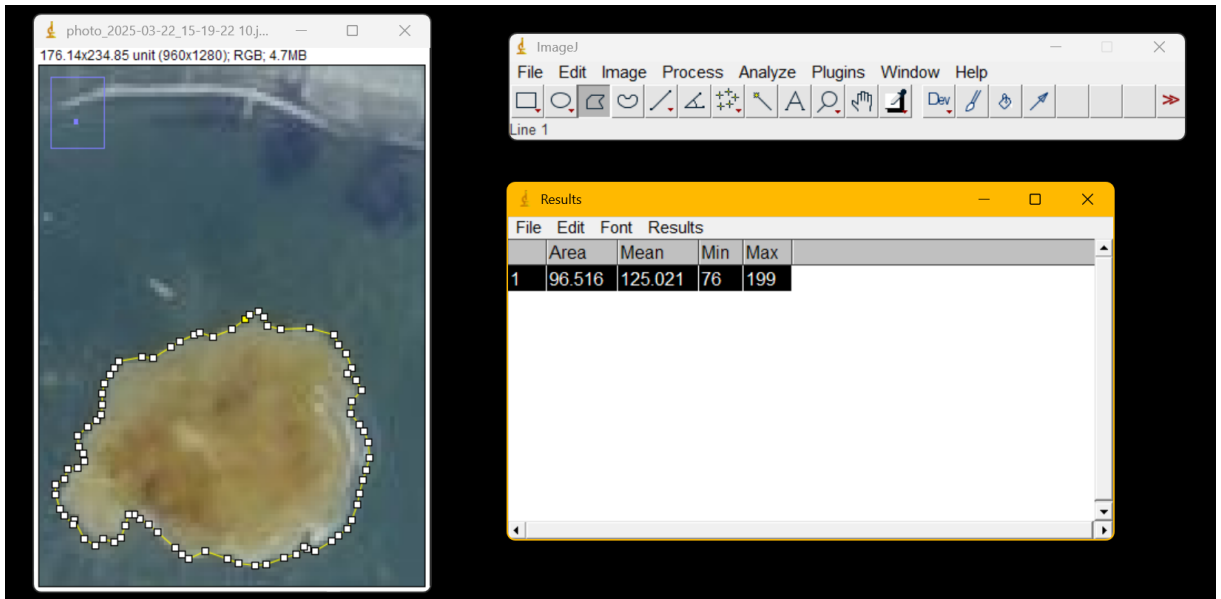


Рис. 3. Вимірювання площі калюсу інструментом «Polygon selection» і отримання результатів («Area») у мм²

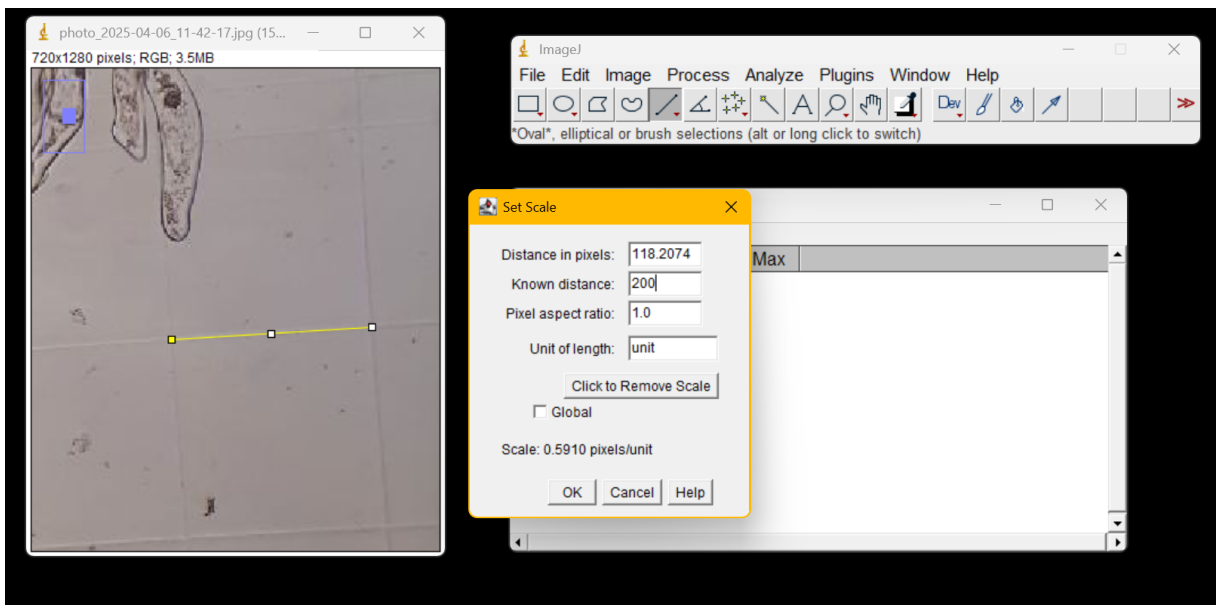


Рис. 4. Встановлення величини, в якій вимірюється площа клітин, орієнтуючись на сторону великого квадрата сітки на камері Горяєва. Виставлено значення в мкм за допомогою інструмента «Straight» та налаштувань «Set scale→Known distance»

