

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

BAROTŅU SASTĀVA UN AUGŠANAS TEMPERATŪRU
VARIĀCIJU IETEKME UZ KRŪMMELLEŅU *VACCINIUM*
CORYMBOSUM KALLUSU EKSTRAKTU ANTIOKSIDATĪVO
UN ANTIMIKROBIĀLO AKTIVITĀTI

Maģistra darbs

Autors: Dora Livkiša

Stud. apl. Nr. dl16041

Darba vadītājs: Dr. biol., Asoc.prof. Nils Rostoks

Konsultants: Mag.biol., Lekt. Anna Ramata-Stunda

Rīga 2021

KOPSAVILKUMS

Šajā darbā pārbaudītas un salīdzinātas antioksidatīvās un antimikrobiālās aktivitātes krūmmelleņu *Vaccinium corymbosum* (šķirnes “Duke” un “Bluecrop”) ekstraktiem, kas iegūti no kallusu kultūrām, kas audzētas uz piecām līdzīgām barotnēm un trīs dažādos temperatūru režīmos. Ekstraktiem noteiktas antioksidatīvās īpašības, kopējo fenolu un flavonoīdu saturs, organisko un fenolskābju koncentrācija, kā arī antimikrobiālā aktivitāte pret *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* un *Cutibacterium acnes*. Domājot par potenciālo pielietojumu, atsevišķiem ekstraktiem veikts arī citotoksicitātes tests.

Testu rezultāti parādīja, ka kallusu bioloģisko aktivitāti un ķīmisko saturu ietekmē gan barotne, gan audzēšanas temperatūras režīmi, kā arī auga šķirne. Atsevišķu kallusu ekstrakti uzrādīja lapu ekstraktiem tuvas antioksidatīvās īpašības un kopējo fenolu vērtības, kas bija ievērojami augstākas par ogu ekstraktiem. Pārbaudītajās koncentrācijās antimikrobiālu aktivitāti pret baktēriju kultūrām uzrādīja tikai daļa ekstraktu. Aktivitāti pret *E.coli* uzrādīja lielāks skaits ekstraktu nekā pret *S.aureus*. Viszemākā efektivitāte tika uzrādīta pret *C.acnes* baktērijām.

Iegūtie rezultāti norādīja uz krūmmellenes *V.corymbosum* kallusu kultūru piemērotību paaugstinātai sekundāro metabolītu ražošanai laboratorijas apstākļos. Augstā ekstraktu bioloģiskā aktivitāte norādīja uz to potenciālo izmantošanu pārtikas rūpniecībā, farmācijā un citās jomās.

Atslēgvārdi: krūmmellenes, kallusu kultūras, antioksidatīvā aktivitāte, antimikrobiālā aktivitāte

SUMMARY

This study assays and compares antioxidative and antimicrobial activities of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* (cultivars “Duke” and “Bluecrop”) extracts made from callus cultures grown on five similar media in three different temperature settings. Extracts were tested for their antioxidative activity, total phenolic and flavonoid content, organic and phenolic acid content and antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* cultures. In regard to potential practical application some of the extracts were tested for cytotoxicity.

The results show that the biological activity and chemical composition of calli are affected by both media and growth temperature, as well as the cultivar itself. Several calli extracts showed antioxidative activity and total phenolics content close to those of leaf extracts, higher than those for berries. At the assayed concentrations only some of the extracts showed antimicrobial activity. More extracts showed some activity against *E.coli* compared to *S.aureus*. The lowest activity was seen against *P.acnes*.

The results point to suitability of high-bush blueberry *V.corymbosum* callus cultures for enhanced secondary metabolite production in laboratory settings. The high biological activity of the extracts indicates to their potential use in food industry, pharmacology and other fields.

Keywords: highbush blueberry, callus culture, antioxidative activity, antimicrobial activity

SATURS

KOPSAVILKUMS	2
SUMMARY	3
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	6
1.1. Oksidatīvais stress un antioksidatīvā aizsardzība	6
1.1.1. Augu izcelsmes antioksidanti	7
1.2. Antibiotiskā rezistence un augu izcelsmes antimikrobiālie savienojumi	11
1.3. Krūmmellenes vispārīgs raksturojums.	12
1.4. Augu <i>in vitro</i> kultūras	14
1.4.1. Sekundāro metabolītu ražošana audu kultūrās	16
2. METODES.....	18
2.1. Izmantotās iekārtas	18
2.2. Krūmmellenes <i>Vaccinium corymbosum</i> kallusu kultūru kultivēšana	19
2.3. Biomasas pieaugums	20
2.4. Ekstraktu iegūšana, to sausnes noteikšana.....	20
2.5. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana	21
2.6. Flavonoīdu daudzuma noteikšana.....	21
2.7. DPPH radikāļa neitralizēšanas spēja	21
2.8. Organisko un fenolskābju satura noteikšana ekstraktos	22
2.9. Antimikrobiālā aktivitāte	23
2.10. Citotoksicitātes tests	24
2.11. Iegūto datu apstrāde un analīze.....	25
3. REZULTĀTI.....	26
3.1. Krūmmelleņu kallusu kultūras un to biomasu pieaugums	26
3.2. Kopējo fenolu un kopējo flavonoīdu saturs	29
3.3. Kallusu ekstraktu antioksidatīvā spēja.....	31
3.4. Organisko un fenolskābju koncentrācijas ekstraktos.....	33
3.5. Antimikrobiālā aktivitāte	37
3.6. Ekstraktu citotoksicitāte	39
4. DISKUSIJA	42
4.1. Krūmmelleņu kallusu morfoloģijas un biomasas pieauguma atkarība no barotnes un vides temperatūras.	42
4.2. Antioksidatīvās aktivitātes atkarība no sekundāro metabolītu daudzuma.	44
4.3. Organisko skābju profili.	47
4.4. Krūmmelleņu ekstraktu ietekme uz <i>E.coli</i> un <i>S.aureus</i> baktēriju kultūrām.	49
4.5. Krūmmellenes ekstraktu citotoksiskā aktivitāte zīdītāju šūnās.	50
4.6. Iespējamie virzieni turpmākam darbam.....	51
5. SECINĀJUMI.....	52
6. PATEICĪBAS	53
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	54
PIELIKUMI	61

IEVADS

Pieaugot kāda produkta pieprasījumam, liekas loģiski, ka no ražotāju puses jābūt atbildei ar pieaugošu piedāvājumu – ne tikai kvantitātes, bet arī kvalitātes un daudzveidības ziņā. Mūsdienās, kad cilvēki īpaši pievērš uzmanību klimata pārmaiņām un sāk aktīvāk piekopt videi draudzīgu, bezatkritumu dzīvesveidu, zinātnieku un inženieru uzdevums ir sabiedrībai piedāvāt inovatīvus un ilglaicīgus ‘zaļos’ risinājumus un produktus. Biotehnoloģija ir viena no nozarēm, kas var palīdzēt šo problēmu risināšanā. Ar dažādu bioloģijas metožu starpniecību ir iespējams palielināt kultūru ražīgumu samazinot nepieciešamo resursu daudzumu, paātrināt dažādu pārtikas rūpniecībā, farmakoloģijā un citās tautsaimniecības nozarēs nozīmīgu savienojumu ieguvei un veikt to sākotnējo drošības un ietekmes pārbaudi lieki neizmantojot dzīvās radības.

Šajā darbā tika veikta nesenu popularitāti guvušas un tautsaimniecībā jau nozīmīgas ogulāju kultūras - augstās krūmmellenes *Vaccinium corymbosum* – divu izplatītu šķirņu (“*Bluecrop*” un “*Duke*”) biotehnoloģiski veidotu kallusu fizikālo parametru, bioķīmiskā sastāva un dažādu apstākļu ietekmes uz to izpēte, lai noskaidrotu optimālākos apstākļus maksimālai bioloģiski aktīvu vielu ieguvei. Tā kā krūmmellenes sabiedrībā un tautas medicīnā zināmas to antioksidantu dēļ, tad šis darbs koncentrēts uz kallusus konstatējamiem fenolu savienojumiem, galvenajām organiskajām skābēm un to bioloģisko aktivitāti, lai identificētu potenciālo praktisko pielietojumu un formu.

Darba mērķis: Paaugstināt krūmmelleņu *V.corymbosum* kallusu ekstraktu antioksidatīvo un antimikrobiālo aktivitāti, pielāgojot kallusu kultūru barotnes sastāvu un augšanas temperatūru režīmu.

Darba uzdevumi:

1. Nomērīt un salīdzināt biomasas pieaugumu krūmmelleņu kallusu kultūrām uz piecām līdzīgām barotnēm trīs dažādos temperatūru režīmos;
2. Izvērtēt antioksidatīvo aktivitāti iegūtajos ekstraktos pēc kopējo fenolu, kopējo flavonoīdu un DPPH radikāļa neutralizēšanas testiem un organisko skābju satura;
3. Izvērtēt ekstraktu antimikrobiālo aktivitāti pret *Escherichia coli* (Gram (-)), *Staphylococcus aureus* (Gram (+)) un *Cutibacterium acnes* (Gram (+)) baktērijām, nosakot minimālās inhibitorās un minimālās baktericīdās koncentrācijas;
4. Pēc iepriekšējo testu rezultātu izvērtēšanas atlasīt 4 kallusu ekstraktus, kam noteikt ietekmi uz 3T3 šūnu kultūras dzīvotspēju (citotoksiskā ietekme uz peļu fibroblastiem).

1. LITERATŪRAS APSKATS

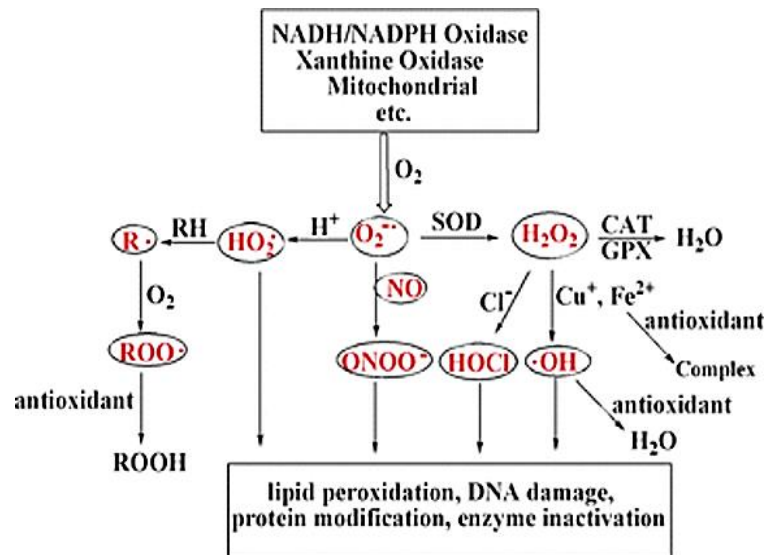
1.1. Oksidatīvais stress un antioksidatīvā aizsardzība

Oksidatīvais stress ir brīvo radikāļu un antioksidantu disbalanss, kas guvis pētnieku uzmanību kā nozīmīgs faktors dažādu slimību etioloģijā (Aziz, Diab & Mohammed, 2019).

Brīvie radikāļi ir atomi un molekulas ar nesapārotu vienu vai vairākiem elektroniem. Tos iedala reaktīvās skābekļa (*Reactive Oxygen Species*, ROS), slāpekļa (RNS) un sēra (RSS) formās. Tie var veidoties endogēni organisma metabolisma laikā, vai tikt uzņemti no vides. Normālos apstākļos organismā tie pilda signālmolekulu lomu, un šūnas spēj tos neitralizēt, tā kontrolējot to daudzumu. Ja brīvo radikāļu daudzums pārsniedz esošo antioksidantu neitralizēšanas kapacitāti, tie bojā šūnu makromolekulas – lipīdus, ogļhidrātus, proteīnus, nukleīnskābes -, tā izraisot sistēmisku novecošanos un dažādas slimības (Gedik et al, 2002; Lu et al, 2010; Marrocco, Altieri & Peluso, 2017; Aziz, Diab & Mohammed, 2019). Ar oksidatīvo stresu tiek saistītas tādas slimības kā vēzis, diabēts, Alzheimerera slimība un citas (Aziz, Diab & Mohammed, 2019).

Antioksidanti ir savienojumi, kas neitralizē brīvos radikāļus, tiem atņemot vai atdodot elektronus, inhibē radikāļus-veidojošos enzīmus vai stimulē radikāļus-neitralizējošos enzīmus. Organismā tie arī inhibē oksidēšanās reakcijas. Tie, tāpat kā brīvie radikāļi, var būt endogēnas un eksogēnas izcelsmes, un var būt gan enzīmi (superoksīdu dismutāze, katalāze), gan neenzimātiskas molekulas (vitamīni A, C, E, dažādas pārtikā esošās molekulas) (Marrocco, Altieri & Peluso, 2017 ;Aziz, Diab & Mohammed, 2019). 1.attēlā apkopota ROS veidu un avotu un antioksidantu iedarbības vietu shēma. Papildus radikāļu neitralizēšanai, antioksidatīvā aizsardzība ietver arī bojāto molekulu likvidēšanu vai labošanu, novēršot to uzkrāšanos šūnā un nelabvēlīgas izmaiņas metabolismā. Organismā šīs funkcijas veic proteolītiskās sistēmas un specifiski enzīmi (Poljsak, Šupt & Milisav, 2013).

Lai arī organismam normālai darbībai ir nepieciešami dažādi mikroelementi, daļa no tiem (Cu^+ , Fe^{2+}) var pastiprināt oksidatīvo stresu, reakcijās ar H_2O_2 veidojot brīvos radikāļus (2.attēls) (Aziz, Diab & Mohammed, 2019). Pētījumi parāda, ka šo jonu uzkrāšanās ir svarīgs faktors vairāku slimību (Vilsona, Alzheimerera, Parkinsona slimības) patoģenēzē. Metālus helatējoši savienojumi spēj šos jonus saistīt un veido kompleksus, kas pēc tam tiek izvadīti no organisma. Šis princips tiek izmantots arī helatēšanas terapijā metālu saindēšanās gadījumos, turklāt, kombinējot helatējošos aģentus ar antioksidantiem, rezultāti uzlabojas (Kim, Kim & Kumar, 2019).



1. attēls. ROS veidi (ar sarkanu), to avoti un antioksidantu iedarbības vietas. $O_2^{\bullet -}$ - superoksīda anjons; HO_2^{\bullet} - perhidroksil-radikālis; $\bullet OH$ - hidroksil-radikālis; H_2O_2 - ūdeņraža peroksīds; $HOCl$ - hipohlorskābe; $ONOO^-$ - peroksinitrīts; R^{\bullet} - lipīdu alkil-radikālis; RH - lipīds; ROO^{\bullet} - lipīdu peroksil-radikālis; $ROOH$ - lipīdu hidroperoksīds; SOD - superoksīdu dismutāze; CAT - katalāze; GPX - glutationa peroksidāze (no Lu et al, 2010).

Figure 1. ROS types (in red) and sources, and action point of antioxidants. $O_2^{\bullet -}$ - superoxide anion; HO_2^{\bullet} - perhydroxyl radical; $\bullet OH$ - hydroxyl radical; H_2O_2 - hydrogen peroxide; $HOCl$ - hypochlorous acid; $ONOO^-$ - peroxyntirite; R^{\bullet} - lipid alkyl radical; RH - lipid; ROO^{\bullet} - lipid peroxy radical; $ROOH$ - lipid hydroperoxide; SOD - superoxide dismutase; CAT - catalase and GPX - glutathione peroxidase (from Lu et al, 2010).

1.1.1. Augu izcelsmes antioksidanti

Nepiemēroti ārējie vides apstākļi un dažādi patogēni augiem rada apdraudējumu, tādēļ augi sintezē sekundāros metabolītus ar dažādām funkcijām, kas palīdz tiem izdzīvot – dažādus pigmentus un gaistošas vielas, lai pievilinātu apputeksnētājus vai atbaidītu uzbrucējus; signālmolekulas komunikācijai ar citiem apkārt esošajiem augiem (Bottger et al, 2018); fotoprotektīvus savienojumus, lai izvairītos no UV negatīvās ietekmes; struktūras stabilizējošus savienojumus un citus (Edreva et al, 2008) (3.att). Šo savienojumu sintēze prasa daudz resursu, bet, ja nepieciešamība ir ilgstoša vai sintēze ir laikietilpīga, tad augi uztur šo savienojumu sintēzi nepārtraukti (Bottger et al, 2018). Daudzi no šiem savienojumiem līdzās šūnās esošajiem enzimatiskajiem antioksidantiem piedalās antioksidatīvās aizsardzības uzturēšanā (Kasote et al, 2015).

Cilvēki un dzīvnieki izmanto šos augu sekundāros metabolītus savā labā gan rūpniecībā, gan farmācijā, gan uzturā. Augļu un dārzeņu lietošana uzturā tiek saistīta ar samazinātu kardiovaskulāro slimību, vēža, diabēta un citu hronisku slimību risku un uzlabotām

kognitīvajām spējām (Aune, 2019; Galli et al, 2006; Stanner et al, 2004), kam pamatā ir oksidatīvā stresa izraisītas izmaiņas organisma homeostāzē. Augos atrodamie ne-enzimātiskie antioksidanti ietver gan primāros metabolītus - vitamīnus (A, C, E), liponkskābi, organiskās skābes -, gan sekundāros - alkaloīdus, saponīnus, terpēnus, karotenoīdus un plašu spektru fenolu savienojumu (Kasote et al, 2015; Aziz, Diab & Mohammed, 2019).

Primārie metabolīti

Vitamīni A, C un E. Vitamīns A jeb retinols ir taukos šķīstošs savienojums. Lielākā daļa tiek uzņemta kā provitamīns A karotinoīdu formā no oranžiem un dzelteniem dārzeņiem un augļiem, zaļajiem lapu dārzeņiem – spinātiem, brokoļiem (Chabert et al, 2014). Vitamīns C jeb L-askorbīnskābe ir izplatītākais ūdenī šķīstošais savienojums, kas piedalās viena elektrona reakcijās. Kā koenzīms tas piedalās vēl daudzās citās homeostāzes reakcijās (Paciolla et al, 2019). Cilvēki to nespēj sintezēt, tāpēc labākais tā avots ir augu valsts produkti – citrusaugļi, paprika, ogas. Vitamīns E ir lipofilu savienojumu grupa - četri tokoferoli un četri tokotrienoli. Cilvēka organismā, galvenokārt, ir sastopami α un γ -tokoferoli, ko uzņem no augu eļļām un riekstiem (Chabert et al, 2014).

Liponskābe ir sēru saturošs kofaktors, kam ir liela nozīme enerģijas metabolismā. Tā saglabā spēcīgu antioksidatīvo aktivitāti gan reducētajā, gan oksidētajā formā un tai piemīt arī metālu helatējošas spējas. Reducētajā formā tai piemīt divējāda aktivitāte - tā spēj gan atjaunot citas antioksidantu molekulas, gan veidot sēru saturošus brīvos radikāļus (Navari-Izzo, Quartacci & Sgherri, 2002). Cilvēka organismā tā tiek sintezēta zemā līmenī, un ir grūti to uzņemt ar uzturu, jo gremošanas traktā tā ir nestabila, un, nonākot asinīs, tai ir īss pussabrukšanas laiks. Augu valstī tā ir vairākos dārzeņos – spinātos, brokoļos, tomātos u.c. (Salehi et al, 2019).

Organiskās skābes. Literatūrā atrodams diezgan maz informācijas par organisko skābju dalību antioksidatīvās aizsardzības jomā. Vairākām skābēm ir novērota antioksidatīva un metālu jonus helatējoša aktivitāte, bet tās nav tik izteiktas, salīdzinot ar citiem jau pieminētajiem savienojumiem. Šeit var pieminēt citronskābi un ābolskābi, kas ir iesaistītas Krebsa ciklā, līdz ar to atrodas visā ķermenī. Tās lielos daudzumos ir augļos un ogās (Marques et al, 2020; Abdel-Salam et al, 2018). Skābeņskābe ir vienkāršākā dikarboksilskābe un sastopama lielā daļā augu, kur tā darbojas kā pH un osmoregulators, Lielākās koncentrācijās tā ir spinātos, rabarberos un biešu saknēs (Kayashima & Katayama, 2002). Fitīnskābe arī sen zināma kā metālus helatējošs savienojums. Tā, galvenokārt, atrodama sēklās, klijās, kukurūzā, pupiņās (Graf, 1990).

Sekundārie metabolīti

Alkaloīdi ir augu sekundāro metabolītu grupa, kas satur vismaz vienu N atomu, nav aminoskābes, un kam piemīt bioloģiska aktivitāte cilvēkos. Šie savienojumi struktūru ziņā ir ļoti dažādi (Pelletier, 1983). Vairākos pētījumos dažādu augu alkaloīdiem ir novērota antioksidatīva un jonus helatējoša aktivitāte (Gulcin et al, 2009; Kolak et al, 2006; Malczewska-Jaskola, Jasiewicz & Mrowczynska, 2016; Rehman & Khan, 2017).

