

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ФОТОБІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН: ВПЛИВ
СПЕКТРАЛЬНОГО СКЛАДУ СВІТЛА НА ШЛЯХИ МОРФОГЕНЗУ
*IN VITRO***

Допущена до захисту

Кваліфікаційна робота

«__»_____2024р.

студентки 4 курсу, кафедри молекулярної

біології та біотехнології, група БТ-41,

Гріманової Катерини Сергіївни

Науковий керівник:

к.б.н., Авксентьева Ольга Олександрівна

Завідувач кафедри

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Голова ЕК _____

Оцінка «_____»

«__»_____2024р

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Фотобіотехнологія рослин: вплив спектрального складу світла на шляхи морфогенезу *in vitro*»

Робота включає: 74 сторінки, 3 таблиці, 15 рисунків. Список використаних джерел містить 110 джерел, з них 110 іноземні.

В роботі досліджувалися наукові публікації та експериментальні роботи на вплив різного спектрального складу світла на шляхи морфогенезу *in vitro* та можливі причинно-наслідкові зміни в метаболічному профілі рослин, для майбутнього використання даних при вирощуванні рослин із потрібними характеристиками, що в особливості підходить для лікарських рослин.

Дослідженням встановлено, що червоний, синій спектри світла є оптимальними на вплив змін у морфогенезі рослин в умовах *in vitro*, та їх метаболічного профілю у більшості випадків. Однак кожен вид рослин повинен бути проаналізований окремо. Бо ті самі спектри світла, можуть проявляти інгібуючий ефект на морфогенез чи утворення вторинних метаболітів. Загалом проаналізовано 21 родина та 40 представників на відповідь різному спектру світла при морфогенезі рослин, де були представлена дія п'яти спектрів в монохроматичному та комбінованому типі. На зміну концентрації вторинних метаболітів проаналізовано 14 родин та 24 представника при дії чотирьох різних спектрів.

На детальному прикладі лікарської рослини *W. somnifera* було показано, що вплив різного спектру світла пов'язаний з оксидантним стресом та механізмом його уникнення, що впливає на вторинні метаболіти та морфогенез рослин в умовах культивування *in vitro*.

Ключові слова: фотобіотехнології, фотоморфогенез *in vitro*, фактори впливу, спектр світла, фоторецептори, метаболічний профіль рослин *in vitro*.

SUMMARY

Qualification Work on the Topic: "Photobiotechnology of Plants: The Influence of the Spectral Composition of Light on Morphogenesis Pathways *in Vitro*"

The work includes: 74 pages, 3 tables, 15 figures. The list of references contains 110 sources, of which 110 are foreign.

This study investigates the effects of different spectral compositions of light on morphogenesis pathways *in vitro* and potential changes in the metabolic profile of plants. This data might be used for cultivating plants with desired characteristics, particularly suitable for medicinal plants.

The study has established that red and blue light spectra are optimal for influencing alterations in plant morphogenesis under *in vitro* conditions and their metabolic profiles in most cases. However, each plant species should be analyzed separately. An optimal spectrum light may exhibit inhibitory potential on morphogenesis or the formation of secondary metabolites. Overall, 21 families and 40 representatives were analyzed for their response to five spectra in both monochromatic and combined types during plant morphogenesis. The influence on the concentration of secondary metabolites was analyzed for 14 families and 24 representatives under the action of four different light spectra.

It was studied influence of different light spectra in the medicinal plant *W. somnifera*. It causes plant oxidative stress and activates mechanisms of reactive oxygen species elimination. This mechanism affects secondary metabolites production and plant morphogenesis in different *in vitro* cultivation conditions.

Key Words: *photobiotechnology, photomorphogenesis in vitro, influencing factors, light spectrum, photoreceptors, in vitro plant metabolic profile.*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
SUMMARY	3
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1 Фотобіотехнології як напрям біотехнологій.	8
1.1.1 Фотобіотехнологія, історія минулого.	8
1.1.2 Сучасний стан фотобіотехнологій.	10
1.1.3. Фотобіотехнологія з перспективами на майбутнє.	12
1.2. Морфогенез <i>in vitro</i>	13
1.2.1. Типи морфогенезу <i>in vitro</i> .	13
1.2.2. Фактори впливу спрямованості морфогенезу.	15
1.2.3. Шляхи регулювання морфогенезу рослин <i>in vitro</i>	17
1.3. Штучне освітлення як фізичний фактор впливу на рослини в умовах <i>in vitro</i>	19
1.3.1. Використання ламп штучного освітлення.	20
1.3.2. Нове покоління ламп освітлення.	21
1.4. Фотоморфогенез в умовах <i>in vitro</i> та фоторецептори рослин.	24
1.4.1. Механізм процесу фотосинтезу та його потенційний контроль фоторецепторами.	25
1.4.2. Фоторецептори рослин та їх функції	28
1.4.3. Світло як каталізатор хімічних речовин.	32
1.5. Вплив різного спектрального складу світла на морфогенез <i>in vitro</i> .	37
1.5.1. Стимулювання мікроклонального розмноження різним складом спектрального світла.	38
1.5.2. Стимулювання біосинтезу метаболітів у рослин в умовах <i>in vitro</i> різним спектральним складом світла.	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	48
2.1. Підготовка експлантів об'єкту дослідження	48

2.2. Приготування поживного середовища культивування	48
2.3. Перевірка впливу монохроматичного світла на ріст калусу в умовах <i>in vitro</i>	49
2.4. Оцінка вмісту загального вмісту фенолів і флавоноїдів	50
2.5. Оцінювання антиоксидантного потенціалу	51
2.6. Оцінювання діяльності ферментів захисної системи рослинної клітини	52
2.7. Оцінювання активності протеази та вмісту малонового діальдегіду в калусній культурі	52
2.8. Аналіз вмісту вторинних метаболітів на основі високоефективної рідинної хроматографії	53
2.9. Статистична обробка даних	53
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ	54
3.1. Підтвердження впливу регуляторів росту на індукцію та ріст калусної культури рослин <i>in vitro</i>	54
3.2. Вплив світла на морфогенетичні зміни та вторинні метаболіти в умовах <i>in vitro</i>	54
3.2.1. Ефект різної спектральної діяльності на утворення калусної культури та накопичення біомаси.	55
3.2.2. Вміст загального розчинного білка, малонового діальдегіду, активність ферментів в калусній культурі в умовах	56
3.2.3. Вміст вторинних метаболітів в калусній культурі в умовах	58
3.2.4. Антиоксидантна активність у культурах калусу.	60
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	63

ВСТУП

Фотобіотехнології це молода галузь біотехнологій, об'єктом якої є вивчення стратегій для покращення поглинання рослинами світла, фіксації вуглецю та метаболічних шляхів з орієнтацією на оптимізацію ефективності фотосинтезу, що як наслідок збільшує виробництво біомаси в рослинах з можливістю контролювати біохімічний склад для подальшого застосування рослин у різноманітних галузях. Починаючи з XXI століття, кількість досліджень присвячених впливу спектрального складу світла на фотоморфогенез *in vitro* зростає. Відомо, що різні діапазони світлових хвиль по-різному впливають на морфогенетичні та метаболічні процеси і цей вплив залежить індивідуально від виду рослин. Однак, недостатньо вивченими залишаються конкретні механізми дії спектрального складу світла в різних видах рослин.

Зі зростаючим попитом на стійкі сільськогосподарські практики та біотехнологічні продукти, дослідження впливу світла на морфогенез рослин має велике значення. Умови *in vitro* дозволяють контролювати фактори навколишнього середовища і створювати оптимальні умови для вирощування рослин. Це особливо актуально для країн з несприятливими кліматичними умовами, де традиційне землеробство може бути неефективним, або ж рослини можуть бути під загрозою зникнення. Вивчення впливу спектрального складу світла дозволить розробити ефективну методологію, яка буде застосована при вирощуванні рослин в умовах *in vitro*.

Комплексне дослідження у вигляді узагальнення та систематизації сучасних знань про вплив різних спектральних складових світла на морфогенез рослин із акцентом на можливі компоненти механізмів та різні види рослин представлено вперше, що може бути корисним примірником для використання у подальших розробках фундаментальних дослідженнях та

розширення даних у вдосконалені технологій вирощування рослин в умовах *in vitro* в першу чергу для фармацевтичної та сільськогосподарської галузей.

Тому, метою роботи було провести глибокий літературний аналіз для оцінки впливу різного спектрального складу світла на морфогенез рослин в умовах *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні задачі:

1. Провести аналіз літератури із зародження та розвитку напряму фотобіотехнології;
2. Розглянути види морфогенезу рослин *in vitro* із зазначенням факторів впливу для регулювання процесу;
3. Дослідити вплив штучного освітлення на рослини в умовах *in vitro* із використанням різних ламп освітлення;
4. Проаналізувати та систематизувати можливі компоненти, які беруть участь в механізмі сприйняття світла та регулювання фотоморфогенезу;
5. Проаналізувати та узагальнити результати впливу різного спектрального складу світла на морфогенез *in vitro* та метаболічний профіль рослин різних родин на прикладах експериментальних робіт.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Фотобіотехнології як напрям біотехнологій.

Фотобіотехнології це молода галузь біотехнологій. Принципом цієї галузі є дослідження взаємодії світла з біологічними системами та використання унікальних властивостей світла для регулювання біологічними процесами з метою досягнення бажаного результату. У цьому напрямку вивчають стратегії для покращення поглинання світла, фіксації вуглецю та метаболічних шляхів з орієнтацією на оптимізацію ефективності фотосинтезу, що як наслідок збільшує виробництво біомаси в рослинах з можливістю контролювати біохімічний склад для подальшого застосування рослин у різноманітних галузях.

1.1.1 Фотобіотехнологія, історія минулого. Немає певної точки відліку розвитку фотобіотехнологій. Можна вважати, що основа на якій почався розвиватися цей напрям, була закладена у XVII столітті, коли увагу вчених привернув процес фотосинтезу. В це століття був зроблений висновок стосовно прямого відношення поглинання води рослинами до їх росту. Через століття було зроблено важливе уточнення, що рослини виробляють кисень, що було продемонстровано британцем Джозефом Пристлі в експерименті з модельним об'єктом мишею, яка дихала киснем виробленим з рослини. Паралельно з цим вчений голландського походження Ян Інгенхауз у 1773 році довів, що окрім поглинання води, є присутність важливості світла для фотосинтезу, що і є причиною вироблення кисню [96].

Наступним проривним етапом розвитку основи фотобіотехнологій був кінець XIX століття. Де на основі ранніх концепцій було надано Теодором Енгельманом перший спектр дії фотосинтезу. Німецький ботанік провів експеримент, де використовував призму для поділу світла на спектральні компоненти, а за об'єкт взяв водорість, яка була поміщена в суспензію аеробних бактерій. Бактерії відігравали роль для виявлення місць

виділення кисню. Піддаючи водорість різним спектрам дії, Енгельман виявив, що бактерії накопичуються в спектрах області синього і червоного світла. Саме він показав, що червоне та синє світло поглинені хлорофілом, виробляють кисень (рис. 1.1). Цей експеримент, спектр дії Енгельмана, був фундаментальним в галузі фотобіотехнологій та першим із задокументованих спостережень впливу різного спектру світла на фотосинтез.

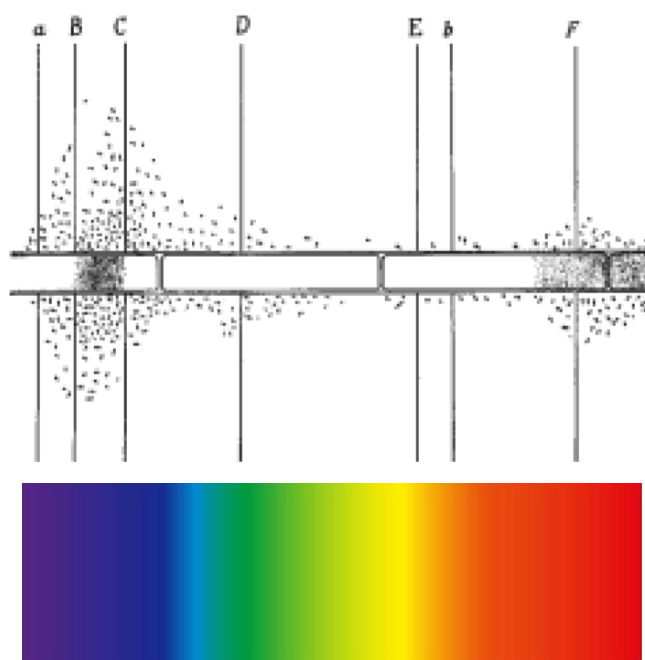


Рис. 1.1. Результат експерименту Енгельмана [40].

На початку XX століття робота зі світлом та фотосинтезом більше була націлена на продукти, які отримує рослина в ході перетворення енергії Сонця на хімічну. Німецькі ботаніки, Юліус фон Сакс і Вільгельм Пфеффер, працюючи у парі, вивчали вплив світла на те, як рослина розкладає вуглекислий газ, і як світло впливає на ріст рослини. Саме їх дослідження привели до відкриття фотоморфогенезу – процесу, за допомогою якого світло регулює ріст і розвиток рослин [96].

Подальший розвиток вносив розуміння у так званих дійових осіб фотосинтезу. Тому вже в середині XX століття були ідентифіковані специфічні молекули фоторецепторів у рослинах, які й сприймають світові сигнали. Загалом тоді було відкрито дві групи рецепторів – фітохроми та

криптохроми. У вчених було припущення стосовно наявності фотооборотного пігменту, який регулює фотоперіодизм у цвітінні, проростанні насіння та інших фотоморфогенних реакціях. Після десятиліття роботи, було ідентифіковано рецептор фітохрому в етіолованих проростках кукурудзи, та були наведені дані, що свідчать про реакцію фітохрому на червоне світло. КRYPTOXPOX – протилежний рецептор на спектральному розподіленні, який реагує на синє світло, та відповідає за пригнічення подовження гіпокотилів, сприяє розкриттю сім'ядолей, деполяризації мембрани, впливає на відкриття та закриття продихів та інші важливі морфогенетичні реакції. Вперше цей рецептор був ідентифікований у *Arabidopsis* [64]. Відкриття груп рецепторів, які чутливі до різних довжин хвиль світла, змінило розуміння того, як рослини відчують і реагують на світлові сигнали. Інші ж групи рецепторів були відкриті та описані пізніше та будуть описані у розділах нижче.

Загалом підґрунтя для розвитку фотобіотехнологій до XX ст. включно, є насиченим та дає початкове уявлення про механізми фотоморфогенезу рослин.

1.1.2 Сучасний стан фотобіотехнологій. У XXI ст. фотобіотехнології тільки набирають обертів. За невелику частину століття, по відношенню до попередніх, і в парі з розвитком технологій, вже відбулися значні уточнення та удосконалення знань. Окрім вивчення відомих фоторецепторів та відкриття фототропінів і увіродінів, розвиваються технології впливу, візуалізації та появи нових наукових напрямків.

Оптогенетика є революційною галуззю, яка значно розширила розуміння клітинних процесів. Цей напрям забезпечує точний просторово-часовий контроль над фізіологічними процесами рослин, відкриваючи нові можливості у біотехнологіях та синтетичній біології. Хоча у рослинництві небагато робіт, але вже була представлена онтогенетична система – PULSE – елементи вимикача світла для рослин – для контролю експресії генів у рослин, які вирощуються за звичайним циклом світло-темрява. Мета

системи полягає в тому, що вона має репресор, який керується синім світлом та індукцйбельний перемикач під дією червоного світла (рис. 1.2.) [85]. Змінюючи спектр освітлення, керують експресією генів, сигнальними шляхами, які відповідають за морфогенез рослин.

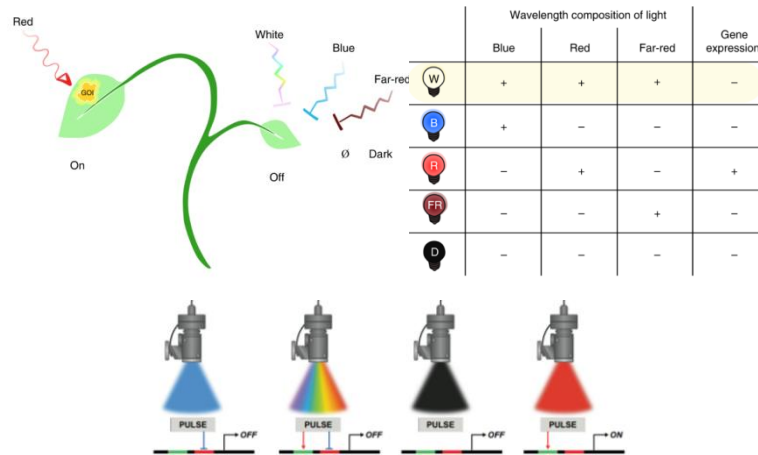


Рис. 1.2. Оптогенетична система для контролю експресії генів у рослин PULSE [23, 85].

Ще однією новою системою фотобіотехнологій є розробка світлочутливих генетичних перемикачів на основі CRISPR-Cas9, яка дозволяє розробляти світлочутливі культури. Включаючи в геном рослин регуляторні елементи, які реагують на світло, можна модулювати різні ознаки, тим самим змінюючи ефективність фотосинтезу, посухостійкість, стійкість до хвороб [21, 33, 108].