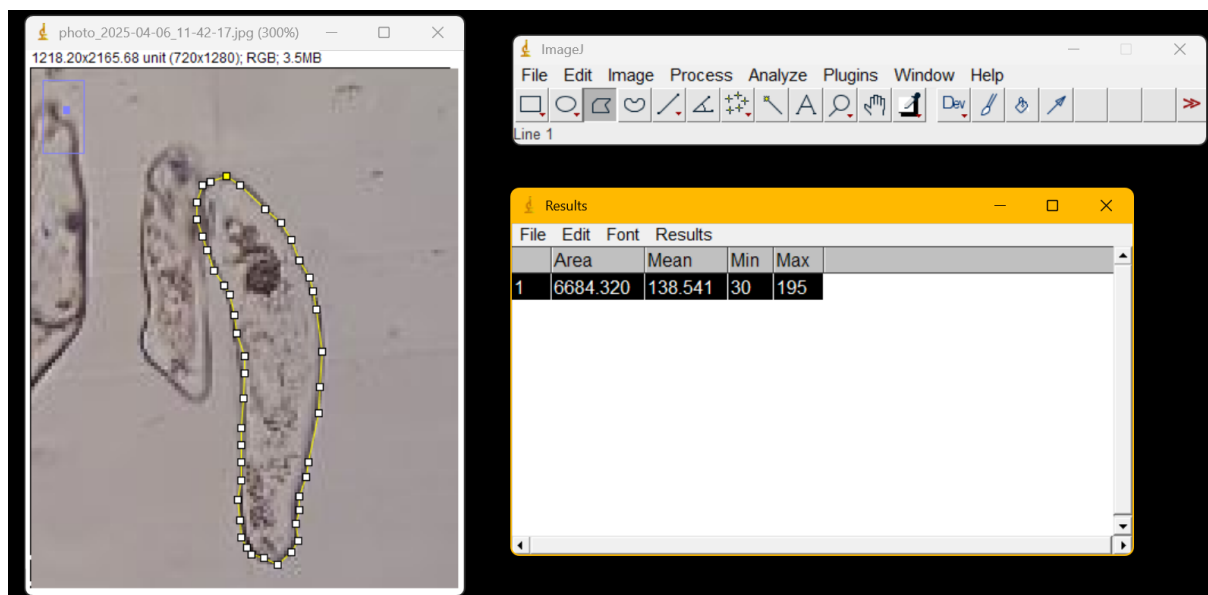


Рис. 5. Вимірювання площі клітин інструментом «Polygon selection» і отримання результатів («Area») у μm^2

Склад поживних середовищ

Компоненти середовища	Кількість на 1 л			
	Для індукції калюсоге- незу	Для субкультиву- вання	Для суспен- зійної культури	Для ка- люсної культури
Мікросолі				
H_3BO_3	620 мг	620 мг	620 мг	620 мг
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	2230 мг	2230 мг	2230 мг	2230 мг
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	860 мг	860 мг	860 мг	860 мг
KI	83 мг	83 мг	83 мг	83 мг
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	25 мг	25 мг	25 мг	25 мг
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
$CoCl_2$	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
Макросолі				
NH_4NO_3	1650 мг	1650 мг	1650 мг	1650 мг
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1900 мг	1900 мг	1900 мг	1900 мг
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	330 мг	330 мг	330 мг	330 мг
KH_2PO_4	370 мг	370 мг	370 мг	370 мг
KNO_3	170 мг	170 мг	170 мг	170 мг
Fe-хелат	5 мл	5 мл	5 мл	5 мл
Вітаміни				
PP	0,5 мг	0,5 мг	0,5 мг	0,5 мг
B1	1 мг	1 мг	1 мг	1 мг
B6	1 мг	1 мг	1 мг	1 мг
Мезоінозит	100 мг	100 мг	100 мг	100 мг

Продовження таблиці

Фітогормони				
2,4-Д	10 мг	10 мг	5 мг	5 мг
Сахароза	30 г	30 г	30 г	30 г
Гліцин	2 мг	2 мг	-	-
Агар-агар	7 г	7 г	-	7 г

Масалига О.В., Батуєва Є.Д.