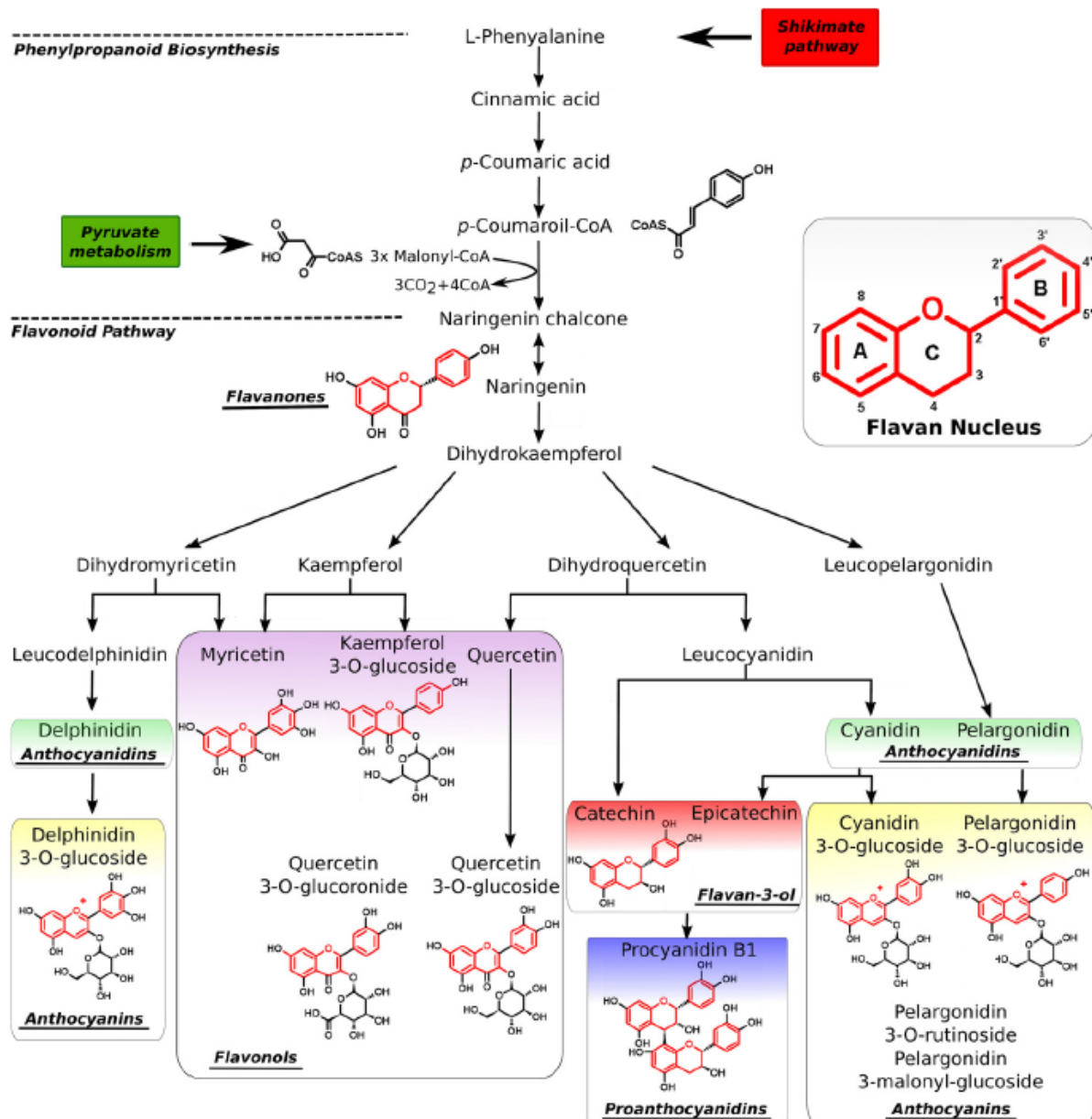
Saponīni ir augu izcelsmes augstas molekulas glikozīdi, kas sastāv no triterpēna vai steroīda aglikona ar piesaistītu cukura atlikumu. Augos tie tiek sintezēti dažādās augu daļās (Hosttetmann & Marston, 2005). Trūkst vispārīgas informācijas par to antioksidatīvo aktivitāti, bet atsevišķās augu sugās tie ir konstatēti (Ashraf et al, 2013).

Terpēni ir dabiski acikliski līdz penta-cikliski vairāku izoprēnu vienību savienojumi. Plašākā nozīmē šeit pieskaita arī degradācijas produktus un sintētiskos atvasinājumus. Dažas to struktūru daļas var būt raksturīgas kādam noteiktam augu tipam. (Eggersdorfer, 2000). Karotenoīdi ir plaši sastopami dzelteni-sarkani lipofili pigmenti, kas pieder tetraterpenoīdu grupai. Lielākā daļa karotenoīdu cilvēku organismā ir karotīni (α un β -karotīni, likopēns – arī provitamīna A avoti) un ksantofili (luteīns, zeaksantīns un β -kriptoksantīns). Labākie to avoti ir oranžie dārzeņi – burkāni, ķirbji (Chabert et al, 2014).

Fenolu savienojumi ir organiskie savienojumi, kas sastāv no vismaz viena benzola gredzena ar vismaz vienu tieši piesaistītu hidroksilgrupu. Pēc struktūras izdala vairākas grupas: fenolskābes, kumarīni, flavonoīdi, tannīni, stilbēni, lignāni. Tie ir populārākie un visvairāk pētītie augu izcelsmes antioksidanti (Albuquerque et al, 2021), īpašu uzsvāru liekot uz flavonoīdiem, kuru biosintēzes ceļš redzams 2. attēlā.

Flavonoīdi antocianīni ir ūdenī šķīstoši pigmenti, kas upenēm, mellenēm, citiem augļiem un ziediem dod sarkano, violeto un zilo krāsu. Visizplatītākais ir cianidīn-3-glikozīds. Antocianīni ir spēcīgi antioksidanti un cilvēku organismā piedalās brīvo radikāļu neitralizēšanā, iekaisuma citokīnu signalizēšanas ceļā un citos procesos (Khoo et al, 2017).

Flavan-3-oliem ir lielākā loma fenolu savienojumu uzņemšanā. Tie var būt gan monomēru – katehīna un epikatehīna – veidā, gan arī veidot polimērus. Lielās koncentrācijās tie ir zaļajā tējā, sarkanvīnā un šokolādē. Pēc to metabolisma zarnu traktā, gala produkti lielākā koncentrācijā nonāk organismā, kur tiem tiek piedēvētas iekaisumu inhibējoša aktivitāte, pretvēža, antioksidatīva un vēl citas veselībai labvēlīgas ietekmes (Campos, Stehle & Simon, 2019).



2. attēls. Flavonoīdu savienojumu biosintēzes ceļš augos (ar izmaiņām no Casanal et al, 2013).

Figure 2. Biosynthesis pathway of flavonoids in plants (with changes from Casanal et al, 2013).

Tannīni ir salīdzinoši lielmolekulāri savienojumi, ko iedala hidrolizējamos un kondensētajos tanīnos, no kuriem visvairāk pētītie ir epikatehīna un katehīna veidoti polimēri. Tannīni ir īpaši ar to, ka spēj saistīties ar metālu joniem un proteīniem tos precipitējot, tāpēc tiem tiek piedēvēta divējāda iedarbība organismā (Aziz, Diab & Mohammed, 2018).

Ievērojamākais no stilbēnu grupas antioksidantiem ir resveratrols. Tas ir konstatēts 70 augos, visvairāk vīnogu mizās un sēklās. Tam piemīt arī antibakteriāla, antifungāla aktivitāte, pretvēža, pretiekaisuma un citi efekti. Kā antioksidants tas piedalās vazodilatācijas regulācijā, līdz ar to kardiovaskulārās sistēmas veselībā (Salehi et al, 2018).

1.2. Antibiotiskā rezistence un augu izcelsmes antimikrobiālie savienojumi

Mikroorganismu izraisītas infekciju slimības vēsturiski ir bijis izplatīts nāves cēlonis visā pasaulē. Līdz ar medicīnas un tehnoloģiju attīstību 20.gs., pateicoties antibiotiku atklāšanai un ražošanai, šo slimību radītie draudi ievērojami samazinājās. Diemžēl, nevajadzīga un apzināta antibiotiku lietošana veicināja mikroorganismu adaptāciju. Tie spēja ātri nodot šos rezistences faktorus cits citam, bet zinātnieki nespēja pietiekami ātri atrast jaunus savienojumus, lai ar tiem cīnītos. Tā rezultātā ir izveidojušies multirezistenti mikroorganismi, un infekciju slimības ir kļuvušas izplatītākas (Chokshi et al, 2019; Aslam et al, 2018; Upadhyay et al, 2014; Srivastava et al, 2014). 2017.gadā Pasaules Veselības organizācija publicēja pirmo antibiotiku-rezistentu prioritāro patogēnu sarakstu, kas ietvēra 12 veselību apdraudošākās baktēriju dzimtas. Tajā iekļautas tādas sugas kā *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* un citas (WHO, 2017).

Kā alternatīva mikroorganismu apkarošanai izmantojami augu izcelsmes savienojumi, kas neizraisa rezistences veidošanos. Augu metabolīti tiek klasificēti kā antimikrobiāli, ja to minimālā inhibitorā koncentrācija ir 100-1000 µg/ml (Srivastava et al, 2014). Augu izcelsmes savienojumi ar augstākajām antimikrobiālajām aktivitātātēm zināmi flavonoīdi, alkaloidi, terpēni, fenolu savienojumi un polifenoli un kumarīni (Savoia 2012).

Jau vēsturiski cilvēki izmanto dažādus augu valsts savienojumus kā ēdienu konservantus, uztura bagātinātājus un garšas pastiprinātājus (Upadhyay et al, 2014). Dabiskie sveķi, kas iegūti no augiem (īpaši priežu Pinaceae un ciprešu Cupressaceae dzimtas), vai to sekundārajiem metabolītiem ir uzrādījuši gan antibakteriālu gan antifungālu un antiprotozoju iedarbību (Savoia, 2012). Vairāku garšaugu ekstrakti un eļļas ir uzrādījuši labu efektivitāti pret pārtikas patogēniem un to veidoto bioplēvi (Upadhyay et al, 2013; Cui et al, 2018).

Svarīgs antimikrobiālās aktivitātes mehānismiem ir efluksa pumpja inhibēšana, pret ko Gram(+) baktērijas ir jutīgākas, bet kombinācijās ar citiem plaši izmantotiem efluksa pumpja inhibitoriem spēcīgu aktivitāti iespējams iegūt arī pret Gram(-) kultūrām. Šādas kombinācijas ir īpaši svarīgas flavonoīdiem, kas spējīgi veidot kompleksus ar proteīniem un baktēriju membrānām un tajās integrēties (Savoia, 2012).

Augu izcelsmes hinoniem un flavonoīdiem ir līdzīgs antimikrobiālās iedarbības mehānisms – piesaistīšanās adhesīniem, un enzīmu inaktivēšana. Polifenolu, tannīnu, terpēnu, alkaloidu un ēteriskajām eļļām iedarbības mehānismi vēl iekļauj substrāta ierobežošanu, membrānu bojāšanu, metālu jonu piesaisti un citus (Subramani, Narayanasamy & Feussner, 2017).

1.3. Krūmmellenes vispārīgs raksturojums.

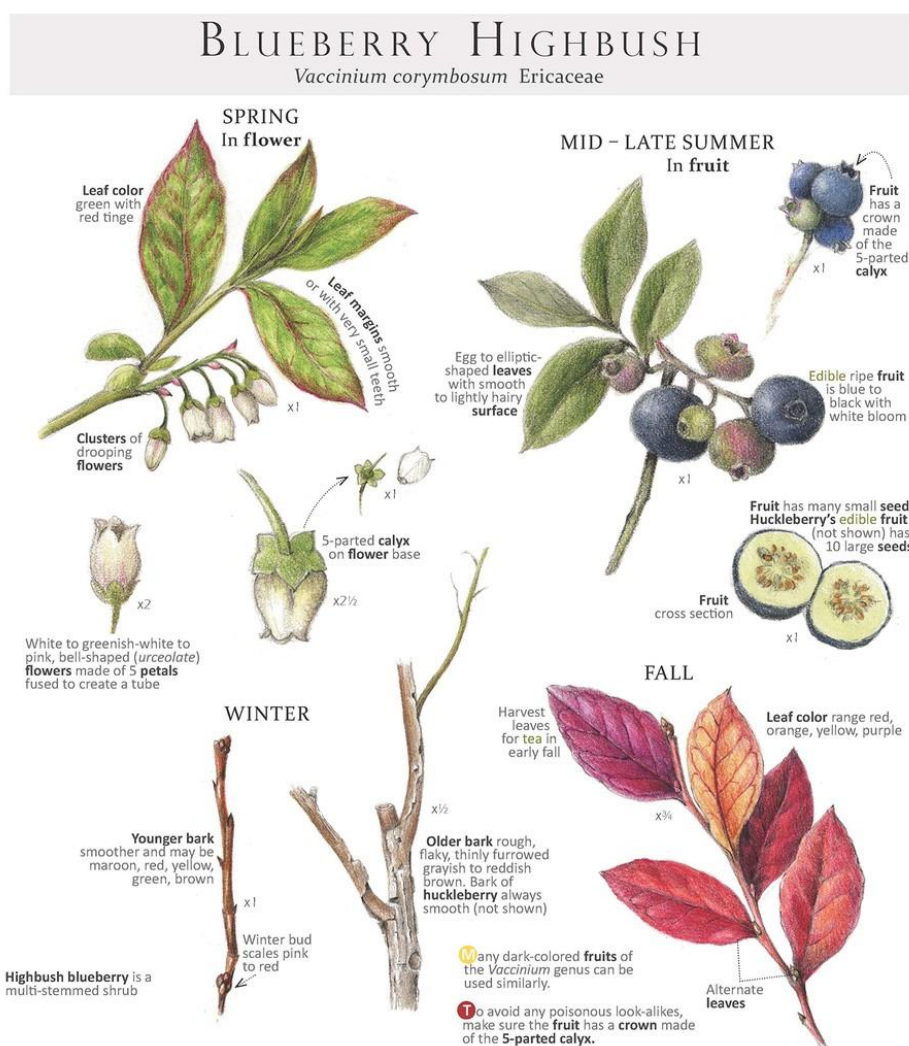
Pasaulē plašā sabiedrībā ar vārdiem “mellenes” un “krūmmellenes” (angļu valodā “blueberry”) ikdienā apzīmē vairākas *Vaccinium* ģints sugas, t.sk. hibrīdsugas. Tas var radīt pārpratumus un neskaidrības meklējot izzinošu informāciju par šiem augiem, īpaši, ja rakstu autori nenorāda precīzu sugas nosaukumu.

Krūmmellenes ir daudzgadīgi krūmu ogulāji, kas pieder pie viršu dzimtas (*Ericaceae*) melleņu ģints (*Vaccinium*) *Cyanococcus* sekcijā. Latvijā pazīstamākās un literatūrā visvairāk aprakstītās krūmmelleņu sugas ir augstās krūmmellenes *V.corymbosum*, zemās krūmmellenes *V.angustifolium* un Eša krūmmellenes *V.virgatum* (jeb *V.ashei*.). Krūmmelleņu dzimtene ir Ziemeļamerikas kontinenta austrumi, bet kā kultūraugi tās sāktas audzēt un selekcionēt 20.gs. sākumā Frederika Kovila vadībā. Eiropā šie kultūraugi ievesti 20.gs. 20-tajos gados Nīderlandē, vēlāk arī Vācijā un Lielbritānijā. Pirmie komerciālie stādījumi ierīkoti 70-tajos gados Polijā, Nīderlandē un Itālijā, vēlāk arī Dienvidrietumeiropas valstīs (Retamales and Hancock, 2018). Latvijā pirmie šo kultūru pētījumi sākti 70-tajos gados Salaspils Botāniskajā dārzā, bet īpašu popularitāti *V.corymbosum* guvusi 2000-šajos gados, kad ierīkoti pirmie lielu platību stādījumi ar komerciālu nolūku (Maltenieks, 2008).

V.corymbosum krūmi izaug 1 – 3 m augstumā, tiem ir līdz 7.5cm garas, gludas, ovālas lapas ar smailu galu, to virspuse ir tumšāk zaļa nekā apakšpuse, un rudenī tās krāsojas sarkanas (3.att). Melleņu ziedi ir sakārtoti ķekaros, baltā vai gaiši rozā krāsā un zied pavasarī. Vasarā nobriest augļi, kas ir apaļas vai saplacinātas formas ogas līdz 2.5cm diametrā, tumši zilā krāsā ar baltu apsarmi un daudz mazām sēkliņām (Kloet, 1980; Gough, 1994).

Krūmmellenes, līdzīgi kā citas viršu dzimtai piederīgas ģintis, vislabāk jūtas labi aerētā nabadzīgā skābā augsnē (Hancock & Hanson, 1986, Korcak, 2011), un tām nepieciešams miera periods, kas sagādā problēmas to audzēšanā lielās platībās un siltākos reģionos (Luby et al, 1991, Gough, 1994, Retamales and Hancock, 2018). Svarīgs faktors ir arī nokrišņu daudzums un gaisa temperatūras svārstības – salnas un karstuma viļņi - veģetācijas periodā, kas ietekmē augu ražību un ogu garšu (Luby et al, 1991; Yang, Bryla & Strik, 2019). Pertidis ar kolēģiem (2018) savā pētījumā Lielbritānijā noskaidroja, ka arī gaismas intensitātei un tās vienmērīgumam ir liela ietekme uz ražīgumu un tā stabilitāti vairāku sezonu periodā. Augstās krūmmellenes ogu nobriešanas laikā neveido ogūhidrātu rezerves lapās, tādēļ augļu attīstība ir atkarīga no fotosintēzes gaismas fāzes laikā saražotajiem un piegādātajiem cukuriem, kas, turklāt, līdzīgos apjomos tiek piegādāti arī citām auga daļām, radot konkurenci.

Neraugoties uz potenciālajām lielapjoma audzēšanas problēmām, ANO Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (FAOSTAT, FAO, 2021) dati liecina, ka krūmmelleņu audžu platības turpina pieaugt gan Latvijā, gan citur pasaulē, kas netieši norāda arī uz pieprasījuma pieaugumu. Augsto krūmmelleņu un to radniecīgo sugu ogas tiek patērētas uzturā gan svaigā veidā, gan arī dažādi sagatavotas – biezeņos, ievārījumos, sulās, saldētas, citu pārtikas produktu sastāvā un kā uztura bagātinātāji.



3. attēls. Augstās krūmmellenes *V.corymbosum* ilustrācija ar aprakstiem angļu valodā (Falkoni & Hollender, 2013).

Figure 3. Illustration of highbush blueberry *V.corymbosum* with descriptions in English (Falkoni & Hollender, 2013).

Krūmmellenes tiek uzskatītas par ļoti vērtīgām, galvenokārt, augstā antioksidantu satura dēļ, no kuriem lielākā daļa ir antocianīni un citi flavonoīdi, kā arī fenolskābes (Skrovankova et al, 2015; Rothwell et al, 2013). Tās ir arī labs makro- un mikroelementu un vitamīnu avots

(Karlsons et al, 2018; Starast et al, 2007). Šīm ogām ir pierādītas vairākas veselību uzlabojošas īpašības, piem., neuroprotektīva un kognitīvo funkciju uzlabojoša (Galli et al, 2006; Strathearn et al, 2014; Hong et al, 2017), pretiekaisuma (Driscoll et al, 2019; Lagha, Howell & Grenier, 2020), pretvēža (Bunea et al, 2013; Diaconeasa et al, 2015; Ribera-Fonseca et al, 2020), antimikrobiāla (Shen et al, 2014), antidiabētiska (Liu et al, 2019) aktivitāte.