І останньою новацією, яка пришвидшила розвиток фотобіотехнологій, це поява світлодіодів. Налаштовані спектри світла, індукція специфічних реакцій розвитку, енергоефективність, регулювання кольорів та спектрів світла – усе це змінило в кращу сторону контроль та ефективність за середовищем росту рослин та можливість контролювати морфогенетичні зміни рослин в умовах *in vitro* [6].

Тож, XXI ст. стало ключовим періодом у розгалуженні та прогресі фотобіотехнологій і вивченні впливу світла на морфогенез рослин і їх реакцію на навколишнє середовище. Усі досягнення мають великі

перспективні напрями для вирішення проблем людства, які стоять на порядку денному.

1.1.3. Фотобіотехнологія з перспективами на майбутнє. Ця міждисциплінарна галузь об'єднує принципи біології, фізики світла та інженерії, має великі перспективи для вирішення широкого спектру проблем. Серед найближчих перспектив є точне землеробство. Розробка цієї концепції має на меті використовувати аналітику даних у реальному часі, штучний інтелект і робототехніку для оптимізації сільського господарства. Це допоможе зменшити використання природних ресурсів і обмежити використання великих обсягів добрив та пестицидів. Усе це можливе при інтеграції фото біотехнологічних інструментів з сенсорними мережами та технологіями моніторингу, що дозволить фермерам отримувати актуальну інформацію про стан їхніх земельних ділянок [70, 75, 106].

Також покращення очікуватиме внутрішнє та вертикальне землеробство. Людство вже почало користуватися новим поколінням освітлювальних ламп – світлодіоди. Подальші дослідження світлодіодного освітлення та спектральних маніпуляцій дозволить збільшити використання простору, при цьому зменшити споживання ресурсів і отримувати врожаї безперервно у контрольованих середовищах [22].

Третім напрямом є фармація. Завдяки фотобіотехнологіям забезпечити виробництво високо цінних сполук, які використовуються у фармацевтичних засобах. Для цього потрібно дослідити та розробити метаболічні шляхи та експресії генів, які будуть чутливими до світла. Як наслідок, рослини будуть перетворені на 'біореактори' для синтезу потрібних речовин. Заміна синтетичних засобів лікування на засоби природнього походження [19, 79, 81]. Це може стати частиною сталого розвитку персональної медицини.

Підсумовуючи, фотобіотехнології рослин має великий потенціал для революції не тільки біології, а й супутніх напрямів науки. Одночасно

пропонуючи інноваційні рішення глобальних проблем продовольчої та екологічної безпеки, медицини.

1.2. Морфогенез *in vitro*

Сьогодення не можна уявити без різноманіття рослин та рослинних продуктів. Це досягнення генної інженерії, яке десятиліттями використовувалось та продовжує бути актуальним напрямом для розробки рослин з певними характеристиками. Цей напрям використовує багато технологій, щоб досягти мети, але щоб отримати модифіковану рослину, не обійдеться без процесу морфогенезу. Морфогенез є складним процесом і важливою частиною життєвого циклу рослин. Ця подія визначає форму та структуру рослинного організму від моменту зародження до повної зрілості організму. Досліджувати морфогенез в умовах *in vitro* дає можливість зрозуміти механізми цього процесу у рослин і аналізувати на які характеристики впливають внутрішні та зовнішні фактори дії. Це потрібно для можливості контролювати фактори впливу та регулювати їх для досягнення певних характеристик в рослинних організмах у різноманітних сферах сучасного життя – сільське господарство, фіторе mediaція, садівництво, фармація, дослідницька галузь.

1.2.1. Типи морфогенезу *in vitro*. В умовах вирощування та культивування *in vitro* морфогенез може проявлятися у різній формі. Це залежить від мети, ресурсів, часу та протоколу вирощування або регенерації рослин в лабораторних умовах. Тому на сьогоднішній день виділяють наступні типи морфогенезу рослин з якими працюють: органогенез та ембріогенез (рис. 1.3) [26].

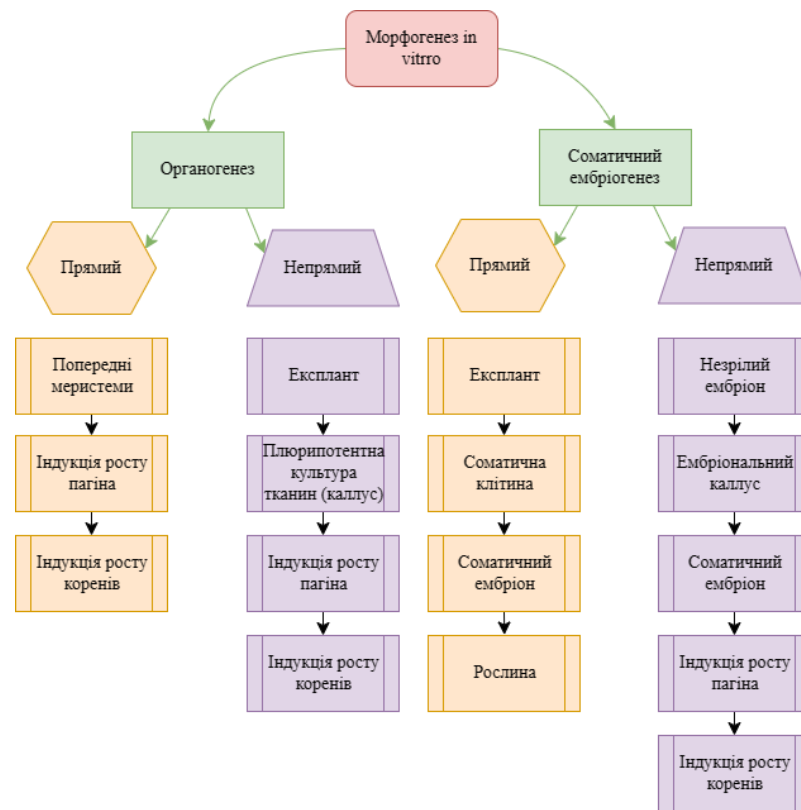


Рис. 1.3. Схема морфогенезу рослин in vitro

Органогенез представляє собою процес, в якому відбувається утворення нових органів зі взятих у рослин експлантів (листки, стеблі, квітки) у контрольованих умовах культивування, відображаючи тотипотентність рослинних клітин. Цей процес можна класифікувати на прямий та непрямий шлях. Відмінність полягає в індукуванні пагонів і коріння при прямому органогенезі безпосередньо на стеблі, де вже є меристеми. В непрямому органогенезі є стадія утворення тотипотентної калусної культури на експланті з подальшим розвитком органів рослини шляхом цитогенезу та гістогенезу [12, 15, 63].

Ембріогенез процес в якому формується ембріон із зиготи або клітин, що мають ембріогенний потенціал. У рослинних культурах ембріогенез представлений у соматичному вигляді, де соматичні клітини дедиференціюються в ембріональні стовбурові клітини, а потім в ембріональному розвитку формують рослини [63]. Так само як й органогенез, ембріогенез поділяється на два шляхи розвитку. В прямому розвитку соматична клітина утворена з експлантів індукується на розвиток

соматичного зародка і подальший розвиток рослини. В непрямому шляху, який є поширеним шляхом, в особливості у культурних рослин, індукування експланту направлене на формування калусної культури, на якій в подальшому формуються органи рослини [12, 63]. На відміну від органогенезу, обидва шляхи соматичного ембріогенезу можуть одночасно відбуватися на одному ж експланті, хоча періоди отримання рослин можуть відрізнятися[3].

1.2.2. Фактори впливу спрямованості морфогенезу. Морфогенез рослин в умовах *in vitro* залежить від ряду факторів, що включають внутрішній та зовнішній вплив на рослини. Розуміння цих факторів є ключем до розуміння, як оптимізувати вирощування рослинних культур та підвищити їхні регенеративні властивості. Виділяють декілька факторів, які пов'язані між собою ланцюговою реакцією: генетична особливість рослин, органо- та тканеспецифічність, вік рослини з яких був взятий експлант, склад поживного середовища, вплив фітогормонів та загальні умови культивування [2].

Фактори впливу спрямованості морфогенезу можна класифікувати на біологічно-хімічні та фізичні. Одним з біологічно-хімічних факторів є генетична особливість рослин, яка визначає розвиток яких саме клітин, тканин та органів потрібний і можливий в даний час розвитку. Цей фактор є основою того, що рослини здатні до регенерації в умовах *in vitro*. Генетична особливість відповідає за перехресні зв'язки гормональних сигналів, транскрипційних та епігенетичних факторів, які разом беруть участь від першої стадії морфогенезу [103]. Як наслідок підключається фактор органо- та тканеспецифічності. Відбувається відповідно до типу експланту, що має різний потенціал для формування певних органів чи тканин [73]. Паралельно за гістогенез та органогенез відповідає фактор впливу складу поживного середовища. Поживне середовище має складатися з основних елементів (мікроелементи, макроелементи, джерело заліза), органічних добавок (вітаміни, амінокислоти), та речовини для фіксації вуглецю

(сахароза) [98]. Існує велика кількість поживних речовин з різним складом. Це потрібно для підтримання життєздатності експлантів та регулювання їх морфогенезу. Окремим складником, який впливає на спрямованість морфогенезу є додавання фітогормонів. Найчастіше застосовують ауксин, цитокінін, гіберелін та абсцизову кислоту. Різна концентрація цих речовин направляє морфогенез за різними шляхами [90, 98].

Фізичні фактори спрямованості морфогенезу представлені через загальні умови культивування, які походять від навколишнього середовища. Такі фактори представлені різними параметрами впливу. Першим з яких є температура або термоморфогенез. Цей фактор підтримує фізіологію рослин у стабільному стані разом з метаболізмом (мембрано зв'язуючі білки, які відчують зміну температури та мають роль термосенсорів) у широкому діапазоні температур щоб запобігти пошкодженню клітин та тканин рослин [50, 68]. Екстремальні температури зазвичай порушують біохімічні процеси та впливають на поділ та диференціацію клітин, що прямо пропорційно впливає на морфогенез рослин.

Наступний фактор впливає на морфогенез гравітаційним прискоренням Землі. Як було доведено експериментально в умовах різної гравітації в космосі на шатлі, що відсутність або відмінність гравітації від Земної впливає на автоморфну кривизну утворених органів під час морфогенезу рослин. На кривизну утворених органів впливає зменшення товщини, міцності клітинної стінки у рослин, як наслідок меншого навантаження гравітаційної сили [44].

Гідродинаміка є також критичним фактором впливу на морфогенез рослин. Завдяки цьому фактору супроводжується рівномірний розподіл поживних речовин та кисню, яке є важливим на перших стадіях морфогенезу для сталого росту та розвитку рослин [89].

Вагомим фактором впливу у рослин є фотоморфогенез. Рослини здатні розвиватися у відповідь на світлові сигнали, шляхом регулювання генів, які будуть впливати на внутрішні та загальні реакції-відповіді рослин.

Окрім впливу світла, яке визначається у кількості годин освітлення на добу, є вплив спектрального складу світла. Спектральний склад світла може впливати на структуру, різноманітність та швидкість росту клітин у рослин, а також визначає напрямок розвитку морфогенезу [39, 87].

Усі фактори впливу працюють сумарно та залежать один від одного (рис.1.4). Це показує багатогранність та складність усього процесу морфогенезу у рослин.

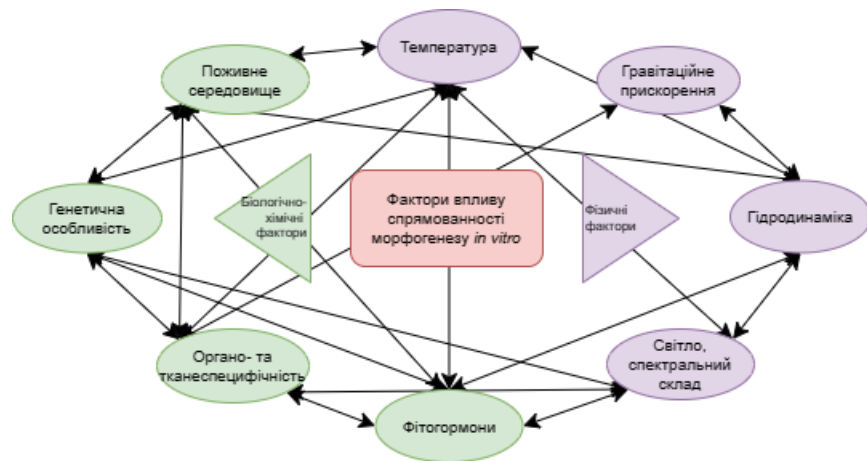


Рис. 1.4. Фактори впливу спрямованості морфогенезу.

1.2.3. Шляхи регулювання морфогенезу рослин *in vitro*. Більшість фундаментальних речей в науці починалися зі спостережень. Це відбувалось й з морфогенезом в умовах *in vitro*, починаючи з австрійця Готлібу Габерландту. У 1902 році австрійський ботанік зміг успішно культивувати клітини тютюну в рідкому середовищі, що є початком розвитку методів культивування тканин та вивчення морфогенезу. Ця точка у часі стала відліком у спробах змінювати та контролювати лабораторні умови, спостерігаючи їх вплив на морфогенез рослин в умовах *in vitro*. Значущим періодом також є 30-ті роки XX ст. В той час працював Філіп Уайт, який успішно культивував тканини рослин, беручи до уваги ембріони, пагони та коріння, а також продемонстрував культуру тканин, яка могла рости необмежений період часу [97, 100].

В момент, коли дослідження перейшли в лабораторний тип і об'єкти вже вивчались на тканинному та клітинному рівнях організації живого,

вчені розпочали аналізувати шляхи регулювання морфогенезу рослин. Відомо п'ять напрямів регулювання цього процесу, які корелюються з факторами впливу спрямованості морфогенезу.

Найбільш поширеним є регуляція морфогенезу шляхом гормональної маніпуляції. Основним акцентом на сьогоднішній день зроблено на п'ять основних рослинних гормонів, які є найбільш вивченими: ауксини, гібереліни, абсцизова кислота, цитокініни та етилен. Перелічені гормони мають й синтетичні аналоги, які мають більшу стійкість до навколишнього середовища і дають можливість регулювати морфогенез в лабораторних умовах. Різні концентрації та комбінації гормонів можуть індукувати або пригнічувати морфогенез на усіх стадіях розвитку рослин, шляхом регулювання генів та транскрипційних факторів [49, 76].

Суміжним типом регуляції морфогенезу є маніпулювання складом живильного середовища. Воно є невід'ємним учасником впливу на ріст та розвиток рослин, як зазначалось вище.

Підбір експланту є регулятивною віткою морфогенезу [84]. Причина в різноманітності тканин рослин, які мають відмінну одна від одної здатності до регенерації та диференціювання.

Розвинені біотехнологічні методи можуть використовуватися для впливу на морфогенез різними інструментами. Найпоширенішими серед них є редагування генів і застосування регуляції на епігенетичному рівні, де модифікація відбувається переважно у ДНК та гістонах [35].

Аналіз факторів впливу на морфогенез рослин в умовах *in vitro* дає розуміння про впливовість фізичних факторів, які стали невід'ємною складовою маніпулювання морфогенезом рослин на зовнішньому рівні. Температура, вологість, газовий склад середовища, світло – усе взаємопов'язано та має вплив. Якість, інтенсивність, спектральний склад світла та тривалість світового дня мають провідне значення для регулювання росту та розвитку рослин. Усі перелічені властивості світла, особливо різний спектральний склад: монохроматичний, комбінації,

впливають на подовження стебла, розширення листя, індукцію цвітіння. Увагу вчених частіше привертає новий напрям як фотобіотехнологія, де є багато прогалин у пошуках відповідей на запитання про реакцію рослин на різну довжину світла [88].

Усі перелічені шляхи регулювання морфогенезу не є бездоганно вивченими. Вплив фізичних факторів, а саме освітлення та склад спектрального світла, що складають актуальний напрям фотобіотехнології, є перспективною орієнтацією наукової спільноти на найближче майбутнє через ряд переваг, які будуть описані у наступних розділах.

1.3. Штучне освітлення як фізичний фактор впливу на рослини в умовах *in vitro*

Культивування рослин в умовах *in vitro* дає можливість дослідникам контролювати середовище рослин та маніпулювати ростом і розвитком рослин. На сьогоднішній день існує багато факторів, що впливають на фізіологію рослин *in vitro*, переважна їх частина була описана в попередніх розділах. Але штучне освітлення виділяється як ключова детермінанта росту, морфології та метаболічних процесів. Замінюючи природне сонячне світло на системи штучного освітлення можна брати участь у фундаментальному процесі, а саме забезпеченні необхідною енергією для фотосинтезу та регулювання метаболічних шляхів, які впливають на ріст та розвиток рослин. З самого початку історії з відкриття процесу фотосинтезу намагаються досліджувати вплив світла у різних його проявах: спектральний склад, інтенсивність, тривалість, розподіл світла. З виявленням певних залежностей та закономірностей впливу, світло почали використовувати як головне джерело впливу на морфогенез, та одним з інструментів впливу на сільськогосподарські культури, що потім отримало назву фотоморфогенез.

1.3.1. Використання ламп штучного освітлення. У культурі тканин та теплицях освітлення повинно бути підібране так, щоб забезпечувати одночасно участь як у фотосинтезі, так і у фотоморфогенетичних реакціях.