ВПЛИВ МОЛОЗИВА ЯК ПОТЕНЦІЙНОГО БІОСТИМУЛЯТОРА НА РОСТОВУ РЕАКЦІЮ СУСПЕНЗІЙНОЇ КУЛЬТУРИ РОСЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO*

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

майдан Свободи 4, 61022, Харків, Україна

masalyha2021bt12@student.karazin.ua

Masalyha O.V., Batueva E.D. INFLUENCE OF COLOSTRUM AS A POTENTIAL BIOSTIMULATOR ON THE GROWTH RESPONSE OF *IN VITRO* PLANT CELL SUSPENSION CULTURE. The research focuses on the influence of the effects of different concentrations of bovine colostrum preparation (post-casein fraction) (0,1; 1,0; 10 mg/L) on the growth response of the *Pisum sativum* L. suspension culture. It has been shown that a colostrum concentration of 0.1 mg/L induces the highest increase in culture density, viability and cell size. The use of colostrum as a biostimulator for stimulating the *Pisum sativum* L. suspension culture is being considered.

Оптимальний склад поживних середовищ є однією із важливих умов успішного культивування ізольованих клітин, тканин та органів рослин за умов *in vitro*. До поживних середовищ іноді додають ростові сполуки негормональної природи – гідролізат казеїну, солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, кокосове молоко, ендосперми кінського каштану, грецького горіху, кукурудзи та інших злаків, томатний сік та ін. (Мельнічук, 2010). Молозиво – біологічна рідина, що утворюється в молочних залозах самок ссавців перед і протягом декількох наступних днів після пологів. Склад молозива є дуже різноманітним і характеризується вмістом унікальних поживних сполук: імунні фактори (імуноглобуліни, пептиди, цитокіни, ферменти); ростові фактори (гормон росту, інсулін, пролактин); метаболічні фактори (вітаміни, білки, ц-АМФ), антибактеріальні фактори – лізоцим та ін. Молозиво знаходить використання у тваринництві, в дієтології (функціональному живленні) та в медицині (Purpel, 2019) також застосовується як біологічна добавка, що стимулює ріст калусної культури і та ефективний соматичний ембріогенез (Pourkhaloe, 2023). *Pisum sativum* L. або горох посівний – важлива бобова культура, насіння якої є багатим джерелом білків (20-25%), вуглеводів (59-69%, з них крохмаль – 39-46%), вітамінів, біологічно активних сполук, мінеральних речовин, поліфенольних сполук (Wu, 2023). Ця рослина є важливою харчовою та кормовою культурою завдяки своїй поживній цінності та агрономічним властивостям (Мазур, 2022). Метою роботи було дослідження впливу постказеїнової фракції молозива корів різної концентрації на ріст суспензійної культури *Pisum sativum* L. сорту Гайдук. Введення в культуру, отримання первинного калусу, субкультивування та отримання суспензійної культури проводили за стандартними протоколами (Авксентьєва, 2021). Калюс після першого пасажу був використаний для отримання суспензійної культури шляхом подрібнення та внесення у колби Ерленмейера з живильним середовищем Мурасіге-Скуга (МС) + 5 мг/л 2,4-Д (контроль), МС+5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л, 1 мг/л та 10 мг/л водного розчину препарату постказеїнової фракції молозива. Протягом культивування аналізували щільність культури, життєздатність та розміри клітин, після завершення ростового циклу визначали обсяг осаджених клітин (ООК) та вміст білку в біомасі клітин. В результаті проведених досліджень було показано, що за впливу компонентів препарату постказеїнової фракції молозива корів у складі поживного середовища МС суспензійної культури *Pisum sativum* L. спостерігається: зростання щільності клітин, причому найвища щільність спостерігалась за концентрації препарату 0,1 мг/л; зростання життєздатності клітин як і у контролі, так і за всіх дослідних концентрацій препарату; збільшення розмірів клітин протягом культивування за дії препарату у концентрації 0,1 та 1 мг/л. За показником ООК також показано стимулювання росту суспензійної культури за дії препарату у концентраціях 0,1 мг/л та 1 мг/л та істотне гальмування росту за внесення препарату у концентрації 10 мг/л. Вміст фракції легкорозчинного білку при використанні постказеїнової фракції

молозива значно зменшився у всіх дослідних варіантах. Обговорюється можливість використання компонентів препарату постказеїнової фракції молозива корів певної концентрації у якості біологічно активної добавки для стимулювання ростової реакції суспензійної культури *Pisum sativum* L.