Izsenis tautas medicīnā tiek lietoti arī *Vaccinium* ģints augu lapu uzlējumi pret gremošanas trakta problēmām, kā pretiekaisuma un antiseptisku līdzekli brūču dziedēšanā un asins cukura līmeņa regulācijai gan Ziemeļamerikā, gan Eiropā un Āzijā, kas norāda uz ģintij raksturīgu bioloģisko aktivitāti neatkarīgi no augšanas vietas. Arī zinātnieki, paralēli ogu pētījumiem, veic lapu, ziedu un citu auga daļu bioloģiskās aktivitātes izpēti, pierādot, ka vērtīgas ir arī citas auga daļas un pārstrādes atlikumi, kas bieži vien paliek neizmantoti (Khanal et al, 2009; Pervin, Hasnat & Lim, 2013; Wan et al., 2015; Stefanescu et al., 2020). Ehlenheldt & Prior (2001) pētījumā salīdzinot melleņu ogu un lapu kopējo fenolu daudzumu un antioksidatīvo aktivitāti, konstatēja lapu ievērojamu pārkumu abos rādītājos. Riihinen ar kolēģiem (2008) salīdzināja fenolo savienojumu profilus divās melleņu sugās vairākās augu daļās, abās sugās atrodot samērā lielā koncentrācijā ferulīnskābi, p-kumarīnskābi, apvienotos antocianīnus un kvercīfīnu, un parādīja koncentrāciju un profilu atšķirības starp augu daļām. Tika noskaidrots, ka meža mellenēs (*V.myrtillus*) to kopējais daudzums bija lielāks nekā krūmmellenēs. Jāpiebilst, ka arī vienas sugas vairāku šķirņu starpā bioloģiski aktīvo savienojumu koncentrācijas var pat vairākkārtīgi atšķirties (Kalt et al, 2001, Yousef et al, 2013).

Dembinska-Migas et al (1998) pēc veiksmīgas “Bluecrop” šķirnes kallusu kultūru izveidošanas uz dažādām barotnēm tajās konstatēja un salīdzināja kvercetinā-3-O-glikozīdu un -galaktozīdu, kā arī vairāku fenolskābju koncentrācijas, bet nekādas sakarības nekonstatēja. SVēlāk tam pašam autoru kolektīvam kallusu kultūrās izdevās sintezēt triterpēnu savienojumus, ko neatrada lapās (Migas, Cisowski & Dembinska-Migas, 2005), parādot, ka šīs kultūras ir izmantojamas biotehnoloģijā sekundāro metabolītu sintēzei.

1.4. Augu *in vitro* kultūras

In vitro augu audu kultūru tehnoloģija ir no mātes auga izolētu šūnu, audu un orgānu audzēšana kontrolētos apstākļos uz mākslīgi veidotām barotnēm (Hussain et al, 2012; George, Hall & De Klerk, 2008). Šī metode balstās uz šūnu totipotenci – spēju daloties ekspresēt visus genomā esošos gēnus-, un spēju pielāgot metabolismu un attīstību (Shahzad et al, 2017). Tās pirmsākumi meklējami jau 1902. gadā, kad vācu fiziologs Gotlībs Haberlandts veica pirmo

mēģinājumu kultivēt izolētu lapas parenhīmas slāni, un novēroja šūnu pieaugumu un cietes uzkrāšanos, bet ne šūnu dalīšanos (Hussain et al, 2012).

Mūsdienās augu mikropavairošana ir ļoti nozīmīga zinātnes disciplīna, kas piedāvā plašas iespējas dažāda mēroga vajadzībām. Augu audu kultūru pielietojumus var iedalīt pamatizpētes, vides problēmu risināšanas un komerciālu nolūku vadītos (Bhatia, 2015a). Augu audu kultūras tiek izmantotas augu klonālai pavairošanai, kas ir svarīgi retu un aizsargājamu sugu saglabāšanai, selekcijā un hibridizācijā jaunu izturīgāku un ražīgāku šķirņu veidošanai, ģenētiskajā modificēšanā vēlamu metabolītu ražošanā un citur (Johns, 2018; Shahzad et al, 2017; Ieviņš, 2016; Espinosa-Leal, Puente-Garza & Garcia-Lara, 2018). Kā priekšrocības tiek minētas i) liela mēroga ii) ģenētiski vienādu iii) no slimībām brīvu iv) veselu augu, to daļu vai v) to sekundāro metabolītu vi) ātra pavairošana vii) mazākā telpā viii) izmantojot mazāk resursu ix) neatkarīgi no sezonas (Shahzad et al, 2017). Kā mīnusi minami augstās izmaksas (barotnes komponentes, elektrība, darbaspēks), augu ģenētiskā nestabilitāte, lēnā biomasas augšana un metabolītu ražošana salīdzinājumā ar mikroorganismu kultūrām (Espinosa-Leal, Puente-Garza & Garcia-Lara, 2018).

Morfoloģiski audu kultūras var iedalīt organizētās un neorganizētās. Adu kultūrās šo morfoloģijas nemainību nosaka barotnes kompozīcija un veids – cietā vai šķidrā. Organizētās kultūras tiek veidotas ar mērķi veidot vai uzturēt noteiktas definētas struktūras - augu orgānus. Izšķir galīgas kultūras, kas attīstās līdz nobriest vai sasniedz noteiktu formu vai izmēru (piem., ziedi, augļi), un bezgalīgas, kas turpina augt neierobežoti, līdz resursu izsīkumam (Bhatia, 2015b). Izplatītākās organizētās kultūras ir dzinumu, dzinumu galu vai dzinumu meristēmu kultūras (Ieviņš, 2016).

Neorganizētu kultūru mērķis ir iegūt lielāku nediferencēto šūnu masu, ko sauc par kallusu. (Bhatia, 2015b). Šādu kultūru radīšanai izmanto jebkuras ievainotas auga daļas, ko novieto uz barotnes, kam pievienoti augšanas regulatori – auksīni un citokinīni. Kalluss veidosies uz ievainojuma daļas un sastāvēs gan no diferencētajām eksplanta, gan nediferencētām šūnām, kas turpinās dalīties nepārtrauktā augšanas regulatoru ietekmē (Ieviņš, 2016, Bhatia, 2015b). Ilglaicīgi uzturot šīs kultūras tajās var notikt ģenētiskas un epigenētiskas izmaiņas. Kallusu kultūras var izmantot suspensiju kultūru izveidošanai, būtiski paātrinot šūnu masas palielināšanos. (Bhatia, 2015b).

Atkarībā no kultivēšanas mērķa un eksplantu veida nepieciešams izvēlēties atbilstošu barotnes kompozīciju. Vairāki parametri, kas jāņem vērā optimizējot barotni ir tās pH, sāļu precipitācija, augšanas faktoru izmantošana. Svarīgi to sterilizēt, lai izvairītos no

kontaminācijas (Bhatia, 2015b). Barotnei jāsaturs visas auga normālai attīstībai nepieciešamās barības vielas – organiskās vielas, vitamīni, oglekļa avots, mikro- un makroelementi, pH regulētājs, augšanas regulatori, cietajām barotnēm arī želējošais aģents. (Hussain et al, 2012).

Augšanas regulatori stimulē šūnu dalīšanos, tā regulējot arī audu diferencēšanos. Tiem jābūt noteiktās koncentrācijās un attiecībās, lai veidotos kalluss, saknes vai dzinums. Auksīni ierosina šūnu dalīšanos un pagarināšanos, apikālo dominenci, saknīšu veidošanos. Populārākie izmantotie ir naftalēn-etiķskābe (NAA), 2,4-dihlorofenokietīkskābe (2,4-D), indoletiķskābe (IAA) un indolsviestskābe (IBA). Citokinīni veicina šūnu dalīšanos, dzinumu veidošanos, ietekmē auksīnu transportu un arī aizkavē novecošanos; plašāk izmantotie ir zeatīns, kinetīns, 6-benzilaminopurīns (BAP), tidiazurons (TDZ). Giberilīni ir strukturāli savstarpēji līdzīgi savienojumi, ko izmanto augu reģenerācijā. Augu kultūrās izmanto giberelīnskābi (GA), kas pagarina starpposmus un meristēmu augšanu. Abscizskābi izmanto somatiskās embriogēnēzes ierosināšanai un kokaugiem (Bhatia, 2015b; Kyte & Kleyn, 1996). Ancimidols kavē augšanu, saīsina dzinumus un ierosina pumpurošanos. Paklobutrazols kavē augšanu. Floroglucinols var tikt izmantots kā antioksidants un audu hiperhidratācijas novēršanai (Kyte & Kleyn, 1996).

1.4.1. Sekundāro metabolītu ražošana audu kultūrās

Augu sekundārie metabolīti šūnās veic aizsardzības funkcijas un atbild par adaptāciju jauniem vides apstākļiem. Dabiski augos tie ir zemās koncentrācijās – tikai tik, cik augam pašam nepieciešams veiksmīgākai izdzīvošanai. Bieži šie augi ir reti un aizsargājami, vai interesējošo savienojumu līmenis tajos ir pārāk zems, lai būtu iespējams tos iegūt no veselīgiem augiem (Ochoa-Villarreal, 2016; Guerriero et al, 2018) *In vitro* kultūru izveidošana ļauj vieglāk manipulēt ar augu šūnu mašineriju, lai sintezētu interesējošos savienojumus, kas varbūt gan augam raksturīgi, gan nedabiski (Karuppusamy (2009); Bhatia & Bera, 2015).

Veiksmīgai sekundāro metabolītu ražošanai svarīgi atrast īsto mērķi uz ko iedarboties, taču problēmas var radīt informācijas trūkums par auga biosintēžu ceļu, iesaistītajiem enzīmiem un mehānismiem (Karuppusamy (2009); Bhatia & Bera, 2015). Kā viens no iespējamajiem mērķiem ir šūnas sienas – mutācijas celulozes sintāžu struktūrās paaugstināja antimikrobiālu sekundāro metabolītu sintēzi un līdz ar to rezistenci pret dažādiem patogēniem (Hernandez-Blanco et al 2007); arī barotnei pievienojot celulozes sintēzes inhibitorus vai samazinot bora koncentrāciju izdevies paaugstināt fenolu savienojumu metabolismu (Melida et al, 2011; Camacho-Cristobal et al, 2004).

Pielietojamās metodes var iedalīt klasiskajās un modernajās. Pie klasiskajām pieminamas selekcija, barotnes optimizācija izmainot komponentu (mikro- un makroelementi, aminoskābes, augšanas regulatori) koncentrācijas un attiecības, un vides apstākļu maiņa (pH, gaisma, temperatūra u.c.). Modernās metodes ietver elicitēšanu, piebarošanu ar prekursoriem, biotransformāciju, metabolisko un ģenētisko inženieriju, mērogošanu u.c. (Karuppusamy (2009); Bhojwani & Dantu, 2013; Bhatia & Bera, 2015).

Pareizas barotnes izvēlei un izveidei ir svarīga loma dažādos augu audu attīstības procesos. Audu biomasas pieaugums parasti saistāms ar zemāku sekundāro metabolītu sintēzi, bet aktīvākā metabolītu sintēze notiek vēlū augšanas stacionārajā fāzē. Tas norāda, ka īpaši efektīva varētu būt divejāda sistēma – biomasas saudzēšana uz vienas barotnes, tad pārvešana uz citu, kas piemērota sekundāro metabolītu ražošanai (Bhojwani & Dantu, 2013).

Augus ļoti ietekmē apkārtējā vide – temperatūra, gaisma, toksiskas gāzes, radiācija, ūdens pieejamība (sausuma vai sāļuma ietekmē). Zemās temperatūrās augi paaugstina krioprotektīvu molekulu sintēzi – cukurus, cukuru spirtus, mazmolekulārus slāpekļa savienojumus. Šūnas sienīņu stiprināšanai tiek sintezēti tādi fenolu savienojumi kā suberīns un lignīns. Sāļu koncentrācijai barotnē var būt dažāda ietekme atkarībā no auga – sāls tolerantos augos var paaugstināties antocianīnu līmenis, bet sāls jutīgos augos to daudzums būs mazāks. (Akula & Ravishankar, 2011)

Optimālas kultivēšanas rezultātā no kultūras iespējams iegūt savienojumus, kas pieder pie fenilpropanoīdu, alkaloīdu, terpenoīdu, hinonu un steroīdu grupām, var nebūt atrodamas veselos augos dabā, un ko var izmantotas dažādās jomās – farmācijā, pārtikā, kosmētikā (Karuppusamy (2009); Bhatia & Bera, 2015; Ochoa-Villarreal, 2016; Guerriero et al, 2018).

2. METODEDES

2.1. Izmantotās iekārtas

1. tabula.

Šī pētījuma izstrādē izmantoto iekārtu saraksts.

Table 1.

List of equipment used in this study.

Iekārta	Modelis	Specifikācija	Ražotājs	Valsts
Gaismas skapis	MLR-352H		Sanyo Electric Co.	Japāna
Svari	BJ 1000c	Precizitāte: 0.01g	Precisa Gravimetrics AG	Šveice
	XB 220A	Precizitāte: 0.1mg		
Liofilizators	Alpha 1-4 LD plus	0.040mbar, -58°C	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Vācija
Mikroplašu spektrofotometrs	Infinite 200Pro		Tecan Trading AG	Šveice
Ultra augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas iekārta ar diožu matricas detektoru	1290 Infinity series		Agilent Technologies	ASV
Augstas izšķirtspējas masas spektrometrs	6230 TOF LC/MS			
Kratītājs - inkubators	ES-20		Biosan	Latvija
Spektrofotometrs	NanoDrop 2000c		Thermo Fisher Scientific	ASV
Šūnu CO ₂ inkubators	CB 150	5% CO ₂ , 37 °C	Binder GmbH	Vācija

2.2. Krūmmellenes *Vaccinium corymbosum* kallusu kultūru kultivēšana

Pētījumā izmantotas krūmmelleņu *Vaccinium corymbosum* šķirņu “Bluecrop” (BC) un “Duke” (DK) kallusu kultūras, kas tika izveidotas LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā Mag.biol. Baibas Silamiķeles vadībā 2018.gada jūlijā (BC) un oktobrī (DK) pirms šī maģistra darba izstrādes.

Krūmmelleņu augu lapas tika ievāktas un nogādātas laboratorijā, kur tās tika sterilizētas pēc sekojošas shēmas: 1) mazgātas virsmaktīvās vielas šķīdumā (Fairy, Lielbritānija vai Tween20, Sigma Aldrich, Vācija) šķīdumā 30 min; 2) skalotas tekošā ūdenī 1h; 3) skalotas 70% EtOH 1 min; 4) skalotas 5-20% balinātājā (ACE, Lielbritānija) 5-30 min; 5) sterilos apstākļos 3 reizes skalotas ar sterilu ūdeni. Pēc apstrādes lapas sterilos apstākļos ar skalpeli tika sagrieztas aptuveni 5mmx10mm izmēra gabaliņos, kas tika novietoti uz agarizētās *Murashige&Skoog* (MS) barotnes, kam pievienoti augšanas faktori dažādās koncentrācijās. Visām barotnēm sastāvā bija MES monohidrāts (0.5 g/l), saharoze (30 g/l) un agars (7.5 g/l) (visi reaģenti no Duchefa Biochemie, Vācija). Eksplanti tika inkubēti 25°C temperatūrā ar 16h/8h gaismas/tumsas periodu līdz izveidojās nediferencētu šūnu sakopojumi, kas sterilos apstākļos tika pārnesti uz svaigām barotnēm un kultivēti tādos pat apstākļos.

Šī darba vajadzībām kallusi tika pārnesti un kultivēti uz MS vai *McCown Woody Plant* (WP) pamata barotnēm, kam pievienota 2,4-dihlorofenoksietikskābe (2,4-D) divās dažādās koncentrācijās - 0.2 µg/ml vai 0.5 µg/ml. Visām barotnēm sastāvā bija MES monohidrāts (0.5 g/l), saharoze (30 g/l) un agars (7.5 g/l). Visi reaģenti no Duchefa Biochemie (Vācija). 2.tabulā redzami darbā izmantoto barotņu apzīmējumi un attiecīgās atšķirības to sastāvā un pH. Kultivēšana notika trīs dažādos temperatūru režīmos (3.tabula).

2. tabula.

Pētījumā izmantoto barotņu sastāvs un pH.

Table 2.

Composition and pH of the media used in this study.

Barotnes apzīmējums	Pamata barotne	2,4-D konc., µg/ml	pH
MS-2D	MS	0.2	5.7 – 5.8
WP-2D	WP	0.2	5.7 – 5.8
WP-2D5	WP	0.2	4.8 - 4.9
MS-5D	MS	0.5	5.7 – 5.8
WP-5D	WP	0.5	5.7 – 5.8

Pētījumā izmantotie temperatūras režīmi.

Table 3.

Temperature settings used in this study.

Režīma apzīmējums	Temperatūra gaismas periodā (16h), °C	Temperatūra tumsas periodā (8h), °C
25°C	25	25
20/15°C	20	15
25/10°C	25	10

Kallusi tika kultivēti 3-4 nedēļas līdz sasniedza ievērojamu biomasas pieaugumu vai sāka brūnēt. Dzīvās daļas tika pārnestas uz svaigām barotnēm, un to kultivēšana turpināta, vai ievāktas no barotnēm un uzglabātas -80 °C temperatūrā tālākai apstrādei.

2.3. Biomasas pieaugums

Kallusu kultūrām tika noteikts biomasas pieaugums 24 dienu periodā. 0.dienā 0.05-0.08g smagi kallusu gabaliņi sterilos apstākļos tika pārnesti uz svaigām barotnēm un sanumurēti, tad ik pēc 3 dienām tie tika atkārtoti nosvērti, un piefiksēta katra gabaliņa masa (n=10). Izveidotas augšanas līknes, pēc kurām spriests par katrai šķirnei piemērotākajiem apstākļiem lielākas biomasas iegūšanai.

2.4. Ekstraktu iegūšana, to sausnes noteikšana.

Kallusi tika liofilizēti 48h -56°C 0.04mbar atmosfērā, pirms un pēc tam tos nosverot, lai noteiktu ūdens daudzumu svaigos kallusos. Liofilizēti kallusi tika saberzti pietā un iesvērti mēģenē. Tiem tika pievienots silts (~55-60°C) 70% EtOH. Mēģenes tika noslēgtas un inkubētas 55-60°C ūdens vannā 15min, tad ievietotas maisītājā uz nakti istabas temperatūrā. Ekstraktus centrifugēja pie 3700rpm 10min, un supernatantus pārnesa uz jaunām sterilām mēģenēm un uzglabāja tumsā istabas temperatūrā.

Ekstrakti taisīti 1:100 w/v attiecībā - 0.01g sausās masas uz 1ml 70% EtOH. Katras barotnes kallusiem uztaisīti trīs ekstraktu atkārtojumi (no trīs dažādām paudzēm), izņemot DK WP-2D5 25/10°C, WP-5D 20/15°C un WP-5D 25/10°C (katram pa diviem atkārtojumam), ko neizdevās saudzēt pietiekamā daudzumā.

Ekstrakti vienādos tilpumos tika iepildīti mikromēģenēs ar zināmu svaru, tad žāvēti 40°C temperatūrā un atkārtoti nosvērti. Izrēķināta sausā ekstrakta masa uz 1ml 70% EtOH.

2.5. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana

Iegūtajos ekstraktos tika noteikts kopējais fenolu daudzums pēc Herald, Gadgil un Tilley (2011) metodes. Tās pamatā ir ekstraktos esošo fenolu spēja sārmainā vidē veidojot fenolātu jonus, kas reducē Folin-Ciocalteu reaģenta komponentes, kas iekrāsojas zilā krāsā (Sanchez-Rangel et al, 2013).

96 lauciņu platē tika papildīti 25µl ekstraktu dupletes 8 seriālatšķaidījumos sākot no 50%. Katrā lauciņā pievienoti 75µl dH₂O un 25µl 1N Folin-Ciocalteu (Firma Chempur, Polija) reaģenta. Pēc 6 min inkubācijas istabas temperatūrā pievienoti 100µl 7% Na₂CO₃ (Enola, Latvija) šķīduma un plates inkubētas 90 min tumsā istabas temperatūrā. Lauciņiem mērīta absorbcija pie 765nm viļņu garuma – jo lielākas absorbciju vērtības, jo vairāk fenolu savienojumu ir paraugā. Kā pozitīvā kontrole izmantota gallusskābe (Sigma-Aldrich, Vācija). Iegūtie rezultāti izteikti kā mg gallusskābes ekvivalenti (GSE) / mg sausa ekstrakta (SE).

2.6. Flavonoīdu daudzuma noteikšana

Flavonoīdu daudzums iegūtajos ekstraktos tika noteikts ar Deivisa metodi (Huang et al., 2018), to pielāgojot mikroplatēm.

Platēs pēc plāna tika papildīti 20µl ekstraktu dupletes 4 seriālatšķaidījumos sākot no 50%. Lauciņos tika pievienoti 74µl dH₂O, 100µl 90% dietilēnglikola un 8µl 1M NaOH. Plates inkubētas 10 min 40°C ūdens vannā, tad atdzesētas līdz istabas temperatūrai. Platēm lasīta absorbcija pie 420nm viļņu garuma – augstāka absorbcija atbilst augstākai flavonoīdu koncentrācijai. Kā pozitīvā kontrole tika izmantots rutīns (Sigma-Aldrich, Vācija), un rezultāti izteikti kā mg rutīna ekvivalenti (RE) / mg SE.

2.7. DPPH radikāļa neutralizēšanas spēja

Iegūtajiem ekstraktiem tika noteikta antiradikālā aktivitāte (ARA) ar modificētu DPPH radikāļa neutralizēšanas metodi (Herald, Gadgil and Tilley, 2011). Metode balstās uz ekstraktos esošo savienojumu spēju reducēt DPPH radikāli, kā rezultātā tas maina krāsu no violetas uz dzeltenu.