Електричні лампи почали використовувати, в часи, коли лампи стали доступні людям для освітлення приміщень та вулиць. Але серед усього різноманіття, яке було в історії становлення освітлення, першими визнаються у використанні в садівництві карбонові дуги. Автором ідеї був Сіменс, який провів дослідження у 1880 році, де описав використання електричних ламп та вніс економічний аналіз, на основі використання ламп у комерційному садівництві [95, 102]. Такі карбонові або вуглецеві дуги працювали на основі двох вугільних електродів, які розташовані були близько один до одного, до яких була прикладена висока напруга. Напруга іонізуючи повітря між електродами, створювала провідний шлях для потоку електронів. Струм, який проходив через повітря, нагрівав вугільні електроди і давав основу для випромінювання ними світла. Така дуга була спроможна випромінювати світло в досить широкому спектрі, навіть червоне та далеке червоне світло, яке має вирішальне значення для фотоморфогенезу. Але, такі лампи мали недоліки. Не дарма Сіменс розписав великий звіт для комерційного використання дуг. Такими недоліками ламп є по-перше вироблення значної кількості тепла, що може призводити до коливань температури та теплового стресу для рослин. По-друге карбонові електроди є витратним матеріалом через ерозію та деградацію під час роботи. Це стало причиною збільшення витрат на технічне обслуговування. І на додаток до економічних витрат на енергоспоживання, то такі вугільні дуги в процесі перетворення електричної енергії на світло, розсіювали багато енергії у вигляді тепла, що збільшувало витрати [56]. Але таке джерело енергії використовувалось до 1920 років, які змінились на лампи розжарювання.

Лампи розжарювання були запатентовані у 1879 році, але мали малий період роботи – до 40 годин. Тому поки люмінесцентні лампи продовжували

еволюціонувати, у сільському господарстві в теплицях використовували карбонові дуги. Однак, вже у 20 роках XX ст. конкурентним стала лампа розжарювання «Mazda», яка мала час роботи до 3000 годин непевної роботи [41]. Вона так само давала далеке червоне світло з інфрачервоним випромінюванням, що сприяло позитивному фотоморфогенезу. На їх заміну прийшли люмінесцентні лампи.

Люмінесцентні лампи були розроблені на основі використання люмінофорів та ртутних ламп низького тиску. Такі лампи почали забезпечувати більш широким спектром світла, покращили електричну ефективність разом із терміном придатності. Першими, хто використав люмінесцентні лампи в освітленні рослин та для впливу на їх морфогенез це вчені з Каліфорнійського університету. Цей тип ламп покращувався й надалі, що призвело до адаптації спектру для морфогенезу рослин [46, 102].

Усі типи ламп пройшли шлях розвитку та були протестовані у використанні в освітленні рослин в контрольованих умовах – *in vitro*. Де були знайдені переваги та недоліки кожного. Але через недостатній технологічний розвиток, який би приводив до фундаментальних відкриттів, все залишалось на своїх місцях до 90-х років XX ст. Саме в ці роки стали загальнодоступними світлодіоди, які перекрили усі недоліки своїх попередників [29]. Після чого почали використовуватися у рослинництві для впливу на морфогенез рослин.

1.3.2. Нове покоління ламп освітлення. Розголосу через доступність нового покоління ламп освітлення набув у 90-х роках минулого століття. Однак, формуватися нове покоління освітлення почало ще на початку XX ст. випадковим чином. У 1907 році Генрі Джозеф Раунд займаючись пошуками кристалічного детектора радіохвиль, помітив інше – випромінювання світла від штучного кристала в момент протікання струму [109]. У 1962 році Ніком Холоняком був продемонстрований світлодіод, який випромінює червоне світло, хоча світло було слабким і побачити його можна було тільки в затемненій кімнаті [109]. У 1993 році був

представлений синій світлодіод Шудзі Накамура, завдяки якому можна було створювати білі світлодіоди – шляхом злиття трьох кольорів (синій, червоний та зелений), або ж синій в поєднанні люмінофори (жовтий). Розвиток відбувався на основі досліджень у матеріалознавстві [10, 109].

Світлодіод – це тип твердотільного напівпровідникового діода, який випромінює світло при подачі струму через пристрій, де генерація світла виникає за допомогою електролюмінесценції [88]. Принцип роботи світлодіода згідно його будові (рис. 1.5) полягає в наступному: струм тече односпрямовано з р-сторони (аноду), на n-сторону (катода) через перехід між ними, де електрони та щілини надходять з різною напругою. Коли електрон зустрічається з щілиною, він падає на нижчий енергетичний рівень і виділяє енергію у вигляді фотона. Саме ця енергетична щілина визначає довжину світла (колір). Матеріали, які використовуються для виготовлення світлодіода мають енергію, яка відповідає ближньому інфрачервоному світлу або ж ультрафіолетовому світлу, що відображається у енергетичній щилині [29].

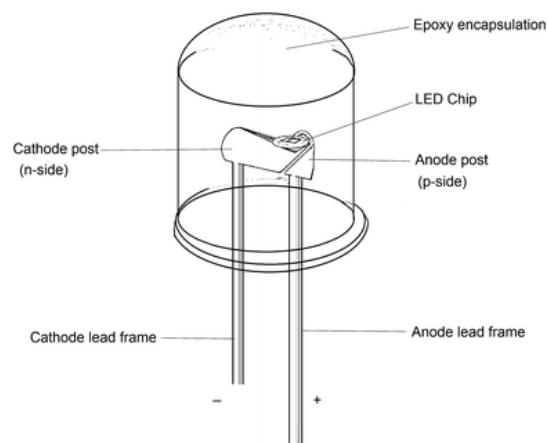


Рис. 1.5. Будова структури світлодіода [29].

За основу світлодіодів взяті напівпровідникові матеріали від яких залежав склад спектру. При пошуках таких матеріалів, які мали б властивість до застосування у світлодіодах, були використанні різні комбінації. Але в історії залишились лише більш успішні. Серед них була комбінація галій-арсен-фосфор, яка була використана для випромінювання

червоним світлом. Для світлодіодів із випромінюванням видимого спектру від червоного до жовтого використовується й до сьогодні комбінація алюміній-індій-галій-фосфор. В той час як для зеленої та синьої спектральних областей використовується комбінація із системи нітридних матеріалів – галій-нітрид, індій-нітрид, алюміній-нітрид. Тоді як нітрид з галієм дав поштовх до розвитку синьої спектральної області, та початок виготовлення білих світлодіодів, до яких був приєднаний люмінофор [109]. Але перспективним джерелом світла в експериментах та подальшому використанні його для морфогенезу рослин в умовах *in vitro* стала комбінація арсенід галію та алюмінію [29].

Нове покоління ламп проявило себе та зарекомендувало на продовольчому ринку, та відгородило конкурентів у використанні впливу на морфогенез рослин. Світлодіоди мають переваги у спектральному плануванні освітлення, де можливе налаштування освітлення через підбір світлодіодів на основі певних напівпровідників, але й через комбінацію готових світлодіодів з різним спектром випромінювання. Це дає прямо впливати на результат морфогенезу рослин, на різних його стадіях. На відмінну від своїх попередників світлодіоди мають менше теплового випромінювання, низьке енергоспоживання та більший термін придатності, що позитивно відбивається на економічній складовій. Приємним бонусом є розмір світлодіодів. З таким розміром можливо створювати будь-які конфігурації, що не буде шкодити ефективності освітленості рослин [11].

Існують потенційні недоліки, які ще вивчаються для надання точної відповіді. Таким є вплив на окислювально-відновний баланс клітин, що призводить до змін у генерації активних форм кисню і подальшого залучення антиоксидантної метаболічної активності [28]. Це може відбуватися через поглинання рослинами більшої світлової енергії, ніж потрібно для використання в обмінних процесах. Накопичення активних форм кисню може руйнувати структурні компоненти клітин. Хоча рослина має антиоксидантну метаболічну активність, яка може допомогти у цій

ситуації, але воно не буде ефективним, якщо стрес занадто сильний та тривалий [8, 78]. Хоча й існує такий недолік, але він може бути виправлений, якщо контролювати інтенсивність і тривалість світла, що досліджується експериментально для кожного виду рослин.

Отже, розвиток освітлення був тривалим процесом. Останні розробки в штучному освітленні з можливістю керувати спектром світла стали вирішальними у вивченні впливу спектрального складу світла на морфогенез рослин в умовах *in vitro* на різних стадіях розвитку рослин.

1.4. Фотоморфогенез в умовах *in vitro* та фоторецептори рослин.

Фотоморфогенез це одна із тем дослідження фотобіотехнологій рослин, де вивчається вплив світла, у різному його прояві, на розвиток рослин. В основі регулювання фотоморфогенезу лежить процес фотосинтезу рослин, який в свою чергу регулюється фоторецепторами та білками, які поглинають світло та ініціюють шляхи передачі сигналу, що призводить до змін експресії генів та клітинної фізіології. Фотоморфогенез в умовах *in vitro* є актуальним у наш час. Адже завдяки контрольованим умовам можна досягти цільових характеристик рослин, що є привабливим не тільки у дослідницьких проектах, але й у сільськогосподарській діяльності на вертикальних фермах. Змінюючи основні характеристики світла такі як: спектральний склад, інтенсивність, тривалість можна націлено впливати на морфогенез рослин. Для цього потрібно детальніше вивчати механізм фотосинтезу, та реакцію сприймання різного спектра світла фоторецепторами рослин, разом із побудовою карти метаболічних шляхів, які відтворюють вплив світла на розвиток чи інгібування росту рослин.

Фоторецептори є одними з головних об'єктів, які можуть впливати на розвиток рослин, маючи важливе значення в організації великомасштабних змін експресії генів для модуляції фотоморфогенезу. Світлові рецептори

відіграють центральну роль у сигнальних каскадах від ядра до пластид, а також можуть брати участь у каскадах від пластид до ядра для оптимізації та підтримки функцій пластид та метаболізму [38].

1.4.1. Механізм процесу фотосинтезу та його потенційний контроль фоторецепторами. Історія вивчення процесу фотосинтезу починалась з XVII ст. і не завершена по сьогодні. Основні відкриття були зроблені Ян Ван Гельмінт та Ніколя Теодор де Соссюр (вплив води), Джозеф Пристлі (вироблення O_2), Жан Сенеб'є (роль CO_2), Юліус фон Сакс (синтез крохмалю) [94]. Однак про важливість світла говорили Ян Інген-Хауз, який вперше привів гіпотезу про необхідність світла фотосинтезу, та Теодор Енгельман, який перший провів дослід надавши переконливі результати впливу спектра на фотосинтез, та продемонструвавши, що саме червоне та синє світло поглинаються хлорофілом, про що згадувалось у розділі раніше.

Існує вплив різного спектру світла, через що потрібно знати основу механізму фотосинтезу. Процес починається із поглинання світла пігментами, які наявні у рослині [96]. Різні типи пігментів поглинають різну довжину хвилі світла, що пов'язано з їх молекулярною будовою. Хлорофіли мають структуру, яка зосереджена навколо Mg^{+2} з довгим вуглецевим ланцюгом та прикріпленням до порфіринового кільця – поглинання червоного та синього спектрів світла. Каротиноїди структурно мають довгий спряжений вуглецевий ланцюг, який дозволяє поглинати синій та зелений спектри світла [65]. Флавоноїди мають п'ятнадцяти вуглецевий скелет з кількома ароматичними кільцями, поглинання відбувається у спектрах видимого ультрафіолету. Беталаїни ароматичні похідні індолу, які синтезовані з тирозину та мають поглинання у зеленому спектрі світла [91]. Через різний спектр поглинання, відбувається різне відбиття хвиль, що можна спостерігати в забарвленні рослин. Листя має зелений колір, тому що хлорофіли майже не поглинають зелений спектр світла, тільки відбиваючи його.

В момент потрапляння світла на молекули пігментів, енергія поглинається електронами в молекулі, збуджуючи електрони до вищого енергетичного стану, змушуючи електрони переходити на більш високий енергетичний рівень та передавати енергію сусіднім молекулам – резонансне перенесення енергії. Такий стан є нестабільним, тому електрони повертаються до початкового стану і вивільняють надлишок енергії у вигляді тепла, а частину енергії передають для керування процесом фотосинтезу у реакційні центри фотосистеми в момент, коли резонансне перенесення енергії доходить до останніх молекул фотосистем, які мають властивості передачі електронів на акцепторні молекули всередині фотосистем, що є початковим етапом світло залежних реакцій фотосинтезу [105]. Акцепторна молекула у фотосистеми II має назву феофітин, а у фотосистеми I – пластоціанін.

Наступним етапом відбувається розщеплення води у фотосистеми II. Електрон продовжує свою подорож, втрачаючи свою позицію з реакційного центру пігменту та замінюється вилученням електронів з молекул води. Цей процес має назву фотоліз, який утворює як побічний продукт кисень разом із протонами та електронами. Електрони, які були витягнуті з води, використовуються для залатування нестачі електронів в реакційному центрі пігментів. Це забезпечує безперервний потік електронів через електронно-транспортний ланцюг [36, 93]. Електрони із фотосистеми II пропускаються через електронно-транспортний ланцюг, одночасно генеруючи протонний градієнт через мембрану завдяки білковим комплексам, що призводить до утворення відновлених молекул з АДФ і НАДФ⁺ в АТФ та НАДФН (сильний відновник), які в подальшому використовуються в циклі Кальвіна-Бенсона.

Другою стадією фотосинтезу, яка відома під назвою світло незалежна реакція, є фіксація вуглекислого газу з подальшим використанням для органічних молекул. Рослини мають два альтернативні шляхи – цикл Кальвіна-Бенсона та цикл Хетча-Слека. Різниця у використанні рослинами

різних циклів полягає у їх пристосованості до різних умов навколишнього середовища [18].

Цикл Кальвіна-Бенсона починається із приєднання молекули вуглекислого газу до п'яти вуглецевої акцепторної молекули – рибулозо-1,5-бісфосфат. В результаті утворюється сполука, яка розщеплюється на дві молекули три вуглецевої сполуки – 3-фосфогліцерина кислота, і цей процес каталізується карбоксилазою-оксигеназою – Rubisco. За допомогою відновлених молекул із світлової фази, АТФ та НАДФН, молекули 3-фосфогліцерина кислоти відновлюються до гліцеральдегід-3-фосфату, частина якого використовується для конденсації та перебудови у сахарофосфати, які перетворюються на органічні сполуки, такі як крохмаль та сахарозу. Інша частина продовжує цикл для регенерації рибулозо-1,5-бісфосфату, що відбувається також завдяки додатковим молекулам із світової реакції АТФ [96].

Фотосинтез має більш розгорнену карту реакцій та перетворень сполук, але головними процесами є описана вище послідовність подій. На ці процеси впливають ядерні гени, які піддаються жорсткій регуляції. Як наслідок кодуєчі білки мають властивість функціонального впливу на пластиди рослин, тоді як фоторецептори необхідні для налаштування транскрипційних реакцій у мінливому світловому середовищі. Це підтверджує, що фотосинтез хоча й грає головну роль у розвитку рослин, але залишається під контролем ядра рослинної клітини, який під дією різного спектра світла має вплив на фотоморфогенез [38].

Існує декілька доказів, які можуть підтверджувати роль фоторецепторів у регуляції інформації між ядром і хлоропластом, яка націлена на контроль за потребами хлоропластів та фотоморфогенезу рослин. Одним з таких доказів є рTAC12/HEMERA (плазмідні транскрипційно активні хромосоми), які регулюють РЕР (пластид-кодовані полімерази), тоді як РЕР мають світлову модуляцію транскрипційних кофакторів сигма-фактора. Збільшення кількості транскрипту HEMERA є

світлочутливим процесом і залежить від фітохромів у червоному світлі та від криптохромів у синьому світлі. В ядрі NEMERA має роль транскрипційного ко-активатора для регуляції генів, які реагують на світло. У пластидах NEMERA асоціює з PEP та індукують експресію генів пластид. Свою дію NEMERA починає з пластид, а потім за допомогою сигнальних каскадних реакцій переміщується до ядра. Уся ця перехресна дія дає розуміння про взаємозв'язок між компонентами (NEMERA, PEP, фоторецептори) та їх участі в залежних реакціях фотосинтезу та фотоморфогенезу. Але в даний час немає повноцінної карти, яка б відповідала на питання як саме працює ця система каскадів між хлоропластом та ядром клітини [38].

1.4.2. Фоторецептори рослин та їх функції. Фоторецептори – це спеціалізовані світлочутливі білки, які допомагають рослинам сприймати світло та реагувати на нього. Фоторецептори відіграють одну з вирішальних ролей у рості та розвитку рослин, розвитку та фотосинтетичних функціях. У рослин виділяють основні п'ять класів таких рецепторів: фітохроми, криптохроми, фототропіни, комплекс з F-боксом та рецептори поглинання УФ та дальнього УФ випромінювання – UVR8 [88]. Але фоторецепторами можуть виступати й інші білкові компоненти. На сьогоднішній день вже відомо, що фоторецептори мають вплив й у інших регуляційних напрямках, наприклад, гормональна або терморегуляція, що робить їх мультирецепторами [87]. Розуміння взаємопов'язаних сигнальних мереж цих фоторецепторів має вирішальне значення для вивчення функцій і їх ролі в допомозі рослинам адаптуватися до змін навколишнього середовища [87].

Фітохроми одні з перших фоторецепторів, які були проаналізовані у рослинах. Фітохроми представлені у вигляді розчинних білків, які мають змогу зв'язувати фітохромобілін як хромофор і поглинати світло в області червоного і далеко-червоного випромінювання, що відповідають за різні фотоморфогенні реакції рослин. Виділяють 5 фітохромів – phyA-E, серед яких phyA є єдиним фоторецептором, який сприймає далеке червоне

світло. Під дією світла фітохроми здатні змінювати свою ізоформу в обох напрямках – Pr поглинає червоне світло з піком 650-670 нм, здатний переходити в активну форму Pfr, який поглинає далеке червоне світло з піком поглинання 705-740 нм та навпаки. Це відбувається через наявність у будові фітохромів фітохромбілінового тетрапірольного кільця, яке може ізомеризуватися під дією світла. Відомо, що співвідношення між неактивним та активним фітохромом впливає не тільки на різні шляхи сигналізації в рослині, але й беруть участь у мінеральному живленні рослин. Зниження такого співвідношення впливає на активність ферментів в азотному обміні, але з іншої сторони таке співвідношення сприяє направлення більшої кількості поживних речовин до вегетативної частини рослини, що призводить до швидкого зростання листя та стебла порівняно з кореневою частиною, що є підтвердженням позитивної дії далекого червоного світла на розвиток надземної частини рослини. Активні форми транслокуються в ядро з цитоплазми для регулювання експресії генів, які контролюють фотоморфогенетичні реакції – PIF. Окрім взаємодії з факторами транскрипції, фітохроми мають взаємодію з головним негативним регулятором світлового сигнального шляху – COP1. Взаємодіючи з таким комплексом у два різні способи (інактивування однойменної лігази, або через невідомий механізм дії на COP1 в ядрі), фітохроми блокують його негативну дію на інші транскрипційні фактори, які відповідають за морфогенез. Беручи за увагу усі відомі функції фітохромів, то загальний механізм направлений на блокування комплексів, які негативно впливають на фотоморфогенез [87, 88].

Криптохроми це флавопротеїни, які мають в своїй будові флавінаденідинуклеотид як хромофор. Для активації хромофору цієї групи необхідні молекулярні зміни в його структурі, такі як фосфорилювання, димеризація та формування фототіола. Криптохроми охоплюють спектр довжини світла від 380 нм до 650 нм та відіграють важливу роль у різних фізіологічних аспектах такі як проростання насіння, старіння листя, стресові

реакції та інші. Загалом в групі цих фоторецепторів звертають увагу на поглинання синього спектра світла та частину помаранчевого світла, з умови, що зелене світло відбивається. Тоді як зелене світло теж може поглинатися фотосинтетичними пігментами, дія яких опосередкована криптохромами. Поглинання цієї ділянки світлового спектра впливає на процеси асиміляції CO₂, формування біомаси. Так як і фітохроми, криптохроми можуть взаємодіяти та регулювати з цільовими факторами транскрипції, де два (Cry1-2) з трьох відомих криптохромів беруть в цьому участь. Взаємодія Cry2 з білковим комплексом CIB сприяє активуванню експресії генів. Інший білковий комплекс VIC, який є інгібітором сигналізації криптохромів, має зв'язок з Cry2 під впливом синього світла і блокує всі опосередковані криптохромами реакції. Але також існує й обернена регуляція, що свідчить про невивчений до кінця механізм регулювання каскадів регуляції у рослин [9, 32, 88].

Фототропіни – це кінази, які знаходяться в плазматичній мембрані і активуються синім світлом через фосфорилування. Наразі відомо про два види фототропінів, які містять два флавін-мононуклеотиди у вигляді хромофора на доменах LOV, а через с-кінцевий домен серин-треонінкінази можуть фосфорилувати субстрати. Фототропіни реагують на освітлення при довжині хвиль 400-550 нм, при цьому контролюючи процес фотосинтезу. У фотосинтезі фототропіни можуть контролювати рух, розміщення та перерозподіл хлоропластів, відповідають за продихи, що дозволяє контролювати реакцію рослин у відповідь на умови навколишнього середовища – освітлення, оптимізація CO₂, водообмін. Фототропіни Phot1 та Phot2 мають відмінності у функціональній здатності реагувати на світлові зміни, але при цьому мають спільні функції, які перекриваються, від чого рослина не страждає на відсутність певних реакцій, що відбувається при широкому діапазоні інтенсивності синього світла для першого фототропіну, або ж від яскравості для другого. Також ці фоторецептори можуть приймати участь у взаємодії з білками NPR3

(визначає напрямок росту) та PKS4 (фототропізм, рух хлоропластів) для регуляції сигнальних шляхів [61, 88].

Також для синього діапазону світла та UV-A (в діапазоні 320-500 нм) існує комплекс сигнальних рецепторів ZTL, FKF1, LKP2. Ці комплекси перетворюють світлові сигнали переважно шляхом активності лігазного комплексу SCF E3, що викликає зміни в цьому комплексі. Повідомляється що ZTL бере участь в регулюванні циркадного годинника, а FKF1, LKP2 в індукції цвітіння. Але ця роль не є однозначною, бо за аналізом декількох рослин, було доведено про відмінність у генетичній послідовності, яка кодує ці фоторецептори у однодольних та дводольних, що призводило до обміну функцій у цьому комплексі фоторецепторів, що доводить про невивченість регуляції рецепторів [55, 110].

UVR8 це один з останніх ідентифікованих фоторецепторів, який поглинає світло при довжині 280-320 нм. Його особливістю є використання набору ароматичних кілець із залишком триптофану замість хромофору, який й поглинає ультрафіолетове світло. Тобто, при поглинанні в області UV-B зв'язок між димером розривається і мономер, що утворився мігрує з цитоплазми в ядро, де взаємодіє з COP1 опосередкованому механізмі, блокуючи COP1, що в результаті стабілізує HY5 для ініціації експресії генів та фотоморфогенезу. Окрім цього, дані фоторецептори впливають на співвідношення різних типів хлорофілу [62, 87].

Цікавим видається, що у рослин наявна більша кількість фоторецепторів, які здатні сприймати довжини хвиль у діапазоні від 500 нм до 250 нм. Питання чому рослини мають саме такий набір фоторецепторів залишається відкритим. Проте вже відомо як кожен клас фоторецепторів має свій вплив на фотоморфогенез рослин та інші механізми, які можна об'єднати в групи за їх роллю у фотоморфогенезі (рис. 1.6).

Wavelengths of light	Photoreceptors	Plant responses
 Red, Far-red (600-750 nm)	PHYs	Germination, De-etiolation, Shade avoidance, Inhibition of stem and petiole elongation, Leaf expansion and flattening, Circadian rhythms, Flowering, Branching.
Green (530-570 nm)		
Blue (390-500 nm)	CRYs	De-etiolation, Inhibition of stem and petiole elongation, Leaf expansion, Circadian rhythms, Flowering, Flavonoid biosynthesis. Response to shade by B/G photoperception.
UV-A (320-390 nm)		
UV-B (290-315 nm)	PHOTs	Leaf flattening, Phototropism, Stomatal opening, Chloroplast relocation.
	ZTL/FKF1/LKP2	Circadian rhythms, Flowering.
	UVR8	De-etiolation, Flavonoid biosynthesis.

Рис. 1.6. Спектральний розподіл довжин хвиль світла та пов'язаних з ними реакції рослин у фотоморфогенезі [88].

Усі п'ять класів фоторецепторів є різними за будовою та механізмом дії, але мають й спільні характеристики. Незважаючи на це, комбінуючи декілька фоторецепторів, які мають часткове перекривання за своїми функціями, отримуючи таку синергію рослини можуть реагувати на оточуюче середовище для забезпечення відповідних фізіологічних реакцій.

1.4.3. Світло як каталізатор хімічних речовин. Існує багато істинних підтверджень про вирішальну роль світла у фотоморфогенезі. Еволюційно рослини розвинули тонкі механізми сприйняття світла, які допомагають підтримувати та підвищувати фотосинтетичні характеристики та пристосованість до навколишнього мінливого середовища. Ці механізми закладені в основу біохімії фотосинтезу, анатомії рослин, морфології, щоб збільшити збирання світла та уловлювання CO₂. До замкнутого кола світло-розвиток-світло додається керуюча функція світла, яка діє на рослини як сигнал, що сприяє регуляції фотоморфогенетичних реакцій, як наслідок перехід від одного етапу розвитку рослини на інший. З розвитком освітлювальних технологій, вчені дійшли до використання штучного світла не тільки у якості фотоперіодичної функції, але й для контролю

фотоморфогенетичних реакцій, використовуючи при цьому різний спектр світла або його комбінацію [88].

Частиною еволюційного механізму є фоторецептори, яких є певна різноманітність, і була описана у попередньому розділі. Але усі вони можуть підпорядковуватися загальним механізмам впливу. Для трьох груп фоторецепторів (фітохроми, криптохроми, фототропіни) в активній формі є димером, який утворюється у в процесі фосфорилування. Така активація відбувається через поглинання фотона світла в короткій довжині хвилі світла. Інактивація відбувається навпаки, через поглинання фотона світла, який має більшу довжину світла і є більш фотостабільним. Тобто, ці групи фоторецепторів мають два типи рецепторів у своїй будові [59].

Відомо, що перетворення отриманої інформації про світло та його склад в метаболічні реакції, які впливають на морфогенез рослин, відбувається під контролем деградації факторів транскрипції. Активна форма будь-якого фоторецептора проникає у ядра та зв'язує фермент, який відповідає за регулювання генетичних програм, як активацію так і деградацію за допомогою 26S протесом – COP1 та E3-убіквітинову лігазу. В ядрі білок COP1 має властивість до пригнічення фотоморфогенезу та регулювання усіх механізмів, які пов'язані до адаптації навколишнього середовища. Фоторецептори клітин працюють на видалення COP1 з ядра, щоб посприяти протилежному впливу на процеси морфогенезу від COP1 [57].

Ще одним механізмом впливу фоторецепторів, де активні форми фоторецепторів можуть напряду зв'язуватися з репресорами транскрипції в ядрі є E3-убіквітинова лігаза [16]. Ця сполука подібно до COP1 потрапляє в ядро та взаємодіє з реакціями, які впливають на інактивування регуляторних білків через протеосому. Є припущення, яке було продемонстровано на томатах нещодавно, щодо залежної від фототропіну регуляції генів, включно з тими, які кодують білки для регуляції транскрипції та трансляції. Однак наразі невідома повна карта механізму регулювання [43].

Однією з властивостей COP1 залежного механізму є активність в умовах за нестачі світла, що й призводить до зниження рівня фотоморфогенезу. Тому процес пригнічення цього механізму на світлі має результат накопичення транскрипційних факторів у ядрі, які підвищують активність фотоморфогенезу. На сьогоднішній день відомо, що такі фактори транскрипції як: bZIP, HY5, HYH, bHLH, HFR1, MYB-білок LAF1 – головними для регуляції пов'язаних з активацією у відповідь на світлові сигнали. У випадку відсутності світлових сигналів, перелічені транскрипційні фактори піддаються деградації під керівним механізмом COP1. Також цей загальний механізм взаємодіє з факторами взаємодії з фітохромом – PIF, що контролює відповідь рослин на зміну умов навколишнього середовища [20].

PIF є частиною факторів транскрипції bHLH, білки яких активують фотоморфогенез і дезактивують фотоморфогенез протягом усього життя рослин, беручи участь у світло залежній регуляції росту. PIF регуляція наявна навіть при сильному освітленні, бо є важливість у низькій регуляції пригнічення фотоморфогенезу, що не дасть рослинам виснажитися [58]. PIF контролюють ріст рослин завдяки кросрегуляції різних класів фітогормонів. Будучи посередниками в регуляції генів YUCCA, можуть впливати на кодування ферментів ауксину [37]. Такі білки як PIF3 і PIF4 мають властивість зв'язуватися із негативними інгібіторами генів DELLA, що мають пряму регуляцію на активність гібереліну, а в протилежну сторону – інактивація – PIF5 сприяє накопиченню репресорів гібереліну. Одночасно таке зв'язування між DELLA і PIF активує регуляторні гени, які відповідають за брасиностероїди, присутні у рослинах [17]. Було також описано, що активація фітогормонів ауксину та гіберелінів через фактори взаємодії з фітохромом відбувається на зміну розподілення спектра світла зі зменшенням частки червоного світла, тоді як активація брасиностероїдів навпаки підвищувалась за наявності в більшій мірі синього світла (рис. 1.7) [53].

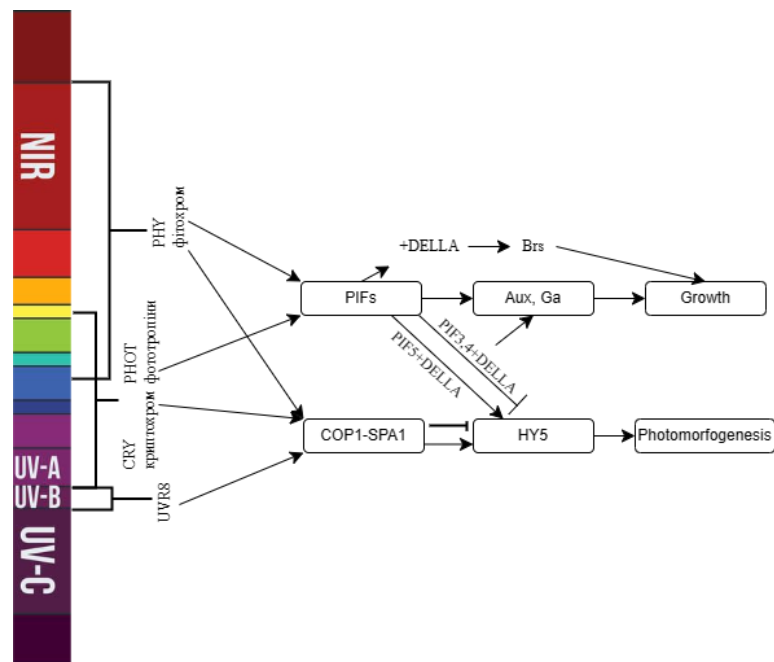


Рис. 1.7. Схема інтеграції сигналів різного спектру через фоторецептори на прикладі модельного організму *Arabidopsis thaliana*.

Примітка: PIF – фактори взаємодії з фітохромом, COP1 – білок, який регулюється гормоном жасмонат у відповідь на стрес, Aux – ауксин, Ga – гіберелін, HY5- транскрипційний фактор росту, DELLA – білок регуляції росту.

Існує інший тип взаємодії між DELLA та PIF можливий на зворотну дію, яка є частиною стресової реакції рослин, і побудована на наявності жасминової кислоти [58]. У відсутності жасмонату однойменні репресори JAZ взаємодіють з факторами транскрипції MYC, активаторів генів, які індукуються жасмонатами. Така взаємодія призводить до пригнічення функцій факторів транскрипції MYC та регулює відповідні генетичні програми. У цьому процесі також приймає участь DELLA, яка взаємодіє з білками JAZ, що знижує їх рівень та можливість для зв'язування з факторами MYC і це призводить до зниження комплексів взаємозв'язків між DELLA та PIF. Так як таких взаємозв'язків становиться менше, то PIF можуть функціонувати та активізовувати зростання рослин. З цим можна зробити обернений висновок, що синтез жасминової кислоти активізує руйнування репресорів JAZ, що дає змогу зв'язуванню комплексу DELLA

та PIF і призводить до зниження швидкості росту рослин. Такий баланс між MYC-залежною активацією генів, які чутливі до жасминової кислоти, і PIF-залежним ростом при слабкому освітлені може визначатися синтезом фітогормонів та білками DELLA. Тому білки DELLA можуть зв'язувати гіберелін, що в такому випадку активує ріст рослин за допомогою PIF і тим самим знижує експресію генів, які чутливі до жасминової кислоти (рис. 1.8) [52].

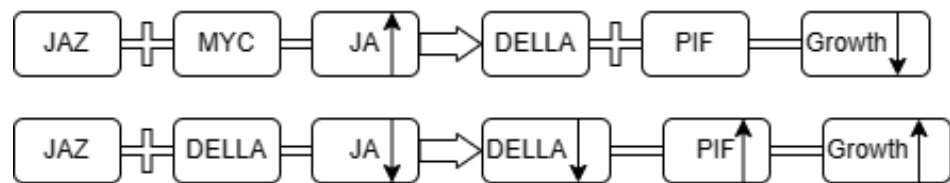


Рис. 1.8. Схема інтеграції сигналів при стресових ситуаціях (відсутність світла) на прикладі модельного організму *Arabidopsis thaliana*.

Примітка: Перший рядок відповідає за нормальні умови, другий рядок – стресові умови. JAZ – білок репресор, який регулюється гормоном жасмонат у відповідь на стрес, MYC – фактори транскрипції росту рослин, JA – жасминова кислота, DELLA – білок регуляції росту, PIF – фактори взаємодії з фітохромом, стрілки зображують підвищення або зниження рівня концентрації компонентів.

Фактори транскрипції PIF містять ДНК-зв'язуючі домени, а також відмінні домени, які є зв'язуючими елементами взаємодії з фітохромами. Для PIF1 та PIF3 є домен зв'язування з PhyA, тоді як інші PIF мають домени для PhyB. Дослідження XXI століття мають переконливі докази стосовно головної ролі PIF як перемикача у розвитку рослин, який може отримувати сигнал й від інших фоторецепторів [37]. На сьогоднішній день сигнали від фоторецепторів поділяють на три групи: репресор фотоморфогенезу COP1, активатор фотоморфогенезу HY5 та інтегратори сигналів PIF, але жодна не вивчена до кінця і піддається багатьма питанням.