96 lauciņu platē tika papildīti 20µl ekstraktu tripletos 8 seriālatšķaidījumos sākot no 50%. Katrā lauciņā pievienoti 180µl 150µM DPPH (Sigma, Vācija) 96% EtOH šķīduma. Plates inkubētas 60min tumsā istabas temperatūrā, absorbcija lasīta pie 517nm viļņu garuma – jo mazākas absorbciju vērtības, jo vairāk DPPH radikāļa reducēts. Kā pozitīvā kontrole izmantots Trolox (Sigma, Vācija), kā negatīvās kontroles izmantotas 70% EtOH un ūdens, rezultāti izteikti kā mmol Trolox ekvivalenti (TE) / mg SE un IK50 vērtība (ekstrakta koncentrācija (mg SE /ml), kas neitralizē 50% no 150mM DPPH radikāļa).

2.8. Organisko un fenolskābju satura noteikšana ekstraktos

Organisko un fenolskābju sastāva un daudzuma noteikšanu ekstraktos veica LU Ķīmijas fakultātes Fizikālās ķīmijas katedrā ar augstas veiktspējas šķidro hromatogrāfiju - masspektrometriju (HPLC-MS). Skābju analizēšanai tika izmantotas divas metodes – A un B.

A metode izmantota skābeņskābes, dzintarskābes, ābolskābes, citronskābes, glikonskābes un hīnskābes hromatogrāfiskai atdalīšanai ar Phenomenex Rezex ROA–Organic Acid H+ (8%), 4.6×150 mm kolonnu 55°C temperatūrā. Izokrātiskā eluēšana veikta ar 0.1% skudrskābes ūdens šķīdumu ar plūsmu 0.3 mL/min. Injekcijas tilpums bija 2µL. Masspektrometrijas apstākļi: negatīvās jonizācijas režīms, 285 °C žāvējošās gāzes temperatūra, 10 L/min slāpekļa plūsmas ātrums, 40psi smidzinātāja spiediens, 3500 V kapilārais spriegums, 75 V fragmentēšanas spriegums. Pilnās skenēšanas masas diapazons tika uzstādīts uz 50-1000 m/z. Iekšējai kontrolei izmantotas masas 112.9856 m/z un 1033.9881 m/z (G1969-85001 ES-TOF Reference Mass Solution Kit, Agilent Technologies & Supelco, ASV).

B metode izmantota šikīmskābes un hlorogēnskābes hromatogrāfiskai atdalīšanai ar Xterra MS C18, 2,1×150 mm, 3,5 µm (Waters) kolonnu 30 °C temperatūrā. Kustīgā fāze sastāvēja no 0.1% skudrskābes ūdenī (A) un acetonitrila (B). Plūsmas ātrums bija 0.3 mL/min un sekojoša izmantotā gradienta programma: 0 min, 2% B; 5.0 min, 2% B; 11.0 min, 95% B; 12.5 min, 95% B; 13.5 min, 2% B; 15 min, 2% B. Injekcijas tilpums bija 20 µL. Masspektrometrijas apstākļi: pozitīvās jonizēšanas režīms, 320 °C žāvējošās gāzes temperatūra, 12 L/min slāpekļa plūsmas ātrums, 40 psi izsmidzinātāja spiediens, 3500 V kapilārais spriegums un 130 V fragmentēšanas spriegums. Pilnās skenēšanas masas diapazons tika uzstādīts uz 100-1000 m/z. Iekšējai kontrolei izmantotas masas 121.0509 m/z un 922.0098 m/z (G1969-85001 ES-TOF Reference Mass Solution Kit, Agilent Technologies & Supelco, ASV).

Rezultāti izteikti µg / g sausā iesvara.

2.9. Antimikrobiālā aktivitāte

Ekstraktiem tika noteikta antimikrobiālā aktivitāte pret *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* un *Cutibacterium acnes* kultūrām izmantojot modificētu buljona mikroatšķaidījumu metodi (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008), nosakot minimālās inhibitorās un baktericīdās koncentrācijas (attiecīgi MIK un MBK).

Mikroorganismu tīrkultūras petri platēs tika saņemtas no Latvijas Mikroorganismu Kultūru kolekcijas.

Tika sagatavotas *E.coli* un *S.aureus* naktskultūras, sterilos apstākļos kultūras inokulējot 30 ml Millera-Hintona buljona (Conda, Spānija), tad ievietotas kratītājā ar ātrumu 150rpm un inkubētas 37°C pa nakti. 96 lauciņu platēs tika papildīti 50µl ekstraktu vai to bāze (70% EtOH) dažādās koncentrācijās tos atšķaidot ar ddH₂O, pievienoti 50µl barotnes. Naktskultūras tika atšķaidītas līdz OD₆₀₀ 0.08-0.1, tad atšķaidītas vēl 100 reizes ar Millera-Hintona buljonu. Platēs ekstraktiem tika pievienoti 100µl šādas mikroorganismu suspensijas, tad tās inkubētas 37°C 24h maisītājā ar ātrumu 150rpm. Atsevišķi sagatavoti pozitīvās (baktēriju kultūra tīrā barotnē un ar ddH₂O ekstrakta vietā) un negatīvās kontroles (tīrā barotne un barotne ar ddH₂O ekstraktu vietā) lauciņi.

C.acnes baktērijas no petri plates tika inokulētas ūdenī līdz OD₆₀₀ 0.08-0.1, tad atšķaidītas vēl 100 reizes ar divkārt koncentrētu Vilkinsa-Čalgrena anaerobo buljonu (Oxoid, Lielbritānija). 96 lauciņu platēs tika papildīti 100µl ekstraktu vai to bāze (70% EtOH) dažādās koncentrācijās tos atšķaidot ar ddH₂O. Platēs ekstraktiem tika pievienoti 100µl mikroorganismu suspensijas, tad tās inkubētas 37°C 24h kratītājā ar ātrumu 150rpm. Anaerobie apstākļi nodrošināti ar BD GasPak™ EZ maisiņu sistēmu ar indikatoru (BD, ASV). Atsevišķi sagatavoti pozitīvās (100µl ddH₂O +100µl šūnu suspensija) un negatīvās kontroles (100µl ddH₂O +100µl divkārsā barotne) lauciņi.

Pēc inkubācijas (*E.coli* un *S.aureus* - 24h, *C.acnes* - 60h) tika vizuāli novērtēta ekstraktu un šķīdinātāja inhibitorā ietekme - ja lauciņā šķidrums bija saglabājies dzidrs un nebija redzamas mikroorganismu kolonijas, atbilstošā mazākā koncentrācija tika uzskatīta kā MIK.

5µl no MIK un nākamās lielākās (atsevišķos gadījumos arī nākamās mazākās) koncentrācijas lauciņiem tika uznesti uz cietajām barotnēm - Millera-Hintona agars (BD, ASV) *E.coli* un *S.aureus* baktērijām, Vilkinsa-Čalgrena anaerobais buljons ar 15g/l bakterioloģisko agaru (Conda, Spānija) *C.acnes* baktērijām - un inkubēti 37°C. Gadījumos, kad nebija iespējams noteikt MIK izveidojušos nogulšņu dēļ, uz agarizētās barotnes tika uznesti 5µl no visiem neskaidrajiem lauciņiem. Pēc inkubācijas (*E.coli* un *S.aureus* 24h, *C.acnes* - 48h)

vizuāli novērtēta ekstraktu un bāzes inhibitorā un baktericīdā ietekme - ja uz plates nebija redzama neviena koloniju veidojošā vienība (KVV) vietā, kur tika uznesta suspensija no 96 lauciņu platēm, tad atbilstošā koncentrācija tika uzverta kā MBK. Salīdzināšanai uznesti arī pozitīvo un negatīvo kontroļu paraugi.

Ekstrakti un to bāze (70% EtOH) testēti sešos seriālatšķaidījumos sākot ar 25% koncentrāciju. Rezultāti izteikti mg SE /ml.

2.10. Citotoksicitātes tests

Pēc antioksidatīvās aktivitātes testa rezultātu izvērtēšanas, četriem ekstraktiem ar augstākajiem rādītājiem tika pārbaudīts to citotoksiskais efekts uz komerciāli iegādātu 3T3 peļu fibroblastu šūnu līniju izmantojot neitrālsarkanās krāsvielas uzņemšanas testu saskaņā ar OECD vadlīnijām Nr. 129 (OECD, 2010). Tests balstās uz dzīvo šūnu spēju uzņemt šo krāsvielu, kas šūnu fiksēšanas laikā atkal izplūst vidē. Nolasot absorbciju, iespējams noteikt šūnu relatīvo dzīvotspēju ekstraktu klātbūtnē salīdzinot ar kontroles paraugiem.

3T3 šūnas (14.-15. pasāža) tika izsētas sterilās 96 lauciņu platēs pa 4000 šūnām lauciņā 100µl S10 barotnē (10% jaunlopu serums (JS) / Dulbeko modificētā Īgla barotne ar 1% penicilīna/streptomicīna piedevu (DMEM) (visi reaģenti no Sigma, Vācija)) un inkubētas pa nakti 37°C 5% CO₂ atmosfērā. Nākamajā dienā šūnas skalotas ar fosfātu buferšķīdumu (Sigma, Vācija), pēc plāna (4.attēls) pievienoti 100µl S5 (5% JS/DMEM) ar pārbaudāmo ekstraktu, šķīdinātāja kontroli (70% EtOH) vai pozitīvo kontroli (nātrija dodecilsulfāts) 8 seriālatšķaidījumos sākot ar 10%. Pēc 48h inkubācijas 37°C 5% CO₂ atmosfērā šūnas skalotas ar fosfātu buferšķīdumu, tad pievienoti 250µl S5 barotnes ar neitrālsarkano krāsvielu. Plates inkubētas 3h iepriekšējos apstākļos, skalotas ar fosfātu buferšķīdumu, tad pievienoti 100µl desorbcijas šķīduma (50% EtOH / 1% ledus etiķskābe / 49% dH₂O). Visi reaģenti no Sigma (Vācija). Plates inkubētas 20-40 min tumsā istabas temperatūrā uz kratītāja, tad mērīta absorbcija pie 540nm viļņu garuma - jo lielāka nolasītās absorbcijas vērtība, jo vairāk dzīvo šūnu lauciņā. Testēto vielu ietekme uz šūnu dzīvotspēju izteikta procentuāli kā absorbciju attiecība salīdzinot ar negatīvo kontroli (S5 barotne), noteikta arī testēto vielu IK50 koncentrācija.

Rezultāti izteikti kā ekstrakta koncentrācija % no kopējā tilpuma.

NKb	NKb	P _{1b}	P _{2b}	P _{3b}	P _{4b}	P _{5b}	P _{6b}	P _{7b}	P _{8b}	NKb	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NK	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	NK	NKb
NKb	NKb	P _{1b}	P _{2b}	P _{3b}	P _{4b}	P _{5b}	P _{6b}	P _{7b}	P _{8b}	NKb	NKb

4. attēls. Citotoksicitātes testa plates plāns. NK – negatīvā kontrole (n=12), NKb – negatīvā kontrole bez šūnām (n=20), P₁₋₈ – paraugi 8 koncentrācijās (n=3), P_xb – paraugs 8 koncentrācijās bez šūnām (n=1).

Figure 4. Layout of cytotoxicity test plate. NK – negative control (n=12), NKb – negative control without cells (n=20), P₁₋₈ – samples in 8 concentrations (n=3), P_xb – samples in 8 concentrations without cells (n=1).

2.11. Iegūto datu apstrāde un analīze

Mikroplašu testos plašu absorbciju lasīšanai izmantota *i-control* (Tecan Trading AG, Šveice) programma.

HPLC-MS datu apstrādei izmantota *MassHunter Qualitative Analyses B.07.00* programma.

Mikroorganismu kultūru optiskā blīvuma noteikšanai izmantota *Nanodrop 2000/2000c* programma.

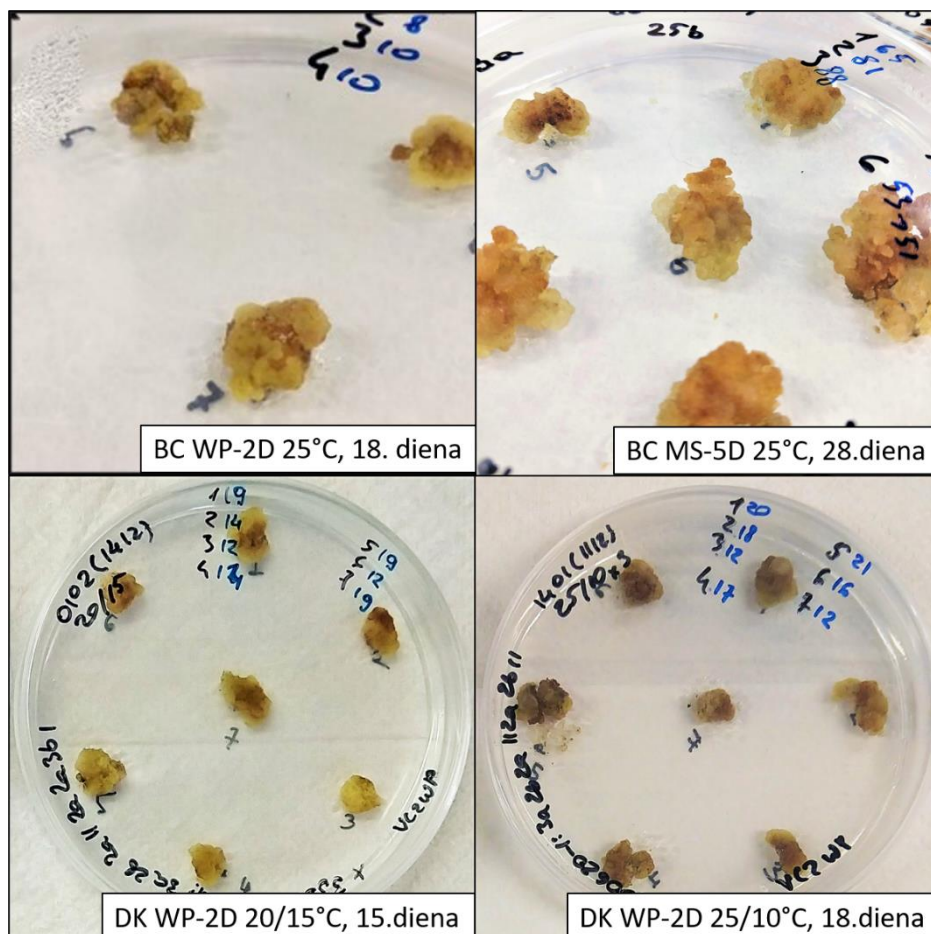
Skaitlisko datu apstrādei, grafiku veidošanai un statistiskās analīzes veikšanai izmantotas datorprogrammas *Microsoft Excel 365* un *GraphPad Prism 8.4.2*. Datu statistiskā būtiskuma noteikšanai veikti divu faktoru ANOVA testi un Takija (*Tukey*) tests paraugu savstarpējai salīdzināšanai.

3. REZULTĀTI

3.1. Krūmmelleņu kallusu kultūras un to biomasu pieaugums

Darba gaitā krūmmelleņu kallusu kultūras tika audzētas uz piecām atšķirīgām barotnēm trīs dažādos temperatūru režīmos. Pētījuma laikā tika novērotas atšķirības kallusu izskatā un augšanas ātrumā atkarībā gan no izmantotās barotnes, gan arī augšanas temperatūras apstākļiem.

Kallusu krāsa bija mainīga no gaiši dzeltenbrūnas līdz dzeltenzaļai un zaļai, novecojot un nelabvēlīgos apstākļos tie kļuva tumši brūni (5att). Uz WP-2D barotnes augušajiem kallusiem veidojās baltas-gaiši dzeltenas apsarmes, kas mehānisko manipulāciju (pārlikšana ar pinceti, sadalīšana) laikā kļuva košāk dzeltenas. Pārsvārā kallusi bija stingri un viengabalaini, izņemot uz MS-5D barotnes audzētie, kas bija mīksti un irdeni. Katra kallusu paaudze tika audzēta 3-4 nedēļas, līdz sāka brūnēt vai sasniedza apmērus, kas apgrūtināja tālāku augšanu.



5. attēls. Pētījuma laikā novērotā atšķirīgā melleņu kallusu morfoloģiju piemēri.

Figure 5. Examples of different morphologies of blueberry calli observed during this study.

Svaigiem kallusiem tika noteikts ūdens daudzums, tos nosverot pirms un pēc liofilizācijas. Ūdens piesātinājums starp visām kultūrām bija vidēji $92.84 \pm 1.60\%$. Zemākais ūdens daudzums (85.29%) bija DK šķirnes kallusos, kas audzēti uz WP-2D barotnes $20/15^\circ\text{C}$ temperatūru režīmā, bet augstākie – 95.21% un 95.06% - BC kallusos, kas audzēti uz MS-5D barotnes $25/10^\circ\text{C}$ un konstantas 25°C temperatūras.

Katrai kallusu kultūrai tika noteikts biomasas pieaugums 24 dienu laikā pēc paaudzju maiņas, kas tika rēķināts procentos no sākotnējā svara pēc formulas (1):

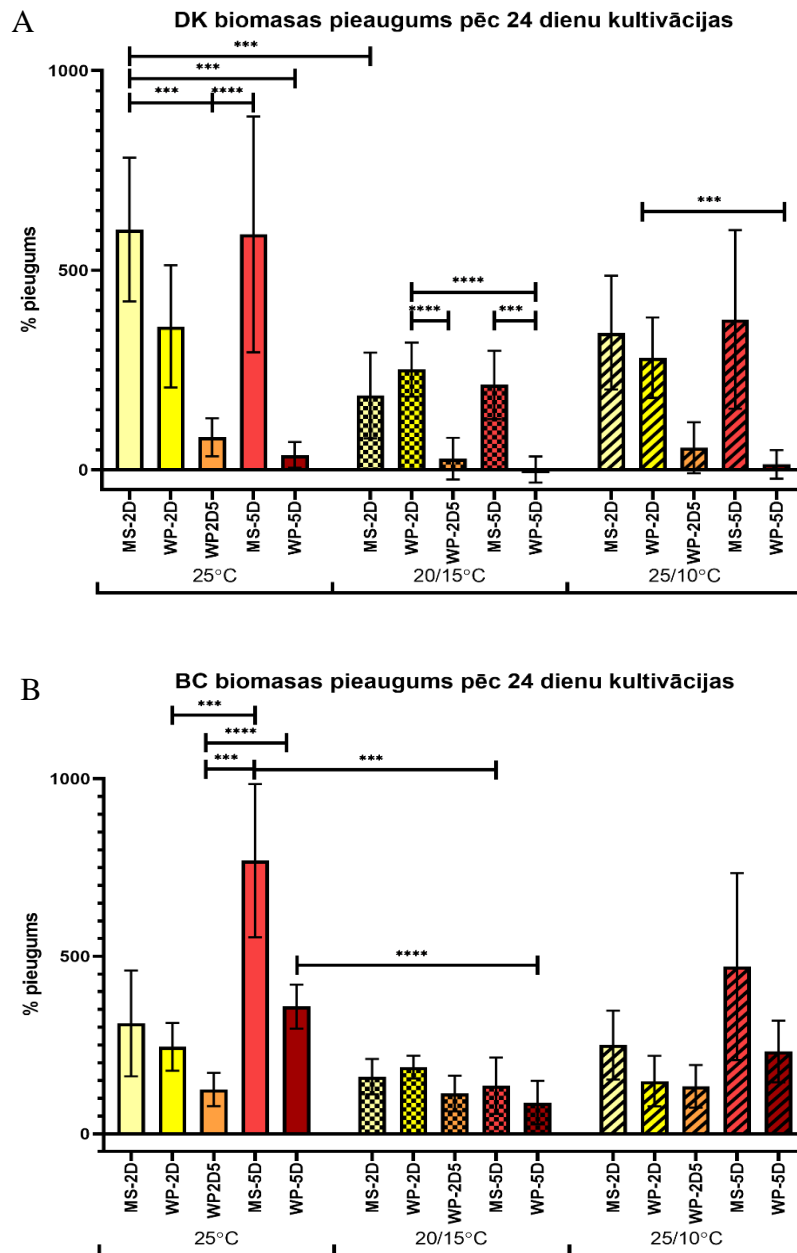
$$\text{pieaugums } \% = \frac{m_b - m_s}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

kur m_b – beigu masa un m_s – sākuma masa.