1.5. Вплив різного спектрального складу світла на морфогенез *in vitro*.

Морфогенез рослин це складний процес клітинної диференціації та розвитку тканин. В той час системи культивування *in vitro* можуть забезпечувати контрольоване середовище як для вивчення морфогенетичних реакцій, так й подальше застосування у сільському господарстві та біотехнологічних застосувань. Світло, як зазначалось вище, є ключовим фактором з навколишнього середовища, що відіграє ключову роль у регуляції морфогенезу, як прямо націлено, так й опосередковано. При вивченні впливу світла, були сформовані висновки – існують три основні параметри, які відрізняють результат реакції рослин на освітлення: інтенсивність, фотоперіод та спектральний склад. Останнім параметром навчились регулювати умови зростання рослин відносно нещодавно – з відкриттям світлодіодів. Не маючи знань про молекулярний механізм відгуку рослин на різний спектр освітлення, дослідження проводились у формі спостережень морфогенезу та хімічному визначенні метаболітів рослин. На сьогоднішній день описано п'ять основних груп фоторецепторів рослин, які мають відношення до сигнального каскаду відповідей, але й до нині не описано детально жодного сигнального шляху. Тому далі пропонується розглянути які знання отримані наразі з впливу різного спектру світла на морфогенез та метаболічний профіль в умовах *in vitro* на кожній стадії розвитку рослин.

1.5.1. Стимулювання мікроклонального розмноження різним складом спектрального світла. Різні дослідження демонструють вплив довжин світла від ультрафіолетового до інфрачервоного на різні реакції в мікроклональних культурах. Але до сьогодні немає жодного звіту, який демонстрував би збір усіх можливих випадків впливу різних довжин світла, що допомогло б налаштовувати умови розмноження та вирощування рослин в залежності від поставленої мети, а також закласти стратегію для акліматизації рослин

мікроклонального розмноження до умов *ex vitro*, що забезпечить їм успішне приживання в польових умовах.

При морфогенезі рослин в умовах *in vitro* зазвичай першою головною стадією є індукція та проліферація калусу, яка присутня в непрямому органогенезі та регенерації рослин. Окрім цього, індукцію калусу використовують для накопичення різних метаболітів, які потім використовуються у промисловій практиці. Вплив різного спектра світла на калус спостерігається у різних рослин при монохромному освітлені чи в його комбінаціях. Такий різний вплив може пояснюватись різним набором генів, що кодують фоторецептори. Однак, в переважній кількості спільним залишається поглинання червоного та синього світлового спектру, що добре поглинаються фоторецепторами, які, як зазначалось вище, можуть блокувати комплекси, негативно впливаючи на фотоморфогенез. На додачу вплив червоного світла впливає на підвищення рівня фітогормонів, які необхідні для індукції калусу та подальшого морфогенезу і розвитку рослин. Підтвердженням цього була демонстрація впливу червоного світла на калус бавовни, де в результаті отримали експресію генів, активність антиоксидантних ферментів і як наслідок набір біомаси калусної тканини [107]. Подібним чином червоний спектр впливав на калус родин Зозулинцеві, Пасльонові, Товстянкових [3, 45, 51]. Окрім червоного світла, позитивно впливав на калус синій спектр світла, який через фоторецептори індукував та профілював розвиток цієї тканини, що було продемонстровано на родинях Розові, Вовчкові, Ароїдні [14, 86]. Незважаючи на популярність червоного та синіх кольорів, в одному з досліджень вирішили взяти до уваги жовтий спектр світла, що позитивно впливав на розвиток калусу у родин Бобових та Аралові [83]. Як згадувалось, окрім монохроматичного, використовують й комбіновані спектри світла, що потенційно можуть збільшувати пришвидшувати ріст калусу. Через існуючі докази позитивного впливу синього та червоного спектру, в ряді досліджень вирішено було об'єднати вплив цих спектрів. Таким чином, у родинях Пасльонові та Бобові

обробка таким набором спектрів світла призвела до збільшення біомаси калусної тканини [42, 92]. Однак, маючи такий набір даних та розуміючи неповну роль фоторецепторів на молекулярному рівні, ще залишається невідомим повний механізм дії спектрів світла [31].

Наступним етапом морфогенезу чи регенерації рослин є утворення і ріст пагонів, як це продемонстровано на рис. 1.3. Так само, як й на утворення та ріст калусу, фактори з навколишнього середовища (фітогормони, поживне середовище) впливають на пагін рослин, не винятком є різний спектр світла, ефект якого різниться від виду рослин та стадії розвитку рослини. Найпростішим ефектом від впливу синього спектру світла є пришвидшення росту пагонів у родинях Зозулинцеві та Айстрові [67]. На родини Глухокропівові, Ароїдних, Гіпоксидні, Капустяні та деяких представників Зозулинцеві синє світло стимулювало на збільшення кількості пагонів [14, 24, 30, 48, 60]. Окрім цього було примітним збільшення фітогормонів – цитокінінів, що є одним із шляхів покращення розвитку пагонів. Оберненою дією був вплив на рослини червоним спектром світла. В переважній кількості цей спектр демонстрував інгібуючий ефект. Але на органогенезі пагонів було доведено, що вплив одного й того самого спектру світла може по-різному відображатися у рослин навіть на рівні різниці сортів. За приклад було взято два різні види гвоздик, де вплив червоного спектру ніяк не впливав на перший вид, тоді як інший вид під червоним світлом розвивав довші пагони [72]. Є й інші рослини, де ріст пагонів був більший, або був ефект збільшення довжини вузла у таких родин як: Айстрові, Вовчкові, Виноградові, Зозулинцеві [48, 71]. Жовтий спектр добре впливав на родину Зозулинцеві, де пагін мав найбільшу довжину та їх біомасу [13]. Комбінаційний підхід використання спектрів також був продемонстрований на цю стадію розвитку рослин в умовах *in vitro*, де використовувалися червоний та синій спектри у різному співвідношенні. Таке поєднання надавало позитивний вплив на регенерацію та розвиток пагонів [31].

Третім етапом морфогенезу в умовах *in vitro* є індукція та розвиток кореневої системи. Не дивлячись що це підземна частина рослини, вона грає важливу роль в укоріненні рослин, і також залежить від механізмів, які активуються під дією світла. Знову було перевірено червоне світло, вплив якого продемонстрував позитивні результати у рослин родин: Молочайні, Тутові, Ароїдні, Мальвові, Маренові [25, 31]. Наразі одним із припущень впливу червоного світла на розвиток кореневої системи є виділення фітогормону ауксину, який за своєю характеристикою позитивно впливає на ріст коренів. Також було використано вплив синього спектру світла, який мав неоднозначний вплив. У таких родин як: Айстрові, Розові, Тонконогові, Проймові синє світло покращило розвиток та укорінення рослин, тоді як у родини Гірських чаїв пригнічувало кореневу активність рослин. На Розові синє світло впливало як позитивно так й негативно [31]. Використання синього світла обумовлено підвищенням експресії транскрипційних факторів, які потенційно можуть впливати на вкорінення рослин [34]. Окрім досліджень в монохромному спектрі впливу, були результати від комбінованих спектрів червоного та синього у різних співвідношеннях. Рослини родин Арацієві, Гірські чаї та Капустяні продемонстрували збільшений ріст коренів та їх виживання при комбінації червоного та синього у співвідношенні 3:1 [60]. У деяких представниках Орхідейних індукцією більшого росту коренів та біомаси було при далеко-червоному, червоному та синьому спектрах. Тоді як Глухокропивні свій позитивний результат демонстрували при червоно-зеленому освітленні [14]. В більш складній комбінації – фіолетово-синьо-зелено-червоного спектру (1:1:1:8) позитивним виявилось для родини Кипарисові [104]. Вплив спектрів на різні рослини відрізняється, тому вибір правильних спектрів або їх суміші допоможе кращій індукції та вкоріненню культур в умовах *in vitro*.

В морфогенезі в умовах *in vitro* зустрічається стадія цвітіння. Це є складний механізм, на який впливає багато факторів на генетичному, біохімічному та екологічних рівнях. Керування цим етапом морфогенезу є

важливим для декоративних рослин, але досліджень цієї стадії є найменшим. Але було представлено до загальної аудиторії такі результати як: вплив синього спектру світла показав індукцію раннього цвітіння у Капустяних та Губоцвіті, в той час як червоне світло негативно сприяло на ці родини. Однак червоний спектр позитивно впливав на цвітіння у Філантових та Молочайних [27, 101].

Завершальним етапом культивування рослин в умовах *in vitro* може бути акліматизація рослин при пересадженні їх на нове середовище, де світло також відіграє свою роль на вплив фотосинтезу та морфогенезу. Існує твердження, що світло може прямо чи опосередковано впливати на активні форми кисню та метаболічні реакції, які покращують механізми морфогенезу рослин. Акліматизація була проведена в умовах комбінації червоного та синього спектра світла на родини Ароїдні, Розові, Маренові, Виноградні [31].

Дослідження впливу різних спектрів світла для покращення морфогенезу рослин в умовах *in vitro* тільки починає привертати свою увагу до вивчення. Це є перспективним для вдосконалення масштабних комерційних систем розмноження різних культур рослин, в особливості садових. Універсальність нового покоління освітлення – світлодіодів – дозволяє індивідуально забезпечувати довжину хвилі, необхідну для окремих видів рослин в умовах мікророзмноження. Глибші дослідження цього напрямку нададуть змогу створити більш детальну таблицю впливів спектрів на кожний етап морфогенезу у різних рослин (табл. 1.1). Дана таблиця допоможе візуалізувати потреби кожної родини та представника при різному розподілу спектрів світла на кожній стадії морфогенезу. Згідно таблиці, можна зробити висновок, що найбільша кількість рослин при впливі різного спектра світла на морфогенез *in vitro* вивчена у родинях рослин Зозулинцеві, Розові, Вовчкові та Ароїдні.

1.5.2. Стимулювання біосинтезу метаболітів у рослин в умовах *in vitro* різним спектральним складом світла. Як зазначалось раніше, на метаболічну активність рослин впливають умови навколишнього середовища. Однак розвиток фотобіотехнологій довів, що світло є одним з першочергових факторів впливу на метаболізм рослин, в особливості в умовах *in vitro*, де вироблення та накопичення метаболітів позитивно впливає на ріст та розвиток рослин. На сьогоднішній день представлена дуже мала частина механізмів, які відповідають на реакцію зміни спектру світла та переводять це у зміну метаболічного профілю. Тому загальні дослідження зосередженні на етапі присутності чи відсутності певних метаболітів та визначення їх потенційної ролі у складному каскадному механізмі. Далі буде розглядатися низка наукових робіт, які присвячені впливам спектрів на метаболіти рослин при різних стадіях морфогенезу в умовах *in vitro*, що надасть змогу об'єднати існуючі знання та скласти таблицю для аналізу. Така таблиця може стати корисною при виборі спектрів світла, які націлені на певні метаболіти в особливості у рослин, які мають лікарське використання.

Фотохімічний контроль спектрів світла на вплив експресії генів під час фотоморфогенезу *in vitro* впливає на синтез нуклеїнових кислот, амінокислот, органічних кислот, цукрів, фенолів, трепеноїдів, алкалоїдів, пігментів, окислення ліпідів, які важливі для морфогенезу рослин. В рослинах постійно накопичується велика кількість окиснювачів, які призводять до стресу, причиною якого можуть бути умови навколишнього середовища. Щоб уникати наслідків окислювального стресу, рослина виробляє антиоксиданти (вітамін С, антоціан, фенольні сполуки, пігменти та інші). Вироблення таких сполук зазвичай супроводжується обробкою рослин різним спектром світла – інфрачервоним, червоним, синім [6]. Іншим шляхом накопичення метаболітів у рослинах був представлений у 2001 році Ma L та іншими, де культивуючи модельний організм в різних світлових спектрах, виявили 26 клітинних шляхів, які координувалися

світлом [69]. Серед таких шляхів був фенілпропаноїдний шлях, який пов'язаний з будовою клітинної стінки головним ферментом фенілаланінамічною лігазою, а також лігніном, який є похідним з біосинтезу фенілпропаноїдів. Лігнін часто використовується у промисловості, тому контролювання вмісту лігніну у рослинах має сенс. Так само контролювати можна вміст целюлози, яка піддається контролю фітохромів. Наразі результати різних досліджень демонструють, що сині та червоні світлодіоди найбільш ефективні на збільшення фенольних сполук, аскорбінової кислоти, антоціанів, каротиноїдів в залежності від виду рослин [10]. Відтак зелене світло впливає на зниження концентрації нітратів та підвищення рівня сахаридів у рослин. А при довжині 530 нм зелене світло може сприяти накопиченню каротину та антоціанів [6].

Конкретними прикладами накопичення вторинних метаболітів, а також демонстрування різниці впливу різного спектра світла, можна продемонструвати у родини Пасльонових представників *Hyoscyamus reticulatus* L. та *Withania somnifera* L, де обидві рослини є лікарськими. Аналіз калусу *Hyoscyamus reticulatus* L. на метаболіти був зроблений на вміст фенолу, флавоноїдів, алкалоїдів та інших вторинних метаболітів рослини у сумарному значенні при білому, червоному, синьому, комбінованому спектрах світла та його відсутності. Результати, які були отримані, корелюються із загальними висновками літератури. На феноли в більший мірі впливав комбінований червоно-синій спектр, на флавоноїди – червоний спектр, алкалоїди – комбінований червоний-синій спектр та на загальний вміст усіх вторинних метаболітів сприяв кращому накопиченню також комбінований спектр. Автори надавали припущення стосовно такого впливу на вторинні метаболіти, яке пов'язане із фенілаланінаміа-ліази, як це зазначалось в огляді вище [42].

Аналіз *Withania somnifera* L. теж проводився на калусній культурі. Спектри світла були обрані по всій спектральній довжині: ультрафіолет, синій, зелений, жовтий, червоний та білий. Під дією червоного світла було

отримано більшу кількість вторинних метаболітів в загальній кількості. Фенольні сполуки та флавоноїдні спостерігались у більшій концентрації у калусній культурі, яка росла під впливом ультрафіолетового кольору. Під червоним кольором була більша концентрація хлорогенової кислоти та вітаферину А. В цьому досліді автори теж висунули припущення про зв'язок вироблення вторинних метаболітів із ферментом фенілпропаноїдного шляху [3]. З таким висновком існує багато досліджень, можливо фенілпропаноїдний шлях буде вивчений краще у найближчі роки.

Обидва аналізи продемонстрували вплив різного спектра світла на калусній культурі, що є першим етапом морфогенезу рослин в умовах *in vitro*. В двох згадуваних дослідженнях 2019 та 2022 року був застосований увесь світловий спектр, але не було продемонстровано молекулярного пояснення, щодо реакції рослин на різний спектр світла, окрім зазначення загальних факторів транскрипції, що підтверджує розвиваючий потенціал фотобіотехнологій у майбутньому.

Усі знайдені результати досліджень можна об'єднати в одну таблицю (табл. 1.2), яка демонструє вплив різного спектра світла на біосинтез та накопичення метаболітів у різних родин [6, 10, 88]. Найбільш вивчаючими є родини рослин Айстрові, де модельним об'єктом виступає *Lactuca*, як й у вивченні морфогенезу та Глухокропивові. Також можна відзначити більший вплив синього спектра світла на різні метаболіти, або поєднання його із червоним спектром, що в загальному може підтверджувати висновки у дослідженнях [3, 42].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Withania somnifera – лікарська рослина родини пасльонових, яка має багато синонімічних назв у повсякденному житті. Цьому причина є ліки, виготовлені на основі цієї рослини, які використовують вже понад трьох тисячоліть. Налічується понад двохсот традиційних лікарських форм. Характерними властивостями є імунорегуляторна, протиракова, антиартритична та здатність до відновлення після нейродегенеративних розладів. Через високий попит на цю рослину, на сьогоднішній день *W. somnifera* є зникаючою рослиною в Пакистані [3]. Культивування лікарських рослин є важливим етапом для отримання вторинних метаболітів, які можуть мати окрім фармацевтичне значення, так й харчове, промислове значення. Щоб уникнути зникання лікарських видів рослин, їх вивчення є актуальною темою фотобіотехнологій.

В даній роботі наведений приклад впливу різного спектру світла на морфогенез *in vitro* та вторинних метаболітів лікарської рослини *Withania somnifera*.

2.1. Підготовка експлантів об'єкту дослідження

В [3] роботі використовували експланти рослини *Withania somnifera*, які були вирізані з листків рослини, вирощеної у горщиках в теплицях. Фрагменти були квадратної форми приблизно 2,5 см. Для стерилізації експлантів використовували 70% розчин етанолу протягом п'яти хвили, після чого промивали в 0,1% розчині хлориду ртуті протягом 3 хвилин. Далі експланти промивали тричі стерильною дистильованою водою та залишили просохнути на стерильному папері для фільтрування.

2.2. Приготування поживного середовища культивування

Для індукції калусу, підготовлені експланти культивували на середовищі Murashige і Skoog [80]. Середовище готували у конічних колбах об'ємом 100 мл та мало наступний склад: 3% сахарози та 0,8% агару. Також додавали у різному співвідношенню наступні компоненти: тидіазурон (0,1; 0,5; 1 мг·л⁻¹), бензиладенін (0,1; 0,5 мг·л⁻¹), альфа-нафталінова оцтова кислота (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 мг·л⁻¹), які були розраховані з попереднього досвіду для кращої індукції калусної культури (табл. 2.1). Середовище для контрольних зразків було з вмістом 0,5 мг·л⁻¹ тидіазурону та бензиладенін. рН середовища регулювали до значення 5,8±0,2. Автоклавування поживного середовища було здійснено при 121°C, впродовж 30 хв [3].

Таблиця 2.1

Концентрація фітогормонів поживного середовища, мг·л⁻¹.

	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№11	№12
Тидіазурон	1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0	0	0	0
Бензиладенін	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,5
α-нафталінова кислота	0	0,5	0	0,1	0,5	1	1,5	0,5	0,5	1,5	2	0,5

2.3. Перевірка впливу монохроматичного світла на ріст калусу в умовах *in vitro*

Для індукції калусу монохроматичним світлом використовували протокол Tariq [99]. В якому використовувалися такі спектри освітлення та світлодіодні трубки: фіолетовий 350-400 нм Philips (32 Вт); синій 380-560 нм Keliang (220 В; 50 Гц); зелений 480-670 нм Litex (40 Вт); жовтий 530-780 нм Philips (36 Вт); червоний 610-715 нм Binxiang (25 Вт). Контрольні групи були поміщені під холодне біле флуоресцентне світло з тривалістю світового дня 16 годин і 8 годин темряви. Температура була стандартною для всіх рослин – $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Дані усіх експериментів (по три екземпляри на кожні умови) щодо росту під час органогенезу калусу були зареєстровані після 5 тижнів культивування як маса свіжої культури та маса висушеної культури із додаванням стандартних похибок [3].

2.4. Оцінка вмісту загального вмісту фенолів і флавоноїдів

Після 5 тижнів культивування калусну культуру промивали стерильною дистильованою водою, надлишки якої видаляла за допомогою фільтрувального паперу. Просушування відбувалось в сухо жарі за температури 60°C одну добу. Отримана суха біомаса зважувалась та піддавалась екстракції для отримання метаболітів згідно протоколу Khan [54]. За яким 100 мг висушеної маси калусної культури кожного зразка замочували в 10 мл 80% метанолу та оброблювали їх в ультразвуковій ванні 3 рази по 10 хвилин з інтервалом у 30 хвилин. Після денатурації клітинних стінок, слідувало центрифугування 10 хвилин при 8000 об/хв., що допомогло б розділити на фракції. Супернатант переносили в пробірки та зберігали при 4°C . Для оцінки фенолів використовували метод Adil [4]. Де вимірювали поглинання реакційної суміші при 760 нм спектрофотометром. Для отримання калібрувальної кривої стандартно використовували

галову кислоту, де після побудови калібрувальної кривої загальний фенол калусу був розрахований як еквівалент мг галової кислоти на г сухої маси [5]. Тоді як для оцінки флавоноїдів визначали калориметрично за методом Khan [54], і був виражений еквівалентно у мг – еквівалентах кварцетину г^{-1} [3].

2.5. Оцінювання антиоксидантного потенціалу

Як зазначено було в огляді літератури, на морфогенез можуть впливати активні форми кисню, які можуть вироблятися під різним освітленням. Тоді як рослина має шлях подолання накопичення радикалів кисню, виробляючи антиоксидантні сполуки, які теж контролюються світлом. Саме тому, був оцінений антиоксидантний потенціал за 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил (DPPH) активністю поглинання вільних радикалів (DFRSA), загальну антиоксидантну здатність (TAC) та загальну відновну здатність (TRC) [3].

Для активності поглинання вільних радикалів DPPH використовували протокол Abbasi [1]. Для оцінки TAC і TAR використовували протокол Jafri [47]. Де для TAC змішували екстракт калусної культури в об'ємі 0,1 мл з 1 мл реакційної суміші (сірчана кислота, фосфат натрію, молібдат амонію) і витримували цю суміш на водяній бані при 95°C та охолоджували до кімнатної температури. Після вимірювання антиоксидантного потенціалу зразка вимірювався при 697 нм спектрофотометром і виражений в еквівалентні мг аскорбінової кислоти. Для TAR було змішано 0,2 мл екстракту калусної культури з 0,5 мл фосфатного буфера та 0,5 мл ферицинід калію. Таку суміш витримували на водяній бані 20 хв при 50°C з подальшим охолодженням до кімнатної температури. Далі додавання 10% трихлороцтової кислоти і центрифугування 3000 об/хв. 10 хвилин. Супернатант відбирали у стерильні пробірки та додавали дистильовану воду для об'єму та 100 мкл 0,1% хлориду заліза. Вимірювання поглинання реакційної суміші відбувалось при 700 нм, в якості контролю

використовували метанол, відновна здатність виражали в еквівалентні мг аскорбінової кислоти [3].

2.6. Оцінювання діяльності ферментів захисної системи рослинної клітини

Калус, який був зібраний через 5 тижнів культивування з кожної з випробувальних світлових процедур обробляли для екстракції білка за протоколом Nayyar and Gupta [82]. Концентрацію загального вмісту білка використовували метод Lowry [66]. Де сироватковий альбумін великої рогатої худоби використовувався як стандарт, а загальний вміст білка виражався через еквівалент до сироватки в мг. Тоді як супероксиддисмутазу вимірювали за протоколом Adil [4]. Для реакційної суміші змішували 50 мМ фосфатного буфера, 13 мМ метіоніну, 75 мМ нітро синього тетрахолію хлориду, 2 мМ рибофлавіну, 0,1 мМ ЕДТА та 60 мкл ферментного екстракту.

2.7. Оцінювання активності протеази та вмісту малонового діальдегіду в калусній культурі

Активність протеази оцінювали згідно протоколу Лоурі-Фоліном [74]. Де інкубували 100 мг сухої біомаси калусної культури в 4 мл 1% казеїну в цитрат фосфатному буфері при рН 7.0 протягом 1 години при 30°C. Після інкубування додавали 5 мл 5% трихлороцтової кислоти та центрифугували при 13000 g 15 хвилин для осадження білка. Супернатант в об'ємах 5 мл змішали з 5 мл реакційної суміші, яка мала 2% карбонату натрію, 2,7% тартрату калію і 1% мідного купоросу. В подальшому додати натрій гідроксид. Після витримування суміші протягом 10 хвилин додали флавоноїдмісний реагент, інкубували 60 хвилин і виміряли абсорбцію при 660 нм. Протокол Bailly був використаний для оцінки вмісту малонового діальдегіду на основі тіобарбітурової кислоти [3, 7].

2.8. Аналіз вмісту вторинних метаболітів на основі вискоєфективної рідинної хроматографії

Для виявлення вітанолідів брали за основу протокол Mundkinajeddu та модифікували його [77]. Для цього використовували систему Jasco HPLC. Розділення вторинних метаболітів досягали колонкою 5 мкм Luna C18 250 × 4,6. Рухома фаза складалась з двох розчинників: А (ультра чиста вода з трифтороцтовою кислотою; В – метанол класу HPLC. HPLC для градієнтного елюювання налаштовувався наступним чином: 30% розчину В на початку, 80% через 15 хвилин, 80% 20 хвилин і 30% через 23 хвилини. При цьому швидкість потоку встановили 0,7 мл за хвилину при об'ємі забору рідини в 20 мкл. Елюент був проаналізований при 230 нм, а для чіткого уявлення про різноманітність зразків, була інтегрована ділянка піків 15-26 хв, які визначені були як загальна область вітанолідів. За стандарт та для кореляції були пропущені через систему HPLC хлорогенова кислота та вітаферину А [3].

2.9. Статистична обробка даних

Експерименти проводилися тричі. Середні значення повторів індукції калусу були піддані дисперсійному аналізу ANOVA. А різниця була розподілена за допомогою однофакторного аналізу ANOVA з тестом Тьюкі з використанням Statistix. Усі зображення представлені були через програмне забезпечення Origin lab з відображенням середніх похибок [3].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Підтвердження впливу регуляторів росту на індукцію та ріст калусної культури рослин *in vitro*

Регулятори росту рослин займають важливу позицію для росту та розвитку рослин. Як зазначено в огляді літератури – фітогормони та їх концентрація є вирішальною для морфогенезу рослин. Також можливим є поєднання їх впливу із іншими факторами впливу, що впливають на морфогенетичні реакції та метаболічний профіль рослин в умовах *in vitro*. Однак мати узагальненні дані потрібних концентрацій для індукції калусної культури є неможливим через різницю біохімічного складу кожної рослини та інших факторів впливу на рослини. Тому потрібно вивчати кожен вид рослин для успішного утворення калусної культури.

Тому в роботі [3] експеримент був побудований на різній концентрації фітогормонів у поживному середовищі для культивування експлантів *W. somnifera*. Де найвищий відсоток утворення калусу було досягнуто на середовищі з вмістом тидіазурону та альфа-нафталнової кислоти в концентраціях $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. На додачу така комбінація забезпечила найбільшу біомасу та суху масу калусу.

3.2. Вплив світла на морфогенетичні зміни та вторинні метаболіти в умовах *in vitro*

Світло є основним джерелом енергії для рослин, яке використовується фотосинтетичними механізмами для синтезу сполук. Сонячне світло складається як з видимих, так і далеких довжин хвиль. Останнім часом все більше підтверджень щодо поглинання рослинами червоного та синього спектра світла, яке й відіграє важливу роль у морфогенезі рослин та регуляції певних біосинтетичних шляхів (рис. 3.1) [3].

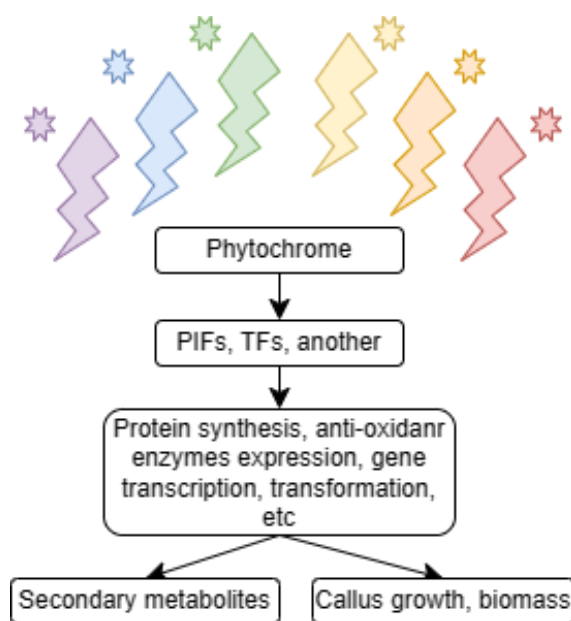


Рис. 3.1. Демонстраційна схема впливу різного спектру світла на морфогенез рослин та накопичення вторинних метаболітів в умовах *in vitro*. Де різні спектри сприймаються фоторецепторами, які активують або блокують роботу факторів біосинтезу, що призводить до різного набору відповідей (зі змінами) [3].

3.2.1. Ефект різної спектрової діяльності на утворення калусної культури та накопичення біомаси. Як зазначалось в огляді літератури, із появою нових технологій освітлення, стало можливим додати ще одну властивість до фактору впливу – спектр світла. З того часу фотобіотехнології експериментують та перевіряють вплив різних спектрів при різних умовах та стадіях розвитку рослин. В результаті цього дослідження було показано, що червоне світло 610-715 нм було ефективним і призводило до максимального утворення калусу з експланту лікарської рослини (рис. 3.2) [3]. Тоді як фіолетовий спектр проявив найнижчу індукцію калусної культури. Такий результат підтверджує літературні огляди, стосовно впливу червоного світла на морфогенез, що може бути пов'язано з біосинтезом фітогормонів.

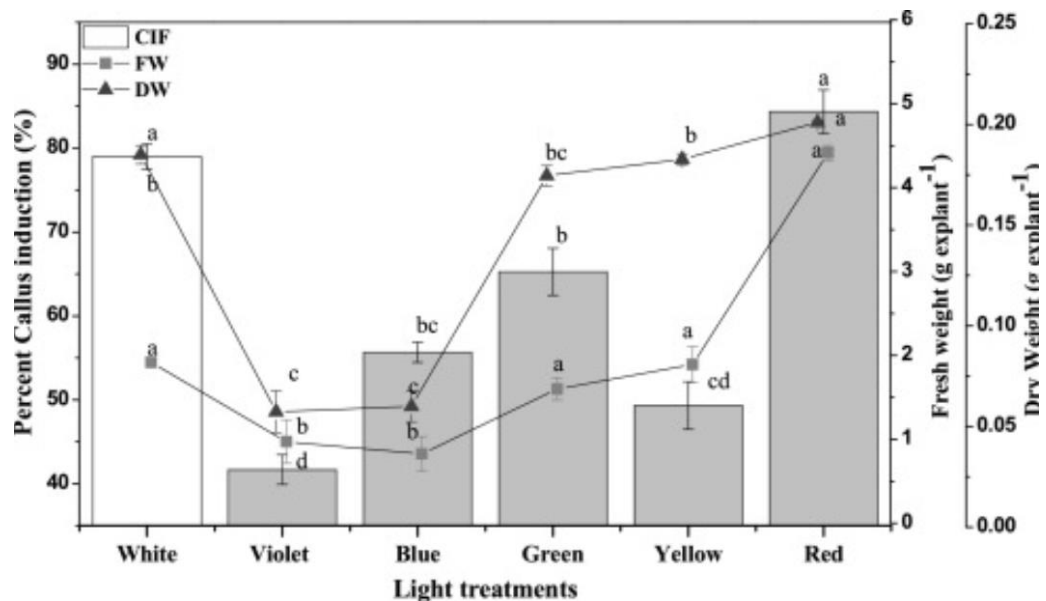


Рис. 3.2. Вплив різної довжини світлової хвилі на відсоток утворення калусу (стовбці – CIF) та утворена біомаса калусу після 35 днів культивування у свіжому (квадратні точки – FW) та сухому вигляді (трикутні точки – DW).

Примітка: усі значення сформульовані з трьох повторних серій експериментів та мають стандартне відхилення [3].

У порівнянні з усіма представленими джерелами червоний так само позитивно впливав на утворення калусу – 4,4 г та мав більшу суху масу 0,2 г. Загальні висновки про червоний спектр світла повідомлялось й раніше у інших видах рослин. Хоча, у літературі поодинокі зустрічаються позитивні результати дії на морфогенез рослин в умовах *in vitro* інших спектрів. Однак висновок обґрунтовується на можливому більшому вмісті поживних речовин (цукри) при червоному спектрі світла, що й спричиняє утворенню більшої кількості біомаси. Також було помітно, що при червоному спектрі супроводжується високою активністю нітратдуктази, що пришвидшує метаболізм азоту і потенційно збільшення накопичення біомаси [3].

3.2.2. Вміст загального розчинного білка, малонового діальдегіду, активність ферментів в калусній культурі в умовах *in vitro*. Для рослинних ферментів вміст розчинного білка може слугувати як резервуар, а також має властивість діяти як осмотичний регулятор, що може моделювати ріст та

метаболізм клітин. У цій роботі [3] було показано вплив різних спектрів світла на вміст загального білка, активністю протеази яка є частиною вродженого імунітету, та вміст малонового діальдегіду. Малоновий діальдегід використовувався як індикатор перекисного окислення ліпідів і вказує на збільшення активних форм кисню у клітинах за несприятливих умов. Таким чином максимальний вміст білка – 376,6 мкг, спостерігався при обробленні білим світлом, але при цьому калус оброблений таким світлом мав найнижчий рівень активності протеази (рис. 3.3).

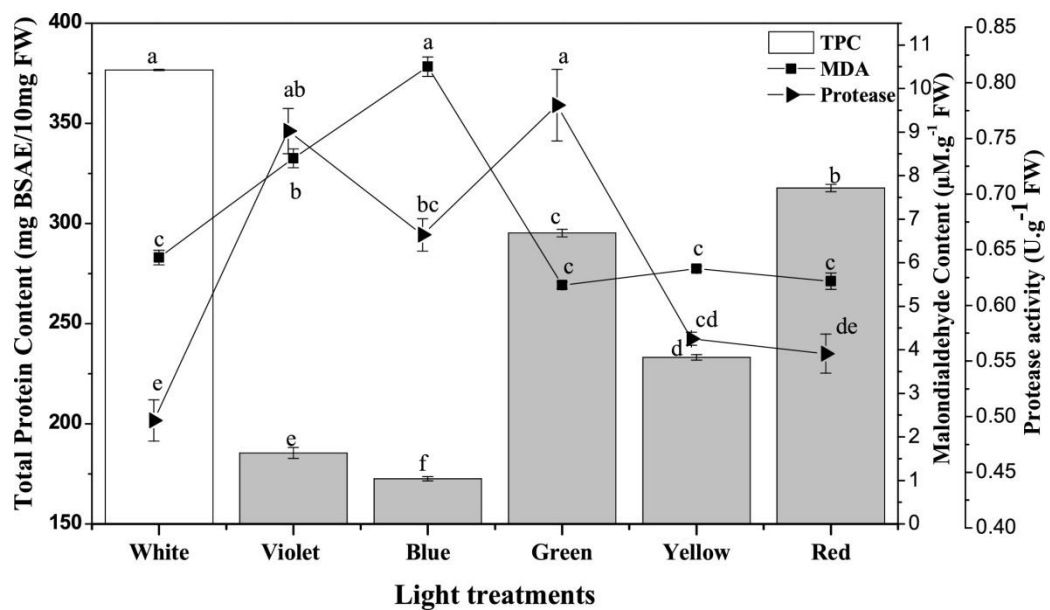


Рис. 3.3. Вплив різної довжини світлової хвилі на загальний вміст білка (стовбці – TPC), малонового діальдегіду (квадратні точки – MDA) та протеази (трикутні точки – Protease).