Kallusu biomasas pieaugums tika mērīts 10 kallusu gabaliņiem no dažādām paaudzēm uz katras barotnes. Grafiki ar biomasas augšanas līknēm katrā temperatūras režīmā redzami 1.pielikumā, statistiskās analīzes dati par pieaugumu pēc 24 dienu kultivācijas apkopoti 2.pielikumā. Lielākie biomasas pieaugumi bija kallusu kultūrām 25°C temperatūras režīmā – BC šķirnei uz MS-5D un DK šķirnei uz MS-2D un MS-5D barotnēm, attiecīgi $769.67 \pm 215.71\%$, $602.144 \pm 180.14\%$ un $590.17 \pm 295.24\%$ (6. attēls). Arī kopumā abām šķirnēm katras barotnes ietvaros lielākās biomasas tika iegūtas pie šī konstantās temperatūras režīma. $20/15^\circ\text{C}$ temperatūras režīmā lielāks biomasas pieaugums tika konstatēts DK kallusiem uz WP-2D un MS-5D barotnēm - attiecīgi $251.24 \pm 67.64\%$ un $212.86 \pm 85.72\%$, kamēr BC kallusiem šajā temperatūru režīmā pieaugums nepārsniedza 200% .

DK šķirnes kallusi īpaši slikti auga uz WP-5D barotnes $20/15^\circ\text{C}$ un $25/10^\circ\text{C}$ temperatūru režīmos (6.attēls A), lielākajai daļai kallusu atmirstot un zaudējot masu jau kultivācijas sākumā; vidējais pieaugums šīm kultūrām bija attiecīgi $0.81 \pm 32.70\%$ un $13.86 \pm 35.98\%$. Pie konstantas 25°C DK kallusi uz šīs barotnes izdzīvoja, bet biomasas pieaugums tāpat bija ļoti neliels - 37.32 ± 32.28 . Tāpat ļoti mazs pieaugums DK kallusiem bija uz WP-2D5 barotnes visos temperatūru režīmos. Uz WP-2D barotnes augušie kallusi guva līdzīgu pieaugumu visos temperatūru režīmos – no $251.24 \pm 67.64\%$ ($20/15^\circ\text{C}$) līdz $359.46 \pm 153.35\%$ (25°C).

BC šķirnes kallusi pie $20/15^\circ\text{C}$ temperatūras režīma līdzīgi auga uz visām barotnēm, gūstot pieaugumu no $87.75 \pm 61.17\%$ uz WP-5D līdz $187.74 \pm 31.96\%$ uz WP-2D barotnes (6.attēls B). Līdzīgi kā DK, arī BC kallusiem, kas kultivēti uz WP-2D5 un WP-2D barotnēm, biomasas pieaugums bija līdzīgs visos temperatūru režīmos – attiecīgi no $113.33 \pm 50.17\%$ līdz $133.69 \pm 60.07\%$ un no $148.31 \pm 71.12\%$ līdz $244.99 \pm 67.14\%$.



6. attēls. DK (A) un BC (B) kallusu biomasas pieaugums (%) pēc 24 dienu kultivēšanas. Ar kļūdu nogriežņiem attēlotas standartnovirzes, n=10. Statistiski būtiskas atšķirības noteiktas ar divfaktoru atkārtoto mērījumu dispersijas analīzi (*two-way RM ANOVA*) un Takija pēctestu (*Tukey's multiple comparisons test*) atzīmētas tikai katra temperatūru režīmu vai vienādu barotņu ietvaros, ja $p < 0.001$: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Statistikas dati apkopāti 2.pielikumā.

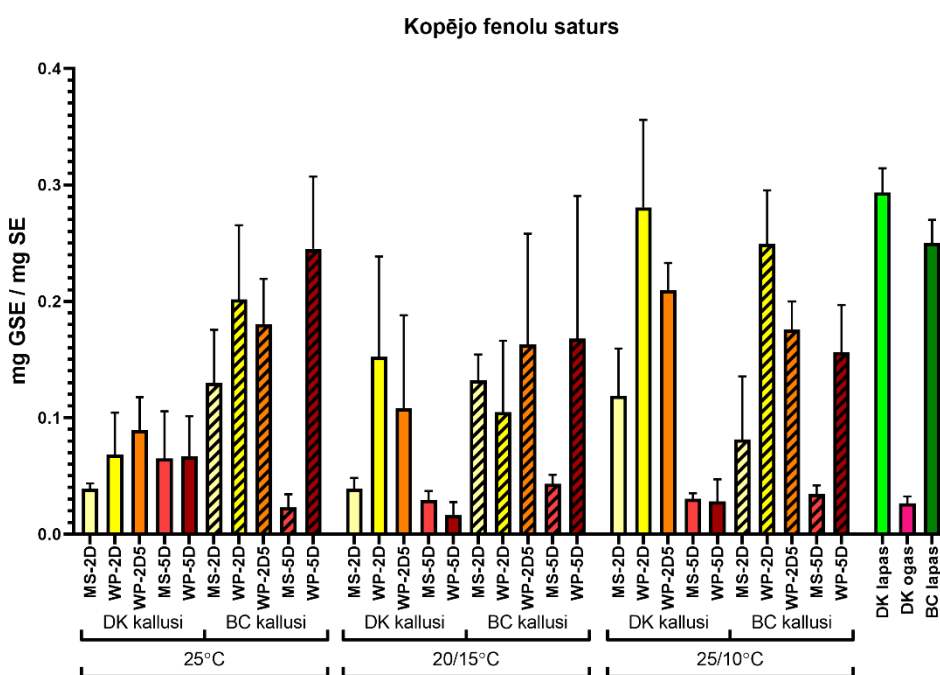
Figure 6. The increases in DK (A) and BC (B) calli biomass (%) after 24 days of cultivation. Error bars represent standard deviation., n=10. Statistical significance determined by *Two-way RM ANOVA* and *Tukey's multiple comparisons test*, and noted only within each temperature setting or for the same medium, if $p < 0.001$: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Statistical data combined in Annex 2.

Veicot Spīrmana korelācijas testu, tika atrasta vidēji zema pozitīva sakarība starp kallusu ūdens saturu un 2,4-D koncentrāciju barotnē ($r = 0.455$, $p < 0.05$), un biomasas pieaugumu pēc 24 dienām ($r = 0.525$, $p < 0.05$) (3.pielikums).

3.2. Kopējo fenolu un kopējo flavonoīdu saturs

Pēc kallusu liofilizēšanas tika sagatavoti ekstrakti, kuros noteikts kopējo fenolu (gallusskābes ekvivalentos) un kopējo flavonoīdu (rutīna ekvivalentos) saturs. Papildus salīdzināšanai izmantoja tāpat sagatavotus ekstraktus no veselo augu lapām un DK šķirnes gadījumā arī ogām.

Augstākais fenolu saturs tika konstatēts DK lapu ekstraktos - 0.293 ± 0.021 mg GSE/mg sausā ekstrakta (SE), savukārt, ogās fenolu bija aptuveni 10 reīzu mazāk – tikai 0.027 ± 0.006 mg GSE/mg SE (7.att). Kallusu ekstraktos fenolu saturs bija ļoti mainīgs, turklāt gan mazākais, gan lielākais vidējais fenolu daudzums noteikts DK šķirnes kallusu kultūrās – attiecīgi 0.017 ± 0.011 mg GSE/mg SE (WP-5D 20/15°C) līdz 0.281 ± 0.075 mg GSE/mg SE (WP-2D 25/10°C). Augstākās iegūtās fenolu koncentrācijas bija tuvas augu lapās noteiktajām.



7. attēls. Ekstraktos noteikto kopējo fenolu saturs izteikts mg gallusskābes ekvivalentu (GSE)/ mg SE. Ar kļūdu nogriežņiem attēlotas standartnovirzes, n=6 (3 bioloģiskie x 2 tehniskie atkārtējumi). Statistiskās analīzes dati pievienoti 4.pielikumā.

Figure 7. Total phenolics content of extracts in mg gallic acid equivalents (GAE)/ mg DW. Error bars represent standard deviation, n=6 (3 biological x 2 technical repeats). Statistical data added in Annex 4.

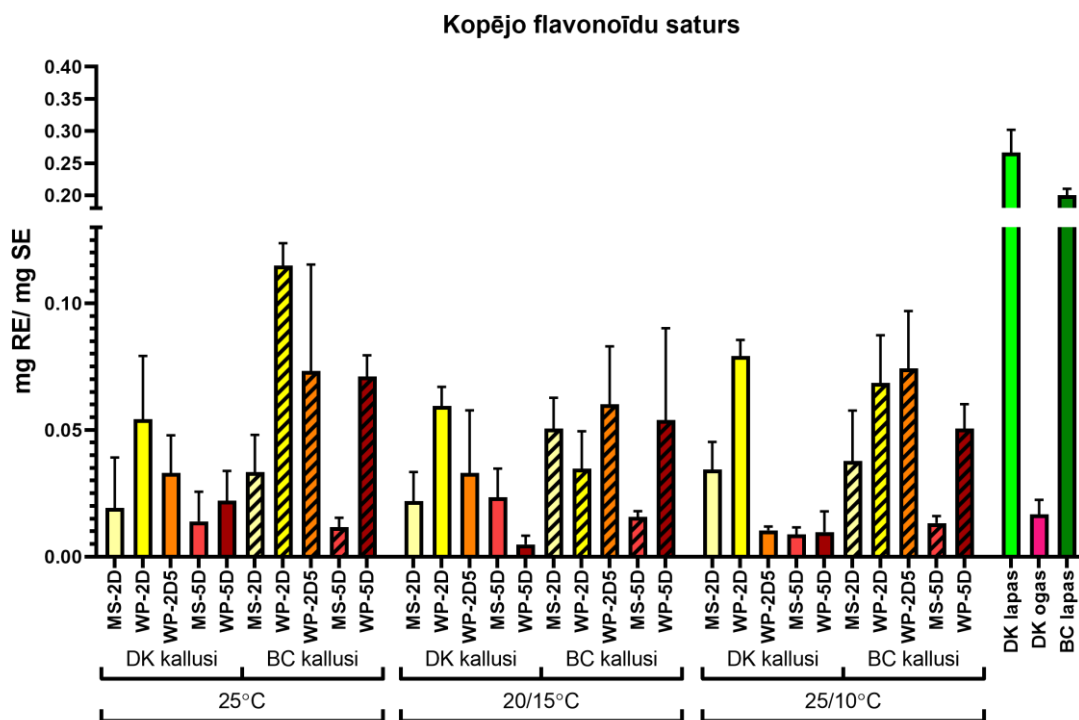
Pie konstantas temperatūras augušie DK kallusi uzrādīja līdzīgu fenolu daudzumu neatkarīgi no barotnes - 0.039 ± 0.005 – 0.090 ± 0.028 mg GSE/mg SE -, savukārt pie mainīgas temperatūras manāmi paaugstinājās fenolu daudzums kallusos, kas audzēti uz barotnēm ar zemāko 2,4-D koncentrāciju, un samazinājās pie augstākas 2,4-D koncentrācijas.

BC šķirnei zemākie fenolu daudzumi konstatēti ekstraktos no kallusiem, kas kultivēti uz MS-5D barotnes visos temperatūru režīmos – 0.023 ± 0.011 – 0.043 ± 0.008 mg GSE/mg SE. Augstākie rādītāji, kas ir līdzvērtīgi arī šķirnes lapu ekstraktos noteiktajam (0.250 ± 0.02 mg GSE/mg SE), iegūti no kallusiem, kas auguši uz WP bāzes barotnēm pie augstākām temperatūrām – attiecīgi 0.249 ± 0.046 mg GSE/mg SE (WP-2D 25/10°C) un 0.245 ± 0.062 mg GSE/mg SE (WP-5D 25°C).

Augstākais flavonoīdu saturs tika konstatēts lapu ekstraktos – DK tas bija 0.267 ± 0.035 mg RE/mg SE un BC – 0.200 ± 0.01 mg RE/mg SE (8.attēls). Līdzīgi kā ar kopējo fenola savienojumu daudzumu, ogās flavonoīdu bija daudzāk mazāk – tikai 0.017 ± 0.006 mg RE/mg SE. Kallusu ekstraktos flavonoīdu saturs nepārsniedza 0.115 ± 0.009 mg RE/mg SE (BC WP-2D 25°C), kas ir aptuveni divreiz mazāk nekā lapās.

No DK kallusiem augstākās flavonoīdu satura vērtības konstatētas tajos, kas kultivēti uz WP-2D barotnes, turklāt tās ir līdzīgas visos temperatūru režīmos – no 0.054 ± 0.025 mg RE/mg SE pie konstantas temperatūras līdz 0.079 ± 0.006 mg RE/mg SE 25/10°C temperatūrā (šim ekstraktam noteikts arī augstākais kopējo fenolu daudzums šķirnes ietvaros). No BC kallusiem augstākie kopējo flavonoīdu saturi, līdzīgi kā kopējie fenoli, konstatēti tajos, kas auguši uz WP pamata barotnes konstantā 25°C temperatūrā un 25/10°C temperatūras režīmā, bet zemākās vērtības noteiktas uz MS-5D barotnes augušo kallusu ekstraktos neatkarīgi no temperatūras.

Veicot Spīrmana korelācijas testu visu ekstraktu datiem, redzama cieša pozitīva sakarība starp fenolu un flavonoīdu saturu: $r = 0.849$, $p < 0.0001$ (3.pielikums). Kopējo fenolu un kopējo flavonoīdu saturam ir līdzīga, vidēji vāja negatīva korelācija ar barotnē izmantoto 2,4-D koncentrāciju, attiecīgi $r = -0.489$ un $r = -0.517$ ($p < 0.01$). Statistiski būtiskas korelācijas ar biomasas pieaugumu vai kallusu ūdens saturu netika konstatētas.



8. attēls. Ekstraktos noteikto kopējo flavonoīdu saturs izteikts mg rutīna ekvivalentu (RE)/ mg SE. Ar kļūdu nogriežņiem attēlotas standartnovirzes, n=6 (3 bioloģiskie x 2 tehniskie atkārtējumi). Statistiskās analīzes dati pievienoti 5.pielikumā.

Figure 8. Total flavonoid content of extracts in mg rutin equivalents (RE)/ mg DW. Error bars represent standard deviation, n=6 (3 biological x 2 technical repeats). Statistical data added in Annex 5.

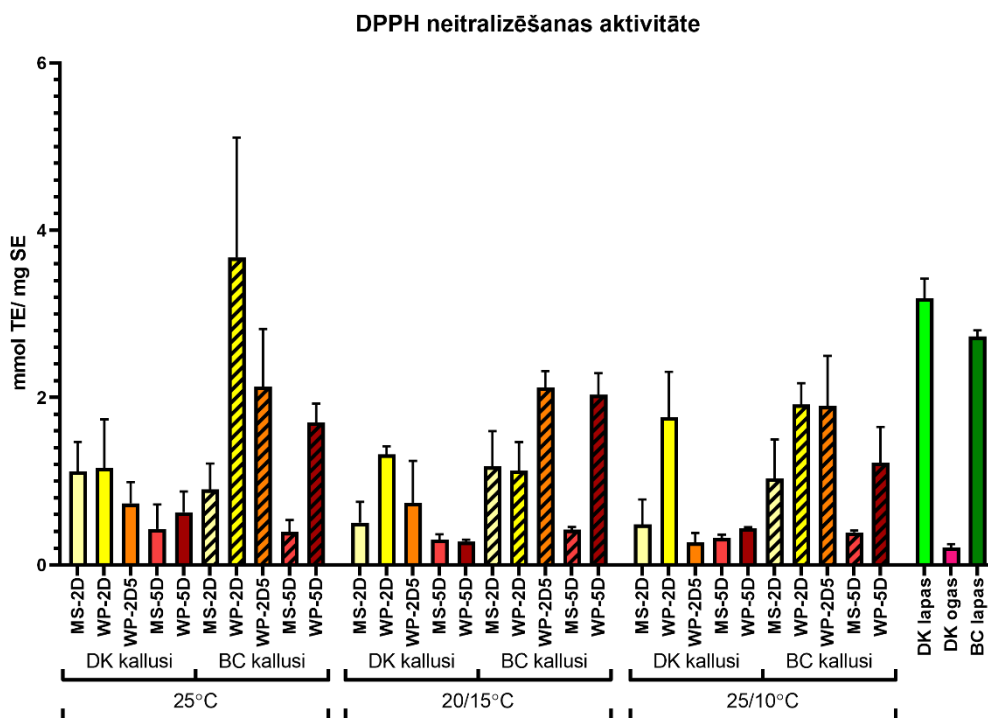
3.3. Kallusu ekstraktu antioksidatīvā spēja

Sagatavotajiem ekstraktiem tika testēta antioksidatīvā aktivitāte ar DPPH radikāļa neutralizēšanas metodi.

Augstāko aktivitāti uzrādīja uz WP-2D barotnes 25°C temperatūrā audzētas BC kallusu kultūras ekstrakts – 3.677 ± 1.432 mmol TE/ mg SE, turklāt tas bija vienīgais, kuru antioksidatīvā aktivitāte pārsniedza lapu ekstraktu aktivitātes – attiecīgi 3.188 ± 0.233 mmol TE/ mg SE DK lapām un 2.732 ± 0.073 mmol TE/ mg SE BC lapām (9.attēts). Arī šajā testā lapu ekstrakti uzrādīja daudzkārt augstākus rezultātus nekā ogu ekstrakts, kura aktivitāte bija 0.210 ± 0.039 mmol TE/ mg SE.

Kallusu ekstraktu antioksidatīvā aktivitātes testa rezultāti lielā mērā sakrita ar kopējo fenolu un kopējo flavonoīdu saturiem, tika konstatēta cieša pozitīva sakarība starp šiem rādītājiem (Spīrmana korelācijas koeficienti attiecīgi $r = 0.816$ ($p < 0.0001$) un $r = 0.941$

($p < 0.0001$) (3.pielikums)). Vāja negatīva sakarība tika konstatēta starp ekstraktu antioksidatīvo aktivitāti un 2,4-D koncentrāciju barotnē ($r = -0.464$, $p < 0.01$).



9. attēls. Ekstraktiem noteiktā DPPH radikāļa neutralizēšanas aktivitāte izteikta mmol Trolox ekvivalentu (TE)/ mg SE. Ar kļūdu nogriežņiem attēlotas standartnovirzes, $n=9$ (3 bioloģiskie x 3 tehniskie atkārtojumi). Statistiskās analīzes dati pievienoti 6.pielikumā.

Figure 9. DPPH radical scavenging activity of extracts in mmol Trolox equivalents (TE)/ mg DW. Error bars represent standard deviation, $n=9$ (3 biological x 3 technical repeats). Statistical data added in Annex 6.

DK kallusiem augstāko aktivitāti uzrādīja uz WP-2D barotnes augušo kallusu ekstrakti visos temperatūru režīmos, turklāt līdzīgos apjomos – no 1.158 ± 0.582 mmol TE/ mg SE pie konstantas 25°C temperatūras līdz 1.763 ± 0.546 mmol TE/ mg SE pie 25/10°C maiņas režīma. Šķirnes ietvaros vislīdzīgākie rezultāti starp barotnēm arī redzami pie konstantās temperatūras.

BC šķirnes kallusiem kopumā redzama augstāka DPPH neutralizēšanas aktivitāte, turklāt arī ekstraktos, kas gatavoti no kallusiem, kas audzēti uz WP pamata barotnes. Zemāko aktivitāti uzrādīja uz MS-5D augušo kultūru ekstrakti visos temperatūru režīmos – 0.391 ± 0.021 mmol TE/ mg SE (25/10°C) līdz 0.422 ± 0.032 mmol TE/ mg SE (20/15°C).

Visiem ekstraktiem arī noteiktas IK50 vērtības, kas apkopotas tabulā 7.pielikumā.

3.4. Organisko un fenolskābju koncentrācijas ekstraktos.

Ar HPLC-MS metodi ekstraktos tika noteiktas septiņu organisko (citronskābe, ābolskābe, glikonskābe, skābeņskābe, dzintarskābe, hīnskābe un šikīmskābe) un vienas fenolskābju (hlorogēnskābe) koncentrācijas. Lielākajai daļai ekstraktu tika veikti trīs mērījumu atkārtojumi. Tā kā metode prasa relatīvi lielu paraugu tilpumu un daudz laika, un vairākas kallusu kultūras augs ļoti lēni, tad neizdevās laicīgi sagatavot šos ekstraktus pietiekamā tilpumā, kā rezultātā uz analīzēm tika iedoti tikai viens vai divi atkārtojumi. Arī no lapu un ogu ekstraktiem uz analīzēm tika iedoti pa vienam paraugam, lai dotu priekšstatu par meklēto savienojumu koncentrācijām augā. Visu skābju rezultāti apvienoti 4. un 5.tabulās, bet katras skābes atsevišķajā grafikā (8-15. pielikums) norādīts atkārtojumu skaits 1-3.

Kopumā skābju koncentrācijas bija ļoti atšķirīgas starp ekstraktu bioloģiskajiem atkārtojumiem, veidojot lielas standartnovirzes. Gadījumos, kad kādā no atkārtojumiem kāds no meklētajiem savienojumiem netika konstatēts (bija zem detekcijas sliekšņa), rezultātu tabulā šajā pozīcijā tika ierakstīta 0 vērtība, kas arī ņemta vērā aprēķinot koncentrāciju vidējās vērtības.