Примітка: усі значення сформульовані з трьох повторних серій експериментів та мають стандартне відхилення [3].

Більша активність малонового діальдегіду під впливом фіолетового кольору корелюється з найменшими результатами накопиченню біомаси калусу та найменшими результатами загального вмісту білків, що може бути прямим доказом негативного впливу фіолетового спектра на цей вид лікарської рослини. Але робити узагальнення про вплив певного освітлення на збільшення вмісту білків для усіх рослин неможливо.

Серед активності дії компонентів антиоксидантного механізму рослин на калусній культурі вивчали за пероксидазою та супероксиддисмутазою (рис. 3.4). Саме ці ферменти важливі для усунення активної форми кисню, накопичення якого негативно впливає на морфогенез та метаболічну активність рослин.

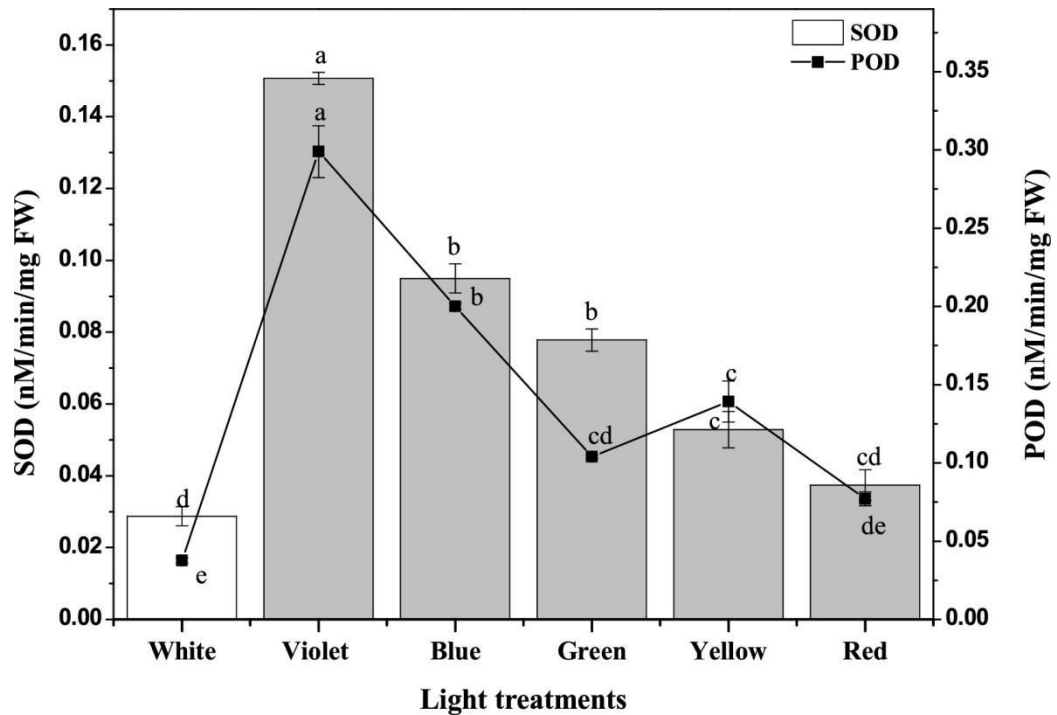


Рис. 3.4. Вплив різної довжини світлової хвилі на супероксиддисмутази (стовбці – SOD), пероксидази (квадратні точки – POD).

Примітка: усі значення сформульовані з трьох повторних серій експериментів та мають стандартне відхилення [3].

Як очікувалось з попереднього висновку, більша кількість ферментів була виявлена при оксидантному стресі, які були направлені для захисту рослинних клітин, що було спричинено обробкою фіолетовим спектром світла. Знижені рівні SOD та POD спостерігалось при білому та червоному освітленні, що може бути пов'язаним із меншим ступенем окислювального пошкодження.

3.2.3. Вміст вторинних метаболітів в калусній культурі в умовах *in vitro*. Вторинні метаболіти є важливими сполуками для рослин, які

виробляється під дією різних факторів впливу. Звісно концентрація таких метаболітів відрізняється від рослин, які вирощенні в дикій місцевості із рослинами вирощеними в контрольованих умовах *in vitro* в особливості контролюючи освітлення. Максимальну кількість екстракту загальних вторинних метаболітів спостерігалось під впливом червоного світла протягом усього періоду культивування, а освітлення жовтим спектром було майже на рівні з білим та посіло третє місце, що неочікувано. Бо в літературі майже немає підтвердженого позитивного впливу жовтого спектру світла на морфогенез рослин в умовах *in vitro* (рис. 3.5).

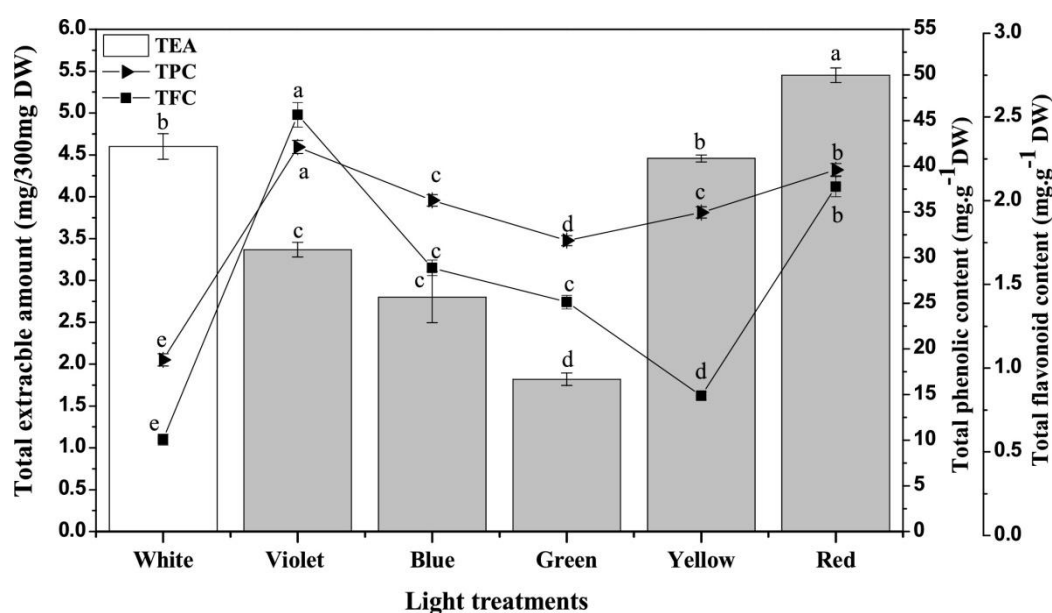


Рис. 3.5. Вплив різної довжини світлової хвилі на кількість екстрагованої калусної культури (стовбці – TEA), вміст флавоноїдів (квадратні точки – TFC) та фенолів (трикутні точки – TPC).

Примітка: усі значення сформульовані з трьох повторних серій експериментів та мають стандартне відхилення [3].

У порівнянні з усіма спектрами впливу, при фіолетовому спектрі був зафіксований найбільший вплив фенолів та флавоноїдів, що скоріше пов'язано із системою фоторецепторів UVR8 та їх впливом на подальші зв'язування із факторами впливу. Фенольні та флавоноїдні сполуки мають важливе значення у застосуванні в фармакологічній ніші.

В той час вміст вітанолідів та хлорогенової кислоти у калусній культурі продемонстрували значну варіацію (рис. 3.6). Знову при обробці експланту під час морфогенезу червоним кольором, були найбільші показники в екстракті на вміст сполук. Неочікувано, що вітаферин А за умовами зеленого освітлення продемонстрував добрі результати. З цих результатів можна зробити висновок, що можливо феніламіачна лігаза була активована під час росту калусу при червоному спектрі, що сигналізувало фенілпропаноїдний шлях для обходу окисного стресу *in vitro* через вироблення більш високої концентрації вітанолідів для морфогенезу рослин [3].

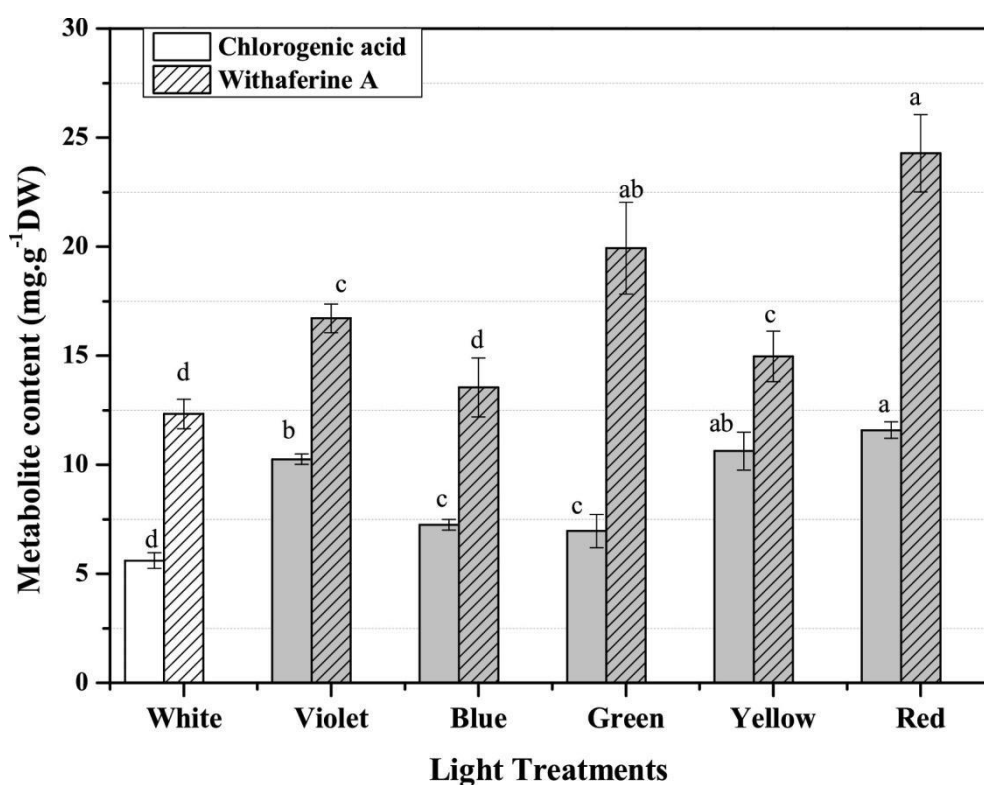


Рис. 3.6. Результати синтезу хлорогенової кислоти та вітаферину А в калусній культурі при обробці різним спектром світла протягом 5 тижнів [3].

3.2.4. Антиоксидантна активність у культурах калусу. *W. somnifera* є зникаючою лікарською рослиною, тоді як отримання калусної культури із подальшим морфогенезом в умовах *in vitro* може врятувати цю рослину та збільшити виробництво потенційно-цікавих сполук для фармацевтичної галузі. В особливості люди використовують антиоксидантну властивість

рослини. Тому був створений аналіз дії різних спектрів світла на вироблення цих сполук в умовах *in vitro*. І знову калусна культура яка була індукована та вирощена під впливом червоного світла була у лідерах – висока антиоксидантна властивість за трьома параметрами (рис.3.7). Це узгоджується з результатами високого вмісту вторинних метаболітів за таких саме умов культивування [3].

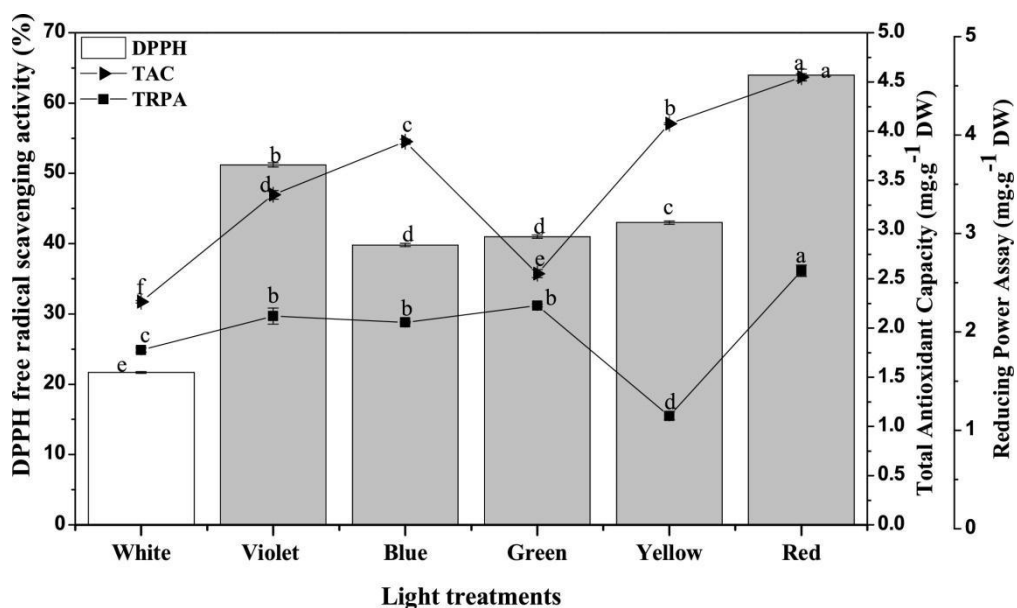


Рис. 3.7. Вплив різної довжини світлової хвилі на індукованість світлом зміни активності поглинання вільних радикалів DPPH (стовбці), відновної сили аналізу в культурах калусу (квадратні точки – TRPA) загальної антиоксидантної здатності (трикутні точки – TAC).

Примітка: усі значення сформульовані з трьох повторних серій експериментів та мають стандартне відхилення [3].

ВИСНОВКИ

1. Фотобіотехнології мають історичне підґрунтя, але є сучасною галуззю біотехнологій, яка вивчає стратегії для покращення поглинання світла, фіксації вуглецю та метаболічних шляхів для збільшення виробництва біомаси і контролю біохімічного складу для подальшого застосування рослин у різних галузях.

2. Морфогенез рослин *in vitro* включає органогенез, калусогенез, ембріогенез, на які впливають різні фактори. Однак, із появою нових методів освітлення, було досліджено, що спектральний склад світла є важливим фактором, який істотно впливає на ріст та розвиток, а також метаболічний профіль рослин.

3. З появою нових методів освітлення, штучне освітлення стало критично важливим фактором впливу на ріст рослин в умовах *in vitro*. Різні типи ламп дозволяють змінювати інтенсивність та спектральний склад світла, впливаючи на швидкість росту, морфологічні характеристики та фізіологічні процеси рослин. Світлодіодні лампи дозволяють налаштовувати спектри у монохроматичному та комбінованому варіантах.

4. Рослини мають п'ять основних відомих фоторецепторів, які сприймають світло різного спектру та ініціюють фотоморфогенез через трансдукції, змінюючи експресію генів та фізіологічні процеси для адаптації рослин до освітлення.

5. Вплив спектрального складу світла на морфогенез та метаболізм рослин різниться в залежності від систематичної приналежності рослин. В експериментальних дослідженнях було виявлено, що зміна спектру світла може впливати на морфогенез *in vitro* і регулювати шляхи вторинного метаболізму, через фоторецептори рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abbasi B. H., Ali J., Ali M., Zia M., et al. Free radical scavenging activity in in vitro-derived tissues of *Eruca sativa*. *Toxicology and Industrial Health*. 2016. Vol. 32, N 1. P. 98–105.
2. Adamczuk A., Siegień I., Ciereszko I. Morphogenesis of plants in vitro under stress conditions. *Biological diversity - from cell to ecosystem*. 2012. P. 25–40.
3. Adil M., Haider Abbasi B., Haq I. ul. Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. *Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 24. P. e00380.
4. Adil M., Ren X., Jeong B. R. Light elicited growth, antioxidant enzymes activities and production of medicinal compounds in callus culture of *Cnidium officinale* Makino. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 2019. Vol. 196. P. 111509.
5. Adil M., Ren X., Kang D. I., Thi L. T., et al. Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino. *Molecular Biology Reports*. 2018. Vol. 45, N 6. P. 1919–1927.
6. Al Murad M., Razi K., Jeong B. R., Samy P. M. A., et al. Light Emitting Diodes (LEDs) as Agricultural Lighting: Impact and Its Potential on Improving Physiology, Flowering, and Secondary Metabolites of Crops. *Sustainability*. 2021. Vol. 13, N 4. P. 1985.
7. Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Come D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*. 1996. Vol. 97, N 1. P. 104–110.
8. Banerjee A., Roychoudhury A. Plant Responses to Light Stress: Oxidative Damages, Photoprotection, and Role of Phytohormones. *Plant Hormones under Challenging Environmental Factors*. 2016. P. 181–213.

9. Bartölke R., Behrmann H., Görtemaker K., Yee C., et al. The secrets of cryptochromes: photoreceptors, clock proteins, and magnetic sensors. *Neuroforum*. 2021. Vol. 27, N 3. P. 151–157.
10. Batista D. S., Felipe S. H. S., Silva T. D., Castro K. M. de, et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2018. Vol. 54, N 3. P. 195–215.
11. Bello-Bello J. J., Pérez-Sato J. A., Martínez-Estrada C. A. C.-C. and E., Bello-Bello J. J., et al. Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. *Chlorophyll*. 2017. Vol. 6, P. 93–103.
12. Bidabadi S. S., Jain S. M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants*. 2020. Vol. 9, N 6. P. 702.
13. Billore V., Jain M., Suprasanna P. Monochromic radiation through light-emitting diode (LED) positively augments in vitro shoot regeneration in Orchid (*Dendrobium sonia*). *Canadian Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 1, N 2. P. 50–58.
14. Budiarto K. Spectral Quality Affects Morphogenesis on Anthurium Plantlet during In Vitro Culture. *Agrivita : Journal of Agricultural Science*. 2010. Vol 32, N 3. P. 234–240.
15. Bull T., Michelmore R. Molecular Determinants of in vitro Plant Regeneration: Prospects for Enhanced Manipulation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13.
16. Casal J. J., Candia A. N., Sellaro R. Light perception and signalling by phytochrome A. *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65, N 11. P. 2835–2845.
17. Casal J. J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review of Plant Biology*. 2013. Vol. 64. P. 403–427.
18. Cerling T. E., Wang Y., Quade J. Expansion of C4 ecosystems as an indicator of global ecological change in the late Miocene. *Nature*. 1993. Vol. 361, N 6410. P. 344–345.

19. Chalima A., Oliver L., Fernández de Castro L., Karnaouri A., et al. Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds. *Fermentation*. 2017. Vol. 3, N 4. P. 54.
20. Chen D., Xu G., Tang W., Jing Y., et al. Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2013. Vol. 25, N 5. P. 1657–1673.
21. Chennakesavulu K., Singh H., Trivedi P. K., Jain M., et al. State-of-the-Art in CRISPR Technology and Engineering Drought, Salinity, and Thermo-tolerant crop plants. *Plant Cell Reports*. 2022. Vol. 41, N 3. P. 815–831.
22. Chiaranunt P., White J. F. Plant Beneficial Bacteria and Their Potential Applications in Vertical Farming Systems. *Plants*. 2023. Vol. 12, N 2. P. 400.
23. Christie J. M., Zurbriggen M. D. Optogenetics in plants. *New Phytologist*. 2021. Vol. 229, N 6. P. 3108–3115.
24. Cybularz-Urban T., Hanus-Fajerska E., Bach A. Callus induction and organogenesis in vitro of cattleya from protocorm-like bodies (plbs) under different light conditions. *Acta Scientiarum Polonorum-hortorum Cultus*. 2015. Vol. 14, N 6. P. 29–38.
25. Daud N., Faizal A., Geelen D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 2013. Vol. 49, N 2. P. 183–190.
26. Delporte F., Pretova A., Jardin P. du, Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*. 2014. Vol. 251, N 6. P. 1455–1470.
27. Dewir Y. H., Chakrabarty D., Hahn E.-J., Paek K.-Y. Flowering of *euphorbia millii* plantlets in vitro as affected by paclobutrazol, light emitting diodes (leds) and sucrose. *Europe. J. Hort. Science* 2007. Vol. 71, N 1. P. 240–244.

28. Dutta Gupta S., Agarwal A. Influence of LED Lighting on In Vitro Plant Regeneration and Associated Cellular Redox Balance. *Light Emitting Diodes for Agriculture: Smart Lighting*. 2017. P. 273–303.
29. Dutta Gupta S., Jatothu B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*. 2013. Vol. 7, N 3. P. 211–220.
30. Dutta Gupta S., Sahoo T. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during in vitro shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015. Vol. 37. P. 233.
31. Fan C., Manivannan A., Wei H. Light Quality-Mediated Influence of Morphogenesis in Micropropagated Horticultural Crops: A Comprehensive Overview. *BioMed Research International*. 2022. Vol. 2022. P. 4615079.
32. Fraikin G. Ya. Photosensory and Signaling Properties of Cryptochromes. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2022. Vol. 77, N 2. P. 54–63.
33. Garcia-Perez E., Diego-Martin B., Quijano-Rubio A., Moreno-Giménez E., et al. A copper switch for inducing CRISPR/Cas9-based transcriptional activation tightly regulates gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Biotechnology*. 2022. Vol. 22, N 1. P. 12.
34. Gil C. S., Jung H. Y., Lee C., Eom S. H. Blue light and NAA treatment significantly improve rooting on single leaf-bud cutting of *Chrysanthemum* via upregulated rooting-related genes. *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 274. P. 109650.
35. Gilmour D., Rembold M., Leptin M. From morphogen to morphogenesis and back. *Nature*. 2017. Vol. 541, N 7637. P. 311–320.
36. Govindjee, Shevela D., Björn L. O. Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective. *Photosynthesis Research*. 2017. Vol. 133, N 1. P. 5–15.

37. Goyal A., Karayekov E., Galvão V. C., Ren H., et al. Shade Promotes Phototropism through Phytochrome B-Controlled Auxin Production. *Current biology: CB*. 2016. Vol. 26, N 24. P. 3280–3287.
38. Griffin J. H. C., Toledo-Ortiz G. Plant photoreceptors and their signalling components in chloroplastic anterograde and retrograde communication. *Journal of Experimental Botany*. 2022. Vol. 73, N 21. P. 7126–7138.
39. Gururani M. A. Photobiotechnology for abiotic stress resilient crops: Recent advances and prospects. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, N 9. P. e20158.
40. Hangarter R. P., Gest H. Pictorial demonstrations of photosynthesis. *Discoveries in Photosynthesis*. 2005. P. 701–705.
41. Harvey R. B. Growth of Plants in Artificial Light. *Botanical Gazette*. 1922. Vol. 74, N 4. P. 447–451.
42. Hassanpour H. Potential impact of red-blue LED light on callus growth, cell viability, and secondary metabolism of *Hyoscyamus reticulatus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2022. Vol. 58, N 2. P. 256–265.
43. Hloušková P., Bergougnoux V. A subtracted cDNA library identifies genes up-regulated during PHOT1-mediated early step of de-etiolation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC genomics*. 2016. Vol. 17. P. 291.
44. Hoson T. Plant Growth and Morphogenesis under Different Gravity Conditions: Relevance to Plant Life in Space. *Life : Open Access Journal*. 2014. Vol. 4, N 2. P. 205–216.
45. Huan L., Tanaka M. Effects of Red and Blue Light-Emitting Diodes on Callus Induction, Callus Proliferation, and Protocorm-Like Body Formation from Callus in *Cymbidium* Orchid. *Environment Control in Biology*. 2004. Vol. 42. P. 57–64.
46. J. C. Sager, J. L. Edwards, W. H. Klein. Light Energy Utilization Efficiency for Photosynthesis. *Transactions of the ASAE*. 1982. Vol. 25, N 6. P. 1737–1746.

47. Jafri L., Saleem S., Kondrytuk T. P., Haq I., et al. *Hedera nepalensis* K. Koch: A Novel Source of Natural Cancer Chemopreventive and Anticancerous Compounds. *Phytotherapy Research*. 2016. Vol. 30, N 3. P. 447–453.
48. Jeong B. R., Sivanesan I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. *Scientia Horticulturae*. 2018. Vol. 236. P. 222–228.
49. Jia X., Wang L., Zhao H., Zhang Y., et al. The origin and evolution of salicylic acid signaling and biosynthesis in plants. *Molecular Plant*. 2023. Vol. 16, N 1. P. 245–259.
50. Jung J.-H., Seo P. J., Oh E., Kim J. Temperature perception by plants. *Trends in Plant Science*. 2023. Vol. 28, N 8. P. 924–940.
51. Kapoor S., Raghuvanshi R., Bhardwaj P., Sood H., et al. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 2018. Vol. 183. P. 258–265.
52. Kazan K., Manners J. M. The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, N 12. P. 4087–4100.
53. Keller M. M., Jaillais Y., Pedmale U. V., Moreno J. E., et al. Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades. *The Plant Journal*. 2011. Vol. 67, N 2. P. 195–207.
54. Khan M. A., Abbasi B. H., Ahmed N., Ali H. Effects of light regimes on *in vitro* seed germination and silymarin content in *Silybum marianum*. *Industrial Crops and Products*. 2013. Vol. 46. P. 105–110.
55. Kong S.-G., Okajima K. Diverse photoreceptors and light responses in plants. *Journal of Plant Research*. 2016. Vol. 129, N 2. P. 111–114.
56. Krahmer J., Ganpudi A., Abbas A., Romanowski A., et al. Phytochrome, Carbon Sensing, Metabolism, and Plant Growth Plasticity. *Plant Physiology*. 2018. Vol. 176, N 2. P. 1039–1048.

57. Lau O. S., Deng X. W. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science*. 2012. Vol. 17, N 10. P. 584–593.
58. Leivar P., Monte E. PIFs: systems integrators in plant development. *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26, N 1. P. 56–78.
59. Li F.-W., Mathews S. Evolutionary aspects of plant photoreceptors. *Journal of Plant Research*. 2016. Vol. 129, N 2. P. 115–122.
60. Li H., Tang C., Xu Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 2013. Vol. 150. P. 117–124.
61. Liscum E., Askinosie S. K., Leuchtman D. L., Morrow J., et al. Phototropism: Growing towards an Understanding of Plant Movement. *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26, N 1. P. 38–55.
62. Liu W., Jenkins G. I. Recent advances in UV-B signalling: interaction of proteins with the UVR8 photoreceptor. *Journal of Experimental Botany*. 2024. P. erae132.
63. Long Y., Yang Y., Pan G., Shen Y. New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 926752.
64. Lopez L., Fasano C., Perrella G., Facella P. Cryptochromes and the Circadian Clock: The Story of a Very Complex Relationship in a Spinning World. *Genes*. 2021. Vol. 12, N 5. P. 672.
65. López-Cruz R., Sandoval-Contreras T., Iñiguez-Moreno M. Plant Pigments: Classification, Extraction, and Challenge of Their Application in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*. 2023. Vol. 16, N 12. P. 2725–2741.
66. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.
67. Luan V., Huy N., Nam N., Huong T., et al. Ex vitro and in vitro Paphiopedilum delenatii Guillaumin stem elongation under light-emitting diodes

and shoot regeneration via stem node culture. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015. Vol. 37.

68. Ludwig W., Hayes S., Trenner J., Delker C., et al. On the evolution of plant thermomorphogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 2021. Vol. 72, N 21. P. 7345–7358.

69. Ma L., Li J., Qu L., Hager J., et al. Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *The Plant Cell*. 2001. Vol. 13, N 12. P. 2589–2607.

70. Machín A., Cotto M., Ducongé J., Márquez F. Artificial Photosynthesis: Current Advancements and Future Prospects. *Biomimetics*. 2023. Vol. 8, N 3. P. 298.

71. Manivannan A., Soundararajan P., Halimah N., Ko C. H., et al. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2015. Vol. 56, N 1. P. 105–113.

72. Manivannan A., Soundararajan P., Park Y. G., Wei H., et al. Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2017. Vol. 58, N 1. P. 12–20.

73. Marconi M., Wabnik K. Shaping the Organ: A Biologist Guide to Quantitative Models of Plant Morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12. P. 746183.

74. Mcdonald C. E., Chen L. L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. *Analytical Biochemistry*. 1965. Vol. 10. P. 175–177.

75. Morschett H., Loomba V., Huber G., Wiechert W., et al. Laboratory-scale photobiotechnology—current trends and future perspectives. *FEMS Microbiology Letters*. 2018. Vol. 365, N 1. P. fnx238.

76. Mukherjee A., Gaurav A. K., Singh S., Yadav S., et al. The bioactive potential of phytohormones: A review. *Biotechnology Reports*. 2022. Vol. 35. P. e00748.
77. Mundkinajeddu D., Sawant L. P., Koshy R., Akunuri P., et al. Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Estimation of Flavonoid Glycosides in *Withania somnifera* Aerial Parts. *International Scholarly Research Notices*. 2014. Vol. 2014. P. e351547.
78. Muñoz P., Munné-Bosch S. Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. *Plant Physiology*. 2018. Vol. 176, N 2. P. 1004–1014.
79. Mural R. J. Fundamentals of Light-Regulated Gene Expression in Plants. *Plant Genetic Engineering*. 1991. P. 191–211.
80. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, N 3. P. 473–497.
81. Najmi A., Javed S. A., Al Bratty M., Alhazmi H. A. Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. *Molecules*. 2022. Vol. 27, N 2. P. 349.
82. Nayyar H., Gupta D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*. 2006. Vol. 58, N 1. P. 106–113.
83. Nhut D. T., Huy N. P., Tai N. T., Nam N. B., et al. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*. 2015. Vol. 29, N 2. P. 299–308.
84. Nhut D. T., Khai H. D., Hung N. V., Vinh N. Q., et al. Effect of explant age on phytochemicals and morphogenesis in begonia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2023. Vol. 155, N 1. P. 267–282.

85. Ochoa-Fernandez R., Abel N. B., Wieland F.-G., Schlegel J., et al. Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light. *Nature Methods*. 2020. Vol. 17, N 7. P. 717–725.
86. Ouyang J., Wang X., Zhao B., Wang Y. Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. *Plant Science*. 2003. Vol. 165, N 3. P. 657–661.
87. Paik I., Huq E. Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2019. Vol. 92. P. 114–121.
88. Paradiso R., Proietti S. Light-Quality Manipulation to Control Plant Growth and Photomorphogenesis in Greenhouse Horticulture: The State of the Art and the Opportunities of Modern LED Systems. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2022. Vol. 41, N 2. P. 742–780.
89. Petrić M., Subotic A., Trifunović-Momčilov M., Jevremovic S. Morphogenesis in vitro of *Fritillaria* spp. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2012. Vol. 6. P. 78–89.
90. Phillips G. C., Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2019. Vol. 55, N 3. P. 242–257.
91. Sadowska-Bartosz I., Bartosz G. Biological Properties and Applications of Betalains. *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 9. P. 2520.
92. Saldarriaga J. F., Cruz Y., López J. E. Preliminary study of the production of metabolites from in vitro cultures of *C. ensiformis*. *BMC Biotechnology*. 2020. Vol. 20, N 1. P. 49.
93. Shen J.-R., Nakajima Y., Akita F., Suga M. Structure, Electron Transfer Chain of Photosystem II and the Mechanism of Water Splitting. *Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion*. 2021. P. 3–38.
94. Shevela D., Björn L., Govindjee G. Photosynthesis: Solar Energy for Life. *Singapore*. 2019. P. 204.

95. Siemens C. W. On the Influence of Electric Light upon Vegetation, and on Certain Physical Principles Involved. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1879. Vol. 30. P. 210–219.
96. Stirbet A., Lazár D., Guo Y., Govindjee G. Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany*. 2020. Vol. 126, N 4. P. 511–537.
97. Sussex I. M. The Scientific Roots of Modern Plant Biotechnology. *The Plant Cell*. 2008. Vol. 20, N 5. P. 1189–1198.
98. Tahakik R. Practical manual- plant tissue culture. *Molecular Biology*. 2023 P. 1-41.
99. Tariq U., Ali M., Abbasi B. H. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Photochemistry and Photobiology*. 2014. Vol. 130. P. 264–271.
100. Vasil I. K. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*. 2008. Vol. 27, N 9. P. 1423–1440.
101. Victório C., Kuster R. M., Lage C. Detection of flavonoids in *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. leaves using high-performance liquid chromatography. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2008. Vol. 11. P. 147–153.
102. Wheeler R. M. A Historical Background of Plant Lighting: An Introduction to the Workshop. *HortScience*. 2008. Vol. 43, N 7. P. 1942–1943.
103. Xu L., Huang H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*. 2014. Vol. 108. P. 1–33.
104. Xu Y., Yang M., Cheng F., Liu S., et al. Effects of LED photoperiods and light qualities on in vitro growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. *BMC plant biology*. 2020. Vol. 20, N 1. P. 269.
105. Yang S.-J., Arsenault E. A., Orcutt K., Iwai M., et al. From antenna to reaction center: Pathways of ultrafast energy and charge transfer in photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022. Vol. 119, N 42. P. e2208033119.

106. Yousaf A., Kayvanfar V., Mazzoni A., Elomri A. Artificial intelligence-based decision support systems in smart agriculture: Bibliometric analysis for operational insights and future directions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2023. Vol. 6. P. 1-18.
107. Yu Y., Qin W., Li Y., Zhang C., et al. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant Growth Regulation*. 2019. Vol. 87, N 2. P. 187–199.
108. Zaidi S. S.-A., Mahas A., Vanderschuren H., Mahfouz M. M. Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. *Genome Biology*. 2020. Vol. 21, N 1. P. 289.
109. Zhu D., Humphreys C. J. Solid-State Lighting Based on Light Emitting Diode Technology. *Optics in Our Time*. 2016. P. 87–118.
110. Zoltowski B. D., Imaizumi T. Structure and Function of the ZTL/FKF1/LKP2 Group Proteins in Arabidopsis. *The Enzymes*. 2014. Vol. 35. P. 213–239.