Vislielākā citronskābes koncentrācija tika noteikta ogu ekstraktā - 44534 $\mu\text{g/g}$ iesvara, un tā bija aptuveni trīs reizes lielāka nekā augstākā kallusu ekstraktos noteiktā - 13839 \pm 1084 $\mu\text{g/g}$ (BC WP-2D5 25°C) -, un 10-20 reizes augstāka nekā lapu ekstraktos (4.tabula, 8.pielikums). BC kallusu ekstraktos citronskābe augstākā koncentrācijā noteikta pie zemākas 2,4-D koncentrācijas barotnē un konstantas temperatūras, un svārstījās no 10207 \pm 4265 $\mu\text{g/g}$ līdz 13839 \pm 1084 $\mu\text{g/g}$.

Ābolskābe kopumā kallusu kultūrās bija daudzārt lielāka nekā lapu un ogu ekstraktos (4. tabula, 9.pielikums). Augstākās koncentrācijas DK kallusu ekstraktos noteiktas uz MS-2D barotnes audzētajos kallusos - attiecīgi no 28292 \pm 2262 $\mu\text{g/g}$ pie 25/10°C temperatūras līdz 35012 \pm 20194 $\mu\text{g/g}$ 20/15°C temperatūras režīmā. BC kallusos ābolskābe bija līdzīgās koncentrācijās visos paraugos.

Augstākā glikonskābes koncentrācija tika konstatēta ogu ekstraktā - 859 $\mu\text{g/g}$, savukārt lapu ekstraktos netika konstatēta vispār (4.tabula, 10.pielikums). Ekstrakti no kallusiem, kas auguši uz barotnes ar zemāko pH 20/15°C mainīgajā temperatūrā, uzrādīja augstāko koncentrāciju starp kallusu kultūrām katras šķirnes ietvaros; BC kallusos tā bija 550.33 \pm 745.69 $\mu\text{g/g}$ un DK kallusos - 472.00 \pm 311.13 $\mu\text{g/g}$.

Ar HPLC-MS noteiktās citronskābes, ābolskābes, glikonskābes un skābeņskābes koncentrācijas ekstraktu paraugos. SN= standartnovirze, ND – netika detektēts, SE- sausais ekstrakts.

Table 4.

Concentraions of citric, malic, gluconic and oxalic acids in extracts detected using HPLC-MS. SN- standard deviation, ND – not detected, SE – dry extract.

			Citronskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Ābolskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Glikonskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Skābeņskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$	
			Vid.	SN	Vid.	SN	Vid.	SN	Vid.	SN
DK kallusi	MS-2D	25°C	124.50	38.89	29013.67	2706.67	342.00	66.96	45.67	31.47
		20/15°C	168.67	52.55	35012.33	20194.21	150.33	99.63	9.00	8.19
		25/10°C	486.00	156.62	28292.33	2261.76	257.00	28.58	36.00	7.94
	WP-2D	25°C	83.33	42.59	18369.33	3365.29	265.33	54.12	35.67	5.03
		20/15°C	162.67	98.34	13986.00	2095.37	290.33	151.51	21.00	18.36
		25/10°C	255.33	148.19	18680.67	2586.29	384.33	54.27	98.67	37.21
	WP-2D5	25°C	43.00	16.52	7779.33	3056.42	286.33	95.20	19.00	6.08
		20/15°C	185.00	111.00	19902.33	8838.27	472.00	311.13	58.33	49.14
		25/10°C	126.00	0.00	8709.00	12292.34	169.00	239.00	11.50	16.26
	MS-5D	25°C	123.50	174.66	15592.25	22027.44	90.00	127.28	19.50	27.58
		20/15°C	76.50	108.19	11971.50	16911.87	98.50	139.30	3.50	4.95
		25/10°C	81.00	114.55	11316.00	15983.44	124.50	176.07	6.50	9.19
WP-5D	25°C	ND		7.00		ND		ND		
	20/15°C	ND		9.50		ND		ND		
	25/10°C	104.00		6099.00		392.00		5.00		
BC kallusi	MS-2D	25°C	194.50	38.89	22337.67	1962.50	363.00	485.85	22.00	8.54
		20/15°C	269.67	117.86	19877.67	1412.49	246.67	101.75	77.33	60.29
		25/10°C	463.00	144.25	29195.33	12390.31	203.00	61.10	40.33	36.47
	WP-2D	25°C	115.50	60.10	10705.00	3505.02	120.00	29.46	45.00	38.74
		20/15°C	393.00	324.00	20184.33	10509.27	288.33	329.18	32.67	28.36
		25/10°C	427.33	7.64	27173.67	12017.60	365.67	250.87	54.67	16.01
	WP-2D5	25°C	306.00	216.39	16637.00	5663.18	198.00	68.79	57.33	22.19
		20/15°C	363.33	28.71	20836.33	9585.00	550.33	745.69	70.33	28.75
		25/10°C	395.00	69.30	16934.00	4918.17	254.00	205.59	54.67	23.01
	MS-5D	25°C	495.00	374.77	21331.50	2981.87	236.00	80.61	28.00	11.31
		20/15°C	421.00	107.48	21730.00	76.37	202.50	23.33	44.05	7.14
		25/10°C	239.50	37.48	22431.00	1185.11	254.50	57.28	40.50	24.75
	WP-5D	25°C	194.50	99.70	14763.50	4615.29	290.50	37.48	30.00	16.97
		20/15°C	154.00	115.97	15839.50	8255.47	466.55	109.67	17.00	7.07
		25/10°C	375.00	1.41	23119.00	3569.48	220.00	311.13	63.50	16.26
Augi	DK lapas	302.00		2049.00		ND		140.00		
	DK ogas	150.00		7212.00		859.00		61.80		
	BC lapas	166.00		719.00		ND		105.00		

Skābeņskābes augstākā koncentrācija tika noteikta augu lapu ekstraktos – DK lapās tā bija 140 µg/g, un BC lapās - 105 µg/g, bet ogās šis savienojums bija aptuveni divreiz mazāks – 61.798 µg/g. (4.tabula, 11.pielikums) Kallusu kultūru ekstraktos noteiktās koncentrācijas bija tuvas vai mazākas nekā ogu ekstraktā atrastajai.

Dzintarskābe, līdzīgi kā citas pārbaudītās skābes, lielā daļā testējamo paraugu bija ļoti atšķirīgās koncentrācijās atkārtojumu starpā (5.Tabula, 12.pielikums), veidojot lielas standartnovirzes. Pie zemākās 2,4-D koncentrācijas barotnē dzintarskābes koncentrācijai bija tendence pieaugt mainīgos temperatūru apstākļos. Lapu un ogu ekstraktos noteiktās dzintarskābes koncentrācijas bija līdzvērtīgas kallusu ekstraktos esošajām – no 150 µg/g ogās līdz 302 µg/g DK lapās.

Hīnskābe daudz lielākā apmērā tika konstatēta augu lapu ekstraktos, sasniedzot DK lapās 88916 µg/g un BC lapās - 84175 µg/g koncentrācijas (5.tabula, 13.pielikums). Ogu ekstraktā šis savienojums tikai konstatēts 12074 µg/g koncentrācijā. Starp kallusu kultūrām augstākās hīnskābes koncentrācijas bija BC kallusos, kas auguši uz WP pamata barotnes ar zemāko 2,4-D koncentrāciju, savukārt zemākās koncentrācijas bija kallusos, kas audzēti ar augstāko 2,4-D koncentrāciju.

Šikīmskābes koncentrācijas testētajos ekstraktos pārsvarā bija amplitūdā no 29.293 ± 39.817 µg/g (BC MS-2D 25°C) līdz 659 µg/g (DK WP-5D 25°C), ar izņēmumu DK WP-5D 25/10°C kultūrai, kur tas sasniedza 1579 µg/g koncentrāciju (5.tabula,14.pielikums). Pārsvarā katras barotnes ietvaros augstākā šikīmskābes koncentrācija tika atrasta kallusos, kas audzēti kādā no mainīgo temperatūru režīmiem. Ogu ekstraktā šī savienojuma koncentrācija bija 38 µg/g, DK lapu ekstraktā - 80 µg/g, un BC lapām - 117 µg/g.

Hlorogēnskābe izteikti lielākā koncentrācijā tika atrasta augu lapu ekstraktos, DK lapās sasniedzot 16.624 mg/g un BC lapās – 12.399 mg/g koncentrāciju (5.tabula, 15.pielikums). Ogu ekstraktos tā bija aptuveni 2-3 reizes mazāka un sasniedza 5.790 mg/g koncentrāciju, savukārt, kallusu kultūru ekstraktos šis savienojums bija vairāk kā 700 reizes zemāks un nepārsniedza 22.703 ± 34.009 µg/g (DK WC-2D5 20/15°C).

5. tabula.

Ar HPLC-MS noteiktās citronskābes, ābolskābes, glikonskābes un skābeņskābes koncentrācijas ekstraktu paraugos. SN= standartnovirze, ND – netika detektēts, SE- sausais ekstrakts.

Table 5.

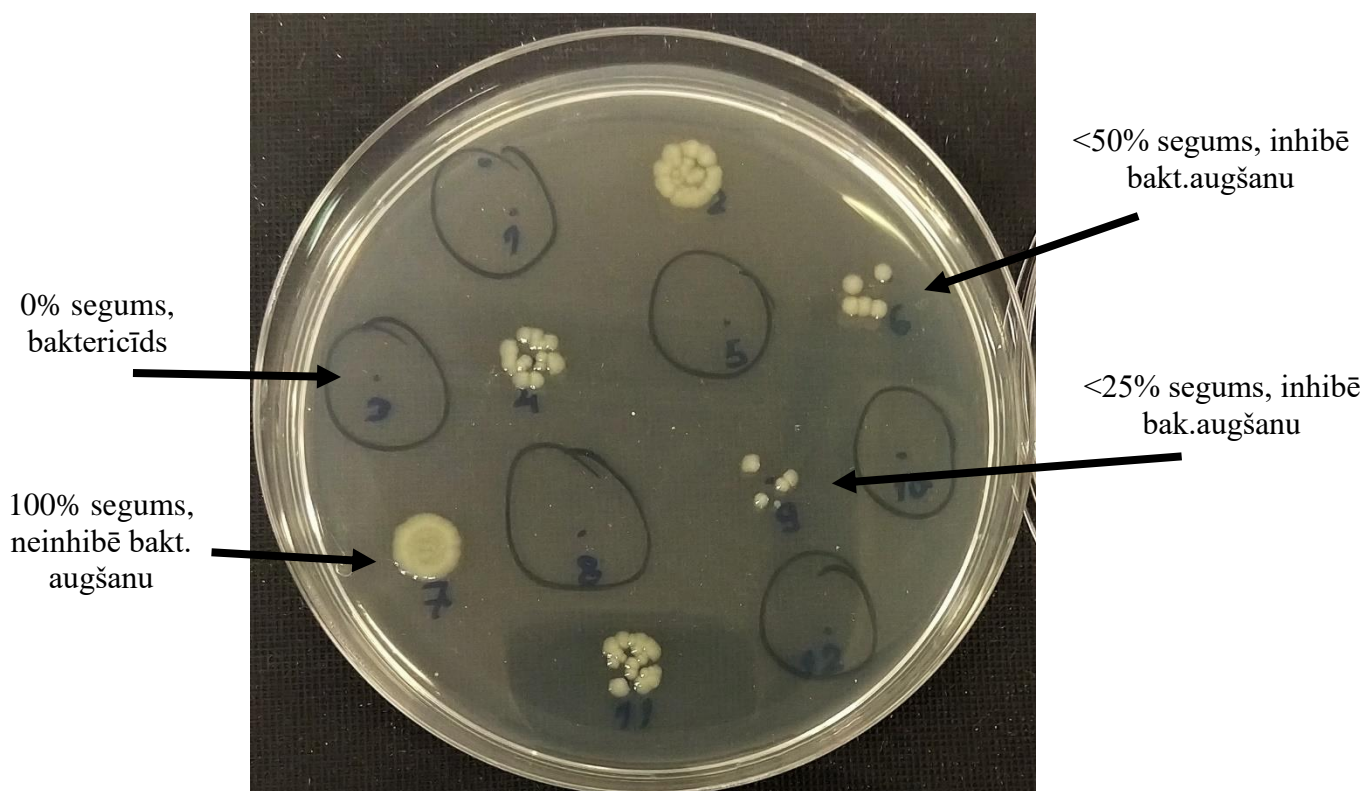
Concentraions of citric, malic, gluconic and oxalic acids in extracts detected using HPLC-MS. SN- standard deviation, ND – not detected, SE – dry extract.

			Dzintarskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Hīnskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Šikīmskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$		Hlorogēnskābe, $\mu\text{g} / \text{g SE}$	
			Vid.	SN	Vid.	SN	Vid.	SN	Vid.	SN
DK kallusi	MS-2D	25°C	124.50	38.89	290.33	78.05	120.46	172.20	18.29	7.57
		20/15°C	168.67	52.55	416.00	312.70	250.16	146.24	10.92	10.57
		25/10°C	486.00	156.62	308.67	28.11	268.57	62.31	8.32	2.46
	WP-2D	25°C	83.33	42.59	428.33	207.69	126.93	189.26	12.24	6.18
		20/15°C	162.67	98.34	626.67	324.00	312.58	257.55	3.33	2.84
		25/10°C	255.33	148.19	1032.33	399.55	508.60	21.81	4.68	1.19
	WP-2D5	25°C	43.00	16.52	203.67	81.75	42.17	34.63	8.03	13.49
		20/15°C	185.00	111.00	865.67	537.09	208.66	53.41	22.70	34.01
		25/10°C	126.00	0.00	212.50	300.52	405.99	254.57	10.49	7.80
	MS-5D	25°C	123.50	174.66	52.00	73.54	601.58	314.55	5.10	5.09
		20/15°C	76.50	108.19	79.00	111.72	600.45	344.44	4.62	0.30
		25/10°C	81.00	114.55	111.75	155.92	416.54	72.78	3.97	3.91
	WP-5D	25°C	ND		ND		659.00		22.00	
		20/15°C	ND		ND		456.00		6.60	
		25/10°C	104.00		213.00		1579.00		6.60	
BC kallusi	MS-2D	25°C	194.50	38.89	472.00	300.71	29.29	39.82	3.79	1.72
		20/15°C	269.67	117.86	508.67	389.98	63.51	15.26	9.37	8.62
		25/10°C	463.00	144.25	293.00	78.73	81.55	20.93	9.20	5.79
	WP-2D	25°C	115.50	60.10	2206.00	1405.58	125.63	99.85	4.26	3.00
		20/15°C	393.00	324.00	1677.67	1296.36	39.01	4.77	5.27	3.79
		25/10°C	427.33	7.64	3842.67	2996.30	198.43	89.14	4.00	3.13
	WP-2D5	25°C	306.00	216.39	2077.67	1624.91	124.36	71.77	3.49	0.48
		20/15°C	363.33	28.71	5143.33	3111.72	78.55	41.21	5.00	3.79
		25/10°C	395.00	69.30	2508.67	3082.48	302.84	315.17	5.43	2.71
	MS-5D	25°C	495.00	374.77	22.50	31.82	200.12	199.57	11.78	1.73
		20/15°C	421.00	107.48	36.40	51.48	458.42	453.38	17.11	10.33
		25/10°C	239.50	37.48	135.50	34.65	66.07	37.67	16.09	3.52
	WP-5D	25°C	194.50	99.70	44.00	62.23	324.67	74.48	11.90	7.08
		20/15°C	154.00	115.97	134.45	91.29	341.50	3.53	13.10	8.34
		25/10°C	375.00	1.41	147.00	50.91	474.11	44.00	8.59	3.27
Augi	DK lapas	302.00		88916.00		80.00		16624.00		
	DK ogas	150.00		12074.00		38.00		5790.00		
	BC lapas	166.00		84175.00		117.00		12399.00		

3.5. Antimikrobiālā aktivitāte

Visiem ekstraktiem tika noteikta antimikrobiālā aktivitāte pret *E.coli* (Gram (-)) un *S.aureus* (Gram (+)), un dažiem ekstraktiem arī pret *C.acnes* (Gram (+)) baktēriju kultūrām. Tika novērtēta mikroorganismu augšana suspensijā pie sešām ekstraktu koncentrācijām 24h laikā. No lauciņiem, kur nebija novērojama baktēriju augšana, 5 μ l suspensijas tika pārnesti uz cieto barotni un inkubēti vēl 24h.

Baktēriju suspensiju inkubēšanas laikā liela daļa ekstraktu lauciņos izveidoja nogulsnes, īpaši pie lielākajām ekstraktu koncentrācijām, kas apgrūtināja baktēriju augšanas novērtēšanu suspensijās 96 lauciņu platēs un minimālās inhibitorās koncentrācijas (MIK) noteikšanu, tādēļ uz agarizētās barotnes tika pārnestas arī suspensijas no neskaidrajiem lauciņiem. Mikroorganismu augšana tika novērtēta pēc subjektīvi izveidotas gradācijas skalas, izvērtējot baktēriju kultūru segumu uznesšanas vietā (piliena robežās, salīdzinot ar pozitīvās kontroles paraugiem – skat. piemēru 10.attēlā)



10. attēls. Baktēriju kultūru augšanas un, attiecīgi, ekstraktu antimikrobiālās aktivitātes novērtēšana pēc baktēriju kultūras seguma uz agarizētās barotnes suspensijas uznesšanas vietā pēc 24h inkubācijas.

Figure 10. Evaluation of bacterial growth and consequently antimicrobial activity of extracts, by the area coverage of bacterial culture on agar medium at the suspension transfer spot after 24h incubation.

Katram ekstraktam bija trīs bioloģiskie atkārtojumi, kas ne vienmēr uzrādīja vienādu aktivitāti pie vienādām koncentrācijām; vairākos gadījumos kāds no atkārtojumiem neuzrādīja nekādu inhibitoru aktivitāti pārbaudītajās koncentrācijās, bet pārējiem tika novērota pat baktericīda ietekme. 6.tabulā apkopoti dati, atkārtojumus apvienojot un veicot atzīmes par to iedarbību – ar zaļu iekrāsoti lauciņi, ja visiem atkārtojumiem bija baktericīda ietekme (atbilst MBK); ar dzeltenu – ja viens no atkārtojumiem neuzrādīja nekādu aktivitāti (pieņemts kā MIK); ar oranžu – ja tikai viens no atkārtojumiem uzrādīja inhibitoru vai baktericīdu iedarbību; ar sarkanu – ja neviens neuzrādīja nekādu aktivitāti. Ekstraktu koncentrācija izteikta kā mg SE /ml (16.pielikums).

Kopumā ekstraktiem pret *E.coli* bija spēcīgāka aktivitāte nekā pret *S.aureus* – vairāk ekstraktu uzrādīja baktericīdu efektu pārbaudītajās koncentrācijās, un MBK bija zemākas. No visiem ekstraktiem baktericīdu efektu pret *E.coli* neuzrādīja tikai četri ekstrakti, savukārt, pret *S.aureus* - astoņi, papildus tam, tikai astoņi ekstrakti šādu aktivitāti uzrādīja; pārējiem tika noteikta tikai MIK. Atbilstošas gala koncentrācijas etanola kontrole pret abām baktēriju kultūrām neuzrādīja nekādu aktivitāti.

Pret *E.coli* zemākās MBK bija lapu ekstraktiem – BC lapu ekstraktiem tā bija 0.600 ± 0.025 mg SE /ml, bet DK lapām – 0.633 ± 0.051 mg SE /ml, kas sakrita ar attiecīgo ekstraktu MIK. No kallusiem mazākā MBK un arī MIK bija BC WP-2D5 25° (attiecīgi, 0.839 ± 0.299 mg SE /ml un 0.419 ± 0.150 mg SE /ml) , savukārt, lielākā MBK bija DK MS-2D 20/15°C - 1.461 ± 0.410 mg SE /ml.

Pret *S.aureus* ekstraktu aktivitāte bija vājāka, bet tāpat kallusu starpā zemākā MBK bija tā pati, kas pret *E.coli*, toties zemākā MIK bija BC WP-2D 25°C – 0.425 ± 0.022 mg SE /ml). Arī lapu ekstrakti bija vājāki pret *S.aureus* – lai arī MIK sakrita ar to pret *E.coli*, MBK bija divreiz lielāka. Ogu ekstrakti pret šo kultūru izrādījās neefektīvi pārbaudītajās koncentrācijās līdz 1.722 ± 0.069 mg SE /ml.

Pēc novērojumiem iepriekšējos testos ar *C.acnes* baktērijām, antimikrobiālās aktivitātes noteikšanai tika izvēlēti tikai pieci kallusu ekstrakti un ogu ekstrakts. Šī baktēriju kultūra bija jutīga pret barotnes atšķaidījumiem un 70%EtOH kontroli, kas inhibēja tās augšanu pie 8.75% gala koncentrācijas un nogalināja pie divreiz lielākas koncentrācijas. Rezultāti tām ekstraktu koncentrācijām, kas atbilda 17.5% EtOH koncentrācijai un uzrādīja baktericīdu efektu, netika ņemti vērā. Pie zemākas EtOH koncentrācijas baktericīdu efektu uzrādīja tikai divi ekstrakti – BC MS-5D, kas audzēti konstantā 25°C un mainīgā 20/15°C temperatūrā; to MBK bija attiecīgi 0.464 ± 0.054 mg SE /ml un 0.558 ± 0.022 mg SE /ml.

Novērojumu apkopojums par ekstraktu antimikrobiālo ietekmi uz *E.coli*, *S.aureus* un *C.acnes* baktērijām. Ar krāsām atzīmētas ekstraktu un 70% EtOH kontroles iedarbības pie attiecīgās koncentrācijas: zaļa – baktericīda (atbilst MBK), dzeltena – spēcīgi inhibitora (MIK), oranža – vāja inhibitora, sarkana – nav aktivitātes.

Table 6.

Summary of observations of antimicrobial activity of extracts on *E.coli*, *S.aureus* and *C.acnes* bacteria. Colors signify the nature of extract and 70% EtOH control effect at the specific concentration: green- bactericide (MBC), yellow – strong inhibitory (MIC), orange – weak inhibitory, red – no effect.

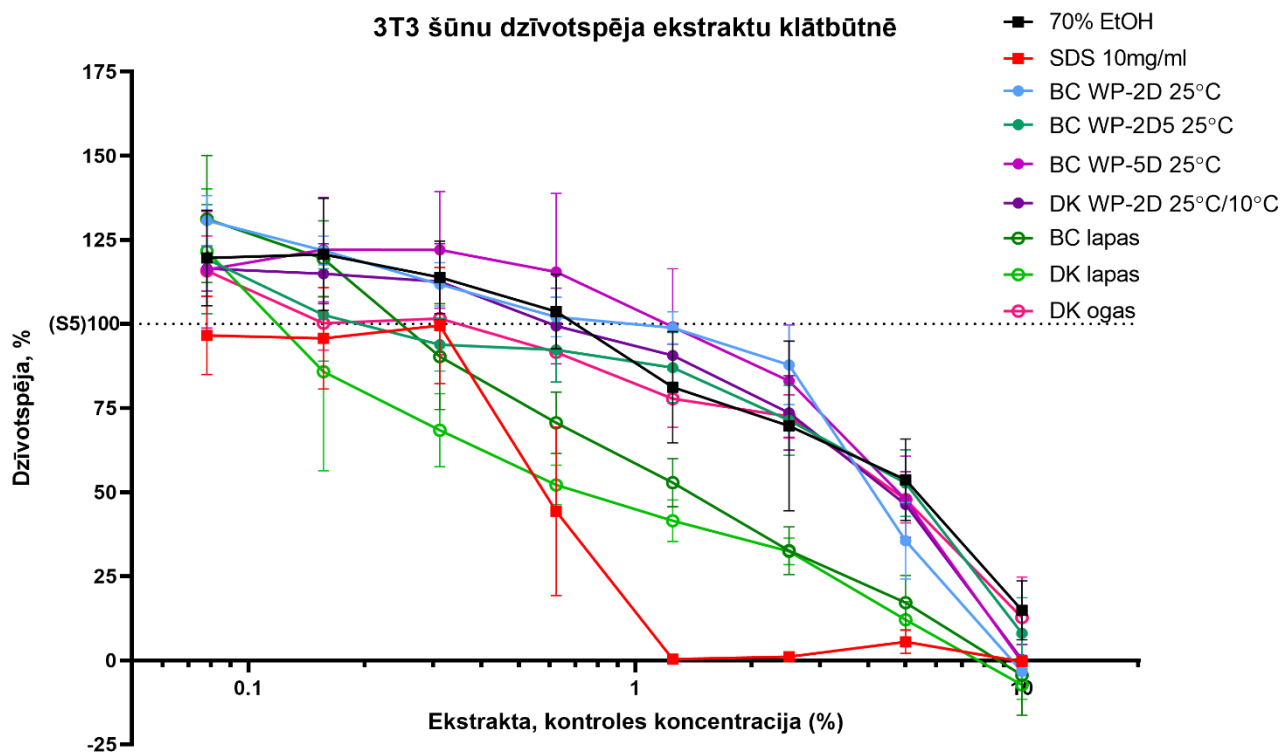
Barotne		Temperatūra	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>C.acne</i>	
Attiecīgā etanola gala konc. %			17.50	8.75	17.50	8.75	8.75	4.38
DK kallusi, µg SE /ml	MS-2D	25°C	1.050	0.525	1.050	0.525		
		20/15°C	1.461	0.731	1.461	0.731		
		25/10°C	1.200	0.600	1.200	0.600		
	WP-2D	25°C	1.333	0.667	1.333	0.667		
		20/15°C	1.083	0.542	1.083	0.542		
		25/10°C	1.172	0.586	1.172	0.586		
	WP-2D5	25°C	0.900	0.450	0.900	0.450		
		20/15°C	1.244	0.622	1.244	0.622		
		25/10°C	1.250	0.625	1.250	0.625		
	MS-5D	25°C	0.967	0.483	0.967	0.483		
		20/15°C	1.239	0.619	1.239	0.619	0.619	0.310
		25/10°C	1.244	0.622	1.244	0.622	0.622	0.311
	WP-5D	25°C	1.156	0.578	1.156	0.578		
		20/15°C	1.250	0.625	1.250	0.625		
		25/10°C	1.317	0.658	1.317	0.658		
BC kallusi, µg SE /ml	MS-2D	25°C	0.944	0.472	0.944	0.472		
		20/15°C	1.128	0.564	1.128	0.564		
		25/10°C	1.211	0.606	1.211	0.606		
	WP-2D	25°C	0.850	0.425	0.850	0.425		
		20/15°C	0.958	0.479	0.958	0.479		
		25/10°C	0.956	0.478	0.956	0.478		
	WP-2D5	25°C	0.839	0.419	0.839	0.419		
		20/15°C	1.289	0.644	1.289	0.644		
		25/10°C	1.044	0.522	1.044	0.522		
	MS-5D	25°C	0.928	0.464	0.928	0.464	0.464	0.232
		20/15°C	1.117	0.558	1.117	0.558	0.558	0.279
		25/10°C	1.100	0.550	1.100	0.550	0.550	0.275
	WP-5D	25°C	1.039	0.519	1.039	0.519		
		20/15°C	1.117	0.558	1.117	0.558		
		25/10°C	1.439	0.719	1.439	0.719		
Augi, µg SE /ml	DK lapas	1.267	0.633	1.267	0.633			
	DK ogas	1.722	0.861	1.722	0.861	0.861	0.431	
	BC lapas	1.200	0.600	1.200	0.600			

3.6. Ekstraktu citotoksicitāte

Pēc kopējo fenolu, kopējo flavonoīdu un DPPH neutralizēšanas testu rezultātu izvērtēšanas tika izvēlēti četri kallusu (DK WP-2D 25/10°C, BC WP-2D 25°C, BC WP-2D5

25°C un BC WP-5D 25°C), kā arī lapu un ogu ekstrakti to citotoksiskās ietekmes uz 3T3 šūnām noteikšanai. Ekstrakti tika testēti astoņās koncentrācijās veidojot seriālos atšķaidījumus sākot no 10% koncentrācijas. Kā kontroles izmantotas barotne (S5), SDS un 70% EtOH. Šūnu dzīvotspēja izteikta procentos, par 100% pieņemot tūrā S5 barotnē augušo šūnu rādītāju.

Kopumā kallusu un ogu ekstrakti uzrādīja līdzīgu ietekmi uz 3T3 šūnu dzīvotspēju visā testētajā koncentrāciju diapazonā, savukārt, lapu ekstraktiem bija spēcīgāka negatīvā ietekme (11.attēls). Pie lielākās ekstraktu koncentrācijas (10%) šūnu dzīvotspēja tuvojās 0% , savukārt pie ļoti mazām koncentrācijām (<0.625%) daļa ekstraktu pat stimulēja šūnu dalīšanos, sasniedzot $130.704 \pm 7.478\%$ (BC WP-2D 25°C). Jāatzīmē gan, ka līdzīgs efekts bija arī tūrā EtOH kontrolei, pie mazākās koncentrācijas sasniedzot $119.614 \pm 14.170\%$ dzīvotspēju. Pie 1.25% un 2.5% koncentrācijas, kallusu ekstraktu ietekmē šūnām bija augstāka dzīvotspēja nekā pie EtOH kontroles tāda pat koncentrācijā, bet šī starpība nebija statistiski būtiska.



11. attēls. 3T3 šūnu dzīvotspējas testēto ekstraktu un kontroļu klātbūtnē grafiks.

Figure 11. Graph of 3T3 cell viability in the presence of tested extracts and controls.

Iegūtie dati tika apstrādāti ar *GraphPad Prism* programmu, un ekstraktiem un kontrolēm noteiktas $IK_{50\%}$ vērtības pēc nelineārās regresijas analīzes (*“Absolute IC50, X is*

concentration”) veikšanas. Zemākā IK50 vērtība bija DK lapu ekstraktam (0.933%, atbilda 0.047 mg SE/ml), bet augstākā – DK ogām (4.573%, 0.315 mg SE/ml) (7. tabula). Kallusu ekstraktiem IK50 vērtības bija robežās no 4.298% līdz 5.007% (0.146 – 0.212 mg SE/ml), bet EtOH – 4.778%.

7. tabula.

GraphPad Prism programmā izrēķinātās ekstraktu citotoksicitātes IK50 vērtības % un pēc tam izteiktas mg SE/ml.

Table 7.

IC50 values of extract cytotoxicity in % calculated by *GraphPad Prism* software and expressed in mg SE/ml afterwards.

Ekstrakts	IK50 %	IK50 mg SE /ml
DK WP-2D 25/10°C	4.520	0.212
BC WP-2D 25°C	4.298	0.146
BC WP-2D5 25°C	5.007	0.168
BC WP-5D 25°C	4.794	0.199
DK lapas	0.933	0.047
DK ogas	4.573	0.315
BC lapas	1.436	0.069
EtOH	4.778	

4. DISKUSIJA

Šobrīd literatūrā ir ļoti maz salīdzinošu pētījumu par vides apstākļu ietekmi uz *Vaccinium corymbosum* kallusu kultūru bioloģisko aktivitāti, kas apgrūtina iegūto datu salīdzināšanu un interpretāciju. Galvenokārt, noziņotie pētījumi par *V.corymbosum in vitro* kultūrām saistāmi ar kallusu iegūšanu (piem., Tetsumura *et al*, 2008), dzinumu reģenerāciju no eksplantiem un to mikropavairošanu (piem., Vescan *et al*, 2012). Dažos pētījumos noziņoti arī novērojumi par kallusu fizikālajiem parametriem atkarībā no barotnes (Dembinska-Migas *et al*, 1998) un ķīmisko sastāvu (Migas Cisowski & Dembinska-Migas, 2005), bet vairāk šādi pētīti tiek veselie augi un to daļas – ogas un lapas (piem., Prior *et al*, 1998, Inostroza-Blancheteau *et al*, 2011). Arī optimālās temperatūras izpēte veikta tikai augiem lauka apstākļos (Zheng *et al*, 2017; Hao *et al*, 2019).

4.1. Krūmmelleņu kallusu morfoloģijas un biomasas pieauguma atkarība no barotnes un vides temperatūras.

Salīdzinot izmantotās MS (Murashige & Skoog, 1962) un WP (Lloyd & McCown, 1980 pēc Tetsumura *et al*, 2008) pamata barotnes, redzamas vairākas atšķirības to kompozīcijā, no kurām svarīgi liekas izcelt kobalta un joda jonu klātbūtni, lielāku amonija un kālija jonu un mazāku tiamīna HCl koncentrāciju MS barotnē. Šī pētījuma gaitā lielākie biomasas pieaugumi tika novēroti pie augstākām temperatūrām (25°C un 25/10°C) uz MS barotnēm augšajiem kallusiem. Tas lielā mērā sakrīt ar Tetsumura *et al* (2008) *in vitro* jauno dzinumu eksperimentos novēroto, kur BC šķirnei ievērojami labāku jauno dzinumu vitalitāti konstatēja uz MS barotnes salīdzinot ar WP. Interesanti, ka citām salīdzinātajām šķirnēm uz MS bija zemāks izdzīvojušo dzinumu skaits, kas šķietami norāda uz BC un, pēc šī pētījuma rezultātiem spriežot, arī DK šķirņu specifiku. Tāpat, ar šo barotni visām šķirnēm sanāca iegūt arī lielākos hiperhidratēto (vitrificēto) dzinumu skaitus salīdzinot ar citām barotnēm, kas varētu norādīt uz hiperhidratācijas tendenci arī mūsu laboratorijā uz šīs pamatbarotnes audzētajos BC kallusos, kam bija lielākais ūdens saturs un ļoti irdena struktūra. Tam kā iemesls var būt tieši MS barotnē esošā kālija un pārākā amonija jonu koncentrācija, kas izmaina šūnu osmolaritāti, kā rezultātā tās uzņem vairāk ūdeni (Paques, 1991). Jāpiebilst, ka šīm kultūrām pie ilgākiem kultivēšanas laikiem bija ievērojamas plaisas barotnē zem kallusiem, indicējot par resursu izsīkumu.

Salīdzinot ūdens saturu svaigajos BC kallusos ar Dembinska-Migas *et al* (1998) novēroto uz Schenk & Hildebrandt barotnes ar dažādu augšanas faktoru piedevām, ūdens daudzuma amplitūda bija līdzīga, robežās 89.2 – 98.2%. Lielākais biomasas pieaugums tika novērots pie

0.5mg/l 2,4-D un 0.2mg/l zeafīna piedevas, bet par hiperhidratācijas pazīmēm netika ziņots. Hiperhidratācija tiek saistīta ar šūnas metabolisma traucējumiem – šūnu sienīņu bojājumiem un fenolu sintēzes inhibīciju (Ziv, 1991). Vairākās sugās palielināta augu kallusu biomasu novērota pie augstākām augsniņu koncentrācijām, kas sakrīt ar šajā darbā novēroto – mazāku biomasu pieaugumu pie zemākas 2,4-D koncentrācijas barotnē (Leshem, Werker & Shalev, 1988; Dipti *et al*, 2015). Apvienojot šos faktoros, būtu iespējams izskaidrot lielākus biomasu pieaugumus, bet mazākās kopējo fenolu un kopējo antocianīnu koncentrācijas pie MS barotnes un lielākas 2,4-D koncentrācijas, jo limitētās fotosintēzes laikā saražotie cukuri tiek vairāk novirzīti biomasas veidošanai, nevis sekundāro metabolītu ceļā.

Mazāko biomasu pieaugumu pie 20/15°C temperatūras iespējams skaidrot ar zemāku temperatūru negatīvo ietekmi uz fotosintēzes aktivitāti krūmmelleņu kallusos, kas pieaugušiem krūmmelleņu augiem tika novērota eksperimentālos lauka apstākļos (Petridis *et al*, 2018). Līdzīgā pētījumā ar krūmmellenēm tuvu radniecīgu sugu lielo dzērveni *V.macrocarpon*, kallusu audzēšanai piemērotāka izrādījās modificēta WP barotne, bet pie konstantas zemas temperatūras (15°C) kallusi neauga, savukārt, piemērotākais barotnes pH bija 7.0 (Zhou & Singh, 2007), kas ir pārsteidzoši skābo augšņu augam.

Kā viens no augu aukstumcietības mehānismiem tiek minēts šķīstošo cukuru uzkrāšana dažādās auga daļās. Petridis *et al* (2018) novēroja, ka pētījumā izmantotie krūmmelleņu augi neveido ievērojamas cietes rezerves augļu attīstības laikā, bet fotosintēzes produktus novada uz auga daļām šķīstošo cukuru veidā, līdz ar to būtu interesanti salīdzināt arī šo cukuru saturu kallusu kultūrās dažādajās temperatūrās, lai noskaidrotu kā šis princips attiecināms uz nediferencētām šūnām – cik lielā mērā veidojas cietes uzkrājums un cik tiek saglabāta šķīstošā cukuru forma. Interesanti arī, ka, samazinoties vides temperatūrai, fotosintēzes piesātinājums tika sasniegts pie zemāka apgaismojuma līmeņa, bet, pievadot papildus CO₂ un paaugstinot gaismas intensitāti, iespējams panākt augstāku oglekļa asimilācijas koeficientu (Petridis *et al*, 2018), kas, iespējams, varētu vismaz daļēji atspēkot zemās temperatūras ietekmi un veicināt cukuru sintēzi un, attiecīgi, primāro un sekundāro metabolītu pieaugumu. Tāpat, būtu interesanti novērot kallusu biomasu un polifenolu koncentrāciju pieaugumu un profila izmaiņas atkarībā no fotoperioda garuma – līdzīgos pētījumos ar citu sugu kallusiem, tie tiek uzturēti konstantā apgaismojumā vai tumsā.

4.2. Antioksidatīvās aktivitātes atkarība no sekundāro metabolītu daudzuma.

Sagatavotajiem ekstraktiem tika konstatēta spēcīga pozitīva korelācija starp kopējo fenolu un kopējo flavonoīdu daudzumu, un antioksidatīvo aktivitāti, bet vidēji vāja negatīva sakarība ar sākotnējo augsīnu koncentrāciju barotnē. Visvairāk kopējo fenolu tika noteikts augu lapās un WP bāzes kallusos ar zemāko 2,4-D koncentrāciju. Tā kā katrā no šiem testiem tiek izmantotas dažādas standartvielas, nav iespējams izteikt un salīdzināt dažādo fenolu savienojumu grupu daļu no kopējiem fenoliem, kas būtu vērtīga informācija un ļautu spriest par resursu pārdali sekundāro metabolītu ceļā.

Fenolskābes. Šajā darbā ar HPLC-MS metodi tika noteiktas hlorogēnskābes koncentrācija paraugos - lapās 12 - 16 mg/g sausā iesvara, ogās 5 mg/g iesvara, bet kallusos tikai 2 μg/g iesvara. Literatūrā hlorogēnskābe tiek minēta kā galvenā krūmmelleņu ogās esošā fenolskābe un tās koncentrācija dažādu šķirņu ogās noteikta robežās no 24 – 65 mg/100 g svaigās masas (Gavrilova et al, 2011; Može et al, 2011; Yousef et al, 2013; Costa, Almeida & Pintado, 2018). Diemžēl trūkst datu par šīs skābes daudzumu lapās un kallusu kultūrās, līdz ar to nav iespējams salīdzināt iegūtos rezultātus. Hlorogēnskābe augos tiek izmantota aizsardzībai pret dažādiem augēdājiem insektiem (Kundu & Vadassery, 2018), kas augiem lauka apstākļos ir ļoti nepieciešams un, acīmredzot, tiek uzkrāta dažādās auga daļās. Par samazinātu hlorogēnskābes koncentrāciju citu sugu kallusos salīdzinājumā ar sākotnējā auga lapām ziņojuši arī Wang et al (2003) un Trajtemberg, Apostolo & Fernandez (2006), savukārt, Stickland & Sunderland (1972) ievēroja paaugstinātas 2,4-D koncentrācijas negatīvo ietekmi uz hlorogēnskābes daudzumu, lai arī nevienā no iepriekšminētajiem pētījumiem šīs atšķirības nebija tik lielas, kā šajā maģistra darbā konstatētās. No šī var spriest, ka hlorogēnskābes sintēzi un uzkrāšanu ietekmē gan suga, gan audu veids (diferencēti vai nediferencēti), gan arī 2,4-D koncentrācija barotnē. Vēl viens faktors varētu būt hlorogēnskābes iespējama tālāka izmantošana lignīnu sintēzē šūnās (Volpi e Silva, Mazzafera & Cesarino, 2019), kas varētu izskaidrot kallusu cietību salīdzinot ar ogām un lapām, un kuru daudzumu noteikšana palīdzētu izgaismot resursu pārdali sekundāro metabolītu sintēzē.

Flavonoīdi. Flavonoīdu noteikšanai iespējams izmantot vairākas kolorimetriskās metodes, no kurām populārākās ir AlCl₃ un NaNO₂, bet katra no tām ir specifiskāka kādai no flavonoīdu apakšgrupām, tādēļ iegūtie rezultāti būtu jāuztver kritiski (Pekal & Pyrzynska, 2014; Huang et al 2018). Tāpat šīs metodes paredzētas liela tilpuma reakcijām (10ml), kas nav racionāli pie liela paraugu skaita, tādēļ nepieciešams tās pārnest uz mikroplātēm. Mēģinājumi laboratorijā to darīt ar iepriekš pieminētajām metodēm bija nesekmīgi, tādēļ tika meklēti citi

varianti. Izvēlētā Deivisa metode ir specifiskāka flavanoniem, bet uzrādīja pietiekami augstu sakritību ar HPLC iegūtajiem datiem par visiem pārbaudītajiem savienojumu standartiem (Huang et al, 2018), un izrādījās viegli pārnesama uz mikroplatēm.

Visvairāk kopējo flavonoīdu noteikts augu lapās un WP bāzes kallusos ar zemāko 2,4-D koncentrāciju, kas sasaucas ar kopējo fenolu saturu. Diemžēl, arī šajā sadaļā trūkst literatūras ar ko salīdzināt, jo ir maz pētījumu ar krūmmelleņu kallusu kultūrām. Augu daļu ekstraktu analīzei pārsvarā izmanto hromatogrāfijas metodes, un kolorimetrisko metožu ziņā Deivisa metode nav izplatīta. Vadoties pēc rutīna ekvivalentiem, salīdzinot datus ar Wu et al (2019), lapu kopējo flavonoīdu rezultāti ir atšķirīgi: BC 96.6 un DK 56.3 mg RE uz g sausā iesvara pret šajā darbā uzrādītajiem BC 41.7 un DK 53.4 mg RE uz g sausā iesvara (rezultāti pietuvināti pārrēķināti uz atbilstošām mērvienībām, ņemot vērā sausā iesvara un sausā ekstrakta masu attiecību). Šādas atšķirības iespējams skaidrot ar augu dzīvotnes lokāciju (DA Ķīna un Latvija), attiecīgo klimatu un šķirņu piemērotību tam, kā arī, protams, ar izmantoto metožu dažādajiem principiem.

Veicot HPLC-MS datu analīzi, tika konstatētas vairākas izteiktas joslas lapu, ogu un BC un DK WP-2D kallusu hromatogrammās, Viena no tām, balstoties uz literatūru (LIPID MAPS® Classification System; Veberic et al, 2015) un eksperimentāli iegūtajiem datiem (molekulārais jons m/z 465 8.40min, fragmentjons m/z 303), norāda uz delfinidīna – 3 – galaktozīdu vai - glikozīdu, kas, ietilpst flavanoīdu antociānīnu apakšgrupā. Standartu neesamības dēļ nevarēja veikt absolūto kvantifikāciju, bet izmantojot hlorogēnskābes kalibrācijas līkni, tika konstatēts, ka lielākā koncentrācijā šis savienojums bija lapās līdzīgos daudzumos abās šķirnēs (ogās 2x mazāk, kallusos 8-10x mazāk). Šis novērojums sakrīt ar Kader et al (1995), Rodriguez-Mateos et al (2012), Veberic et al (2015) ziņotajiem pētījumu rezultātiem par delfinidīnu kā vienu no dominējošajiem antociānīdiem krūmmelleņu ogās. Yousef et al (2013) pētījumā par 10 augsto krūmmelleņu šķirnēm konstatēja, ka antociānīdu profili ļoti variē atkarībā no genotipa, bet vairākumā ir malvidīna un delfinidīna bāzes antociānu.

Attiecībā uz lapu ekstraktiem šī darba dati nesakrīt ar Wang et al (2015), kur cianidīns bija vienīgais detektētais antociānīds. Svarīgi atzīmēt, ka Wang et al (2015) pētījums veikts ar sarkanām lapām no 3 radniecīgo krūmmelleņu sugu 104 šķirnēm, bet šajā maģistra darbā ekstrakti taisīti no zaļām lapām, kas varētu būt galvenais iemesls šai nesakritībai – Riihinen et al (2007) savā pētījumā noteica antociānu un proantociānīdu daudzumus un profilus dažādās augu daļās, tajā skaitā izdalot zaļās un sarkanās lapas, un antociānīnus konstatēja tikai zemā koncentrācijā sarkanās lapās (cianidīna glikozīdus), bet abu krāsu lapās - lielā daudzumā

proantocianidīnus, turklāt prodelfinidīnu lielākā daudzumā nekā procianidīnu. Iespējams, ka arī šķirnes genotipam ir liela nozīmē lapu ķīmiskajā saturā, kā tas ir ogu gadījumā.

Divas no hromatogrammā izteiktākajām joslām tika identificētas kā katehīns un epikatehīns (abām m/z 291, viena pie 7.90 min un otra - 8.08 min – bez standartiem nevar precīzi noteikt kura ir kura), kas pieder flavonoīdu flavan-3-olu apakšklasei. Izmantojot hlorogēnskābes kalibrācijas līkni, tika konstatēts, ka kallusos šo savienojumu ir aptuveni 10x vairāk nekā ogās aptuvenās 1:1 attiecībās. Lapās šo savienojumu ir vidēji 40-70x mazāk nekā kallusos, turklāt attiecībās 7:1. Ogās šī attiecība ir 2:1. Šādas atšķirības atkal liecina par resursu pārdali flavonoīdu sintēzes ceļā salīdzinot ar īsto augu. Tā kā katehīna un epikatehīna prekursori ir antocianidīni, tad tas, iespējams, varētu skaidrot arī iepriekš pieminētā delfinidīn-3-galaktozīda /-glikozīda zemo koncentrāciju kallusos salīdzinot ar lapām un ogām. Visvairāk šie flavan-3-oli bija konstantā temperatūrā audzētos kallusos, bet tā kā pārējām kallusu kultūrām šīs analīze vēl netika veikta, tad nevar spriest par barotnes ietekmi uz šo savienojumu daudzumu un attiecību.

Tā kā Millera-Hintona barotne, kas tika izmantota *S.aureus* un *E.coli* baktēriju kultūrās, satur liellopu serumu, un daļā ekstraktu tika noteikta arī katehīna un epikatehīna klātbūtne, tad ļoti ticams, ka par nogulšņu veidošanos mikroplašu baktēriju kultūrās antimikrobiālās aktivitātes testa laikā bija atbildīgi šo flavan-3-olu polimēri – tannīni, kas saistās ar proteīniem un tos precipitē (Aziz, Diab & Mohammed, 2018).

Salīdzinot ar citām sugām, ābeļu kallusu kultūrās lielākais biomasas pieaugums bija tumsā pie optimālas temperatūras (24°), bet augstākais antocianīnu daudzums – pie zemākas temperatūras (16°C) konstantā apgaismojumā salīdzinot ar konstantas tumsas kultūrām (Wang et al, 2016), turpretī, mellei radniecīgajai lielogu dzēvenei lielāku antociānu daudzumu izdevās iegūt pēc 48h inkubācijas sarkanajā gaismā, pie vides temperatūras nomaiņas garākā periodā (3 nedēļas 25°C, tad 1 nedēļa 15°C) un pH 6.5 visus eksperimentus veicot pie konstanta apgaismojuma (eksperimentus veicot uz iepriekš tumsā uzglabātām kultūrām) (Zhou & Singh, 2007), kas norāda uz zemās temperatūras, paaugstināta pH un sarkanās gaismas stimulējošo ietekmi uz antocianīnu sintēzi kallusos. Ņemot vērā, ka krūmmellenes augiem piemērota skāba augsne (pH 4.2-5.5), iespējams, ka standartizēti izmatotais paaugstinātais barotņu pH 5.8 arī pozitīvi ietekmējis fenolu savienojumu sintēzi salīdzinot ar izmēģināto barotni ar zemāko pH 4.8.

Kopumā skatoties un salīdzinot iegūtos rezultātus pa komponentēm, var secināt, ka trūkst vēl ļoti daudz informācijas par atsevišķo fenolsavienojumu apakšgrupu savstarpējām daudzumu

attiecībām un to īpatsvaru kopējā antioksidatīvajā aktivitātē, galvenokārt atšķirīgo noteikšanas metožu dēļ.

Redzot kallusu kopējo antioksidatīvās aktivitātes līmeni, var uzskatīt, ka tie ir labs antioksidantu avots, bet ir perspektīva šo rādītāju vēl palielināt līdz ar biomasas pieauguma paātrināšanu. Papildus izmaiņām barotnes sastāvā, gaismas un temperatūras režīmā, viens no optimizācijas virzieniem būtu kultūru audzēšana suspensijās, lai notiktu pilnvērtīgāka barotnes resursu izmantošana, un CO₂ koncentrācijas palielināšana.

4.3. Organisko skābju profili.

Lapu, ogu un kallusu ekstraktos tika noteiktas vairākas organiskās skābes. To savstarpējā saistība augu metabolismā redzama 12.attēlā.

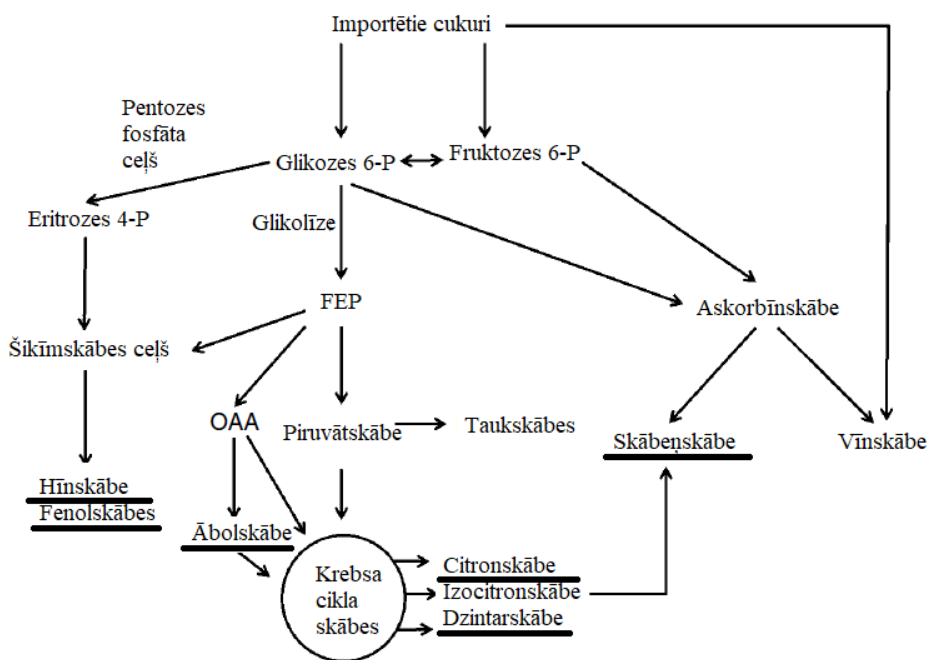
Lapās izteiktā pārākumā bija hīnskābe, (DK > BC), citronskābe (DK < BC) un ābolskābe. Ogās dominēja šis pats skābju trio, bet citronskābe bija galvenā, kam sekoja hīnskābe un tad ābolskābe. Tas daļēji sakrīt ar Ehlenfeld, Meredith & Ballington (1994) novērojumu, kur bija mazāk ābolskābes, bet vairāk dzintarskābes. Citronskābe, ābolskābe un dzintarskābe ir iesaistītas aminoskābju sintēzē un Krebsa ciklā, kur var tikt uzkrātas kā fiksētā oglekļa rezerves auga redoks reakcijām enerģijas regulācijai. Atkarībā no reakciju ātruma, šīs rezerves variē (Igamberdien & Epritsev, 2016).

Skābeņskābe var uzkrāties šķīstošā formā vai kā kalcija sāls, veidojot kalcija rezerves. Tā aktīvi saista dažādu metālu jonus tā gan kavējot to toksisko iedarbību, gan ierobežot to pieejamību metabolisma ceļos. Lielos daudzumos tā ir kaitīga veselībai (Makkar, Siddhuruju & Becker, 2007; Walker & Famiani, 2018), tādēļ svarīgi šīs skābes daudzumu ierobežot, ja plānots produktu izmantot uzturā. Šajā darbā iegūtajās kallusu kultūrās tā ir līdzīgā daudzumā kā gatavā ogā, kas ļauj spriest, ka šī skābe nav šķērslis kallusu izmantošanai pārtikā.

Hīnskābe augos tiek uzkrāta vakuolās kā rezerve fenolo savienojumu sintēzei atgriežoties šikīmskābes ceļā vai hlorogēnskābes sintēzē (Walker & Famiani, 2018). Krūmmelleņu ogās nobriešanas laikā tās koncentrācija samazinās (Forney et al, 2012), iespējams, iesaistoties šikīmskābes ceļā, kur tā ir fenilalanīna prekursors, kas tālāk piedalās fenolo savienojumu un augsīna feniletīnskābes sintēzē (Walker & Famiani, 2018; Cook et al, 2016). Tas varētu būt skaidrojums lielajai variācijai tās koncentrācijā dažādajos auga audos, atkarībā no to vajadzības šo skābi izmantot kā resursu kādam no tālākajiem procesiem.

Glikonskābei ir plašas pielietošanas iespējas. Tā veidojas glikozei dehidrogenējoties un augļiem dod svaigi skābenu garšu, un nav toksiska. Nātrija glikonātam sārmainā vidē tiek

pieņemtas labas metālu helatēšanas spējas, kas ir viens no antioksidatīvās aktivitātes parametriem, un uzturā var tik izmantots kalcijs un dzelzs trūkuma ārstēšanai. Ūdens vidē tas inhibē oksidēšanās un reducēšanās procesus augstā temperatūrā, un koncentrētā veidā ir antiseptisks (Ramachandran et al, 2006). Šis varētu būt viens no savienojumiem, kas veicina kallusu kopējo antioksidatīvo aktivitāti, un metālu helatēšanas spēju dēļ kopumā padara tos vērtīgākus pielietojumam uzturā un dažādos kosmētikas produktos.



12. attēls. Vienkāršota metabolismā iesaistīto organisko skābju saistības shēma; FEP – fosfoenolpiruvāts, OAA – oksaloetiķskābe (ar izmaiņām no Walker & Famiani, 2018).

Figure 12. Simplified scheme of relations of organic acids involved in plant metabolism; FEP – Phosphoenolpyruvate, OAA – oxaloacetic acid (with changes from Walker & Famiani, 2018).

Kopumā paskatoties, ar organisko skābju profilu ļoti izceļas DK WC-5D 25 °C un 20/15°C kultūras – tām nav ne citronskābes, ne ābolskābes, ne dzintarskābes, ne glikonskābes, kas norāda uz to zemo enerģijas bilanci un, vadoties pēc pārējo kallusu spējas dehidrogenizēt glikozi, tās neesamību šūnās, un varētu skaidrot arī kallusu biomasas neveidošanos, jo nenotiek fotosintēze. Relatīvi augstais šikīnskābes un hlorogēnskābes līmenis varētu būt uzkrājums no kallusu iepriekšējās paaudzes, kas saglabājies kallusa pārlikšanas brīdī.

4.4. Krūmmelleņu ekstraktu ietekme uz *E.coli* un *S.aureus* baktēriju kultūrām.

Pieaugot baktēriju rezistencei pret antibiotikām ir nepieciešams meklēt jaunus savienojumus un līdzekļus baktēriju infekciju apkarošanai. Līdz ar sabiedrībā novērojamo tieksmi uz 'zaļāku' dzīvesveidu, pieaug pieprasījums pēc dabiskiem augu izcelsmes līdzekļiem. Literatūrā atrodami vairāki pētījumi par dažādu augu ekstraktu antimikrobiālo aktivitāti pret pārtiku kontaminējošām kultūrām (Salaheen et al, 2014; Mostafa et al, 2018; apkopots Tako et al 2020) un nozokomiālu infekciju izraisītājiem (Silva et al, 2015) un citām baktēriju kultūrām.

Šajā pētījumā tika noteikts, ka krūmmelleņu lapu ekstraktiem bija spēcīgāka antimikrobiāla iedarbība pret Gram(-) *E.coli*, salīdzinot gan ar ogu, gan kallusu kultūru ekstraktiem. Kallusu starpā MBK variēja starp 0.85-1.46 mg SE /ml, un visas sakrita ar 17.5% šķidrā ekstrakta gala koncentrāciju, kas apgrūtina objektīvu salīdzinājumu. Būtu bijis vajadzīgs pārrēķināt un novienādot sausā ekstrakta sausnes īpatsvaru visiem ekstraktiem, lai dati būtu salīdzināmi pie mg SE/ ml mērvienībām.

Pret Gram(+) *S.aureus* aktivitāti uzrādīja tikai daži ekstrakti, turklāt, interesanti, ka to starpā nebija tie, kas inhibitoru aktivitāti uzrādīja pret otru Gram(+) baktēriju kultūru - *C.acnes*. Nekādas acīmredzamas sakarības ar citiem noteiktajiem parametriem – kopējo fenolu, vai flavonoīdu saturu vai antiradikālo aktivitāti -, nebija iespējams noteikt.

Kopumā literatūrā atrodami pretrunīgi pētījumi par augu ekstraktu antimikrobiālo ietekmi, kas parasti tiek saistīta ar fenolu savienojumiem- flavonoīdiem, antociāniem, fenolskābēm. Werlen et al (2005) savā pētījumā pārbaudīja vairāku fenoliem bagātu ogu ekstraktu un attīrītu antociānu kombinācijas (cianidīna un delfinidīna bāzes) ietekmi uz vairākām mikroorganismu sugām, un konstatēja atšķirīgu ekstraktu un kombinācijas iedarbības efektivitāti uz dažādām mikroorganismu sugām, ar dažbrīd pretrunīgiem datiem. Arī Silva et al (2016) savā pētījumā ar attīrītu krūmmelleņu ekstraktu (galvenokārt malvidīna, delfinidīna, cianidīna atvasinājumi) dažās baktēriju kultūrās novēroja pretrunīgas aktivitātes – augšanas inhibīciju pie zemākām ekstrakta koncentrācijām un augšanas stimulēšanu pie augstām. Zhou et al (2020) pētīja krūmmelleņu ogu ekstrakta antociānu ietekmi uz zarnu mikrobiomu, un konstatēja tā pozitīvo ietekmi kopumā – dažu sugu augšanas inhibīciju, un citu sugu augšanas veicināšanu, kas liecina par augu ekstraktu selektīvu aktivitāti. Pervin, Hasnat & Lim (2013) pētījumā noteica krūmmelleņu lapu ekstraktu inhibitoro aktivitāti uz piecām Gram(-) un divām Gram(+) baktēriju kultūrām un spēcīgāku ietekmi kopumā konstatēja pret Gram(-) baktērijām. Puupponen-Pimia et al (2001) pārbaudot atsevišķu tīru fenolsavienojumu šķīdumus un dažādu ogu ekstraktu ietekmi uz vairākām baktēriju kultūrām vislielāko jutību novēroja *E.coli* CM871

celmam, kas bija arī vienīgais, kura augšana tika inhibēta tīro fenolsavienojumu klātbūtnē, izņemot miricetīnu, kas tāpat kā ogu ekstrakti spēja inhibēt vairākas baktēriju kultūras. Tas kopā vedina domāt, ka augu ekstraktu antibakteriālā aktivitāte nav tik ļoti atkarīga no fenolajiem savienojumiem, bet gan no vairāku sastāva komponentu sinerģijas. Ekstraktā organiskās skābes apvienojot tās ir ievērojami lielākā koncentrācijā un lielai daļai no tām atsevišķi ir konstatēta antimikrobiāla aktivitāte (apkopots Coban, 2019; Nieto-Penalver et al, 2014).

4.5. Krūmmellenes ekstraktu citotoksiskā aktivitāte zīdītāju šūnās.

Citotoksicitātes noteikšana ir svarīgs posms vielu un produktu izpētē, ja tos plānots izmantot dzīvjiem organismiem. Tā ir metode, kuras laikā tiek noteiktas šūnām nekaitīgās vielas koncentrācijas *in vitro*, ko pēc tam var izmantot tālākā pētniecībā citu bioloģisko aktivitāšu noteikšanai relevantās devās.

Šajā pētījumā izvērtējot četru kallusu kultūru, augu lapu un ogu ekstraktus, tika noskaidrots, ka lapu ekstraktiem piemīt ievērojami lielāka citotoksiskā aktivitāte nekā tīram ekstraktu šķīdinātājam 70% EtOH vienādās koncentrācijās. Tā kā šis tests netika veikts visiem kallusu ekstraktiem, tad nevar spriest vai šis efekts ir unikāls lapās esošajiem savienojumiem vai tikai nepiemīt pārējiem izvēlētajiem un notestētajiem kallusu ekstraktiem. Ņemot vērā, ka kallusu antioksidatīvā aktivitāte un kopējais fenolu daudzums bija tuvāks lapu ekstraktiem, liekas pārsteidzoši, ka ietekme uz zīdītāju šūnu dzīvotspēju ir līdzīgāka ogu ekstraktam, jo antioksidantu ietekmē tika gaidīta augstāka dzīvotspēja salīdzinot ar 70% EtOH. Šajā darbā iegūtais rezultāts arī nesakrīt ar iepriekš publicētiem augu ekstraktu citotoksicitātes pētījumiem, kuros parādās ekstraktu duāla daba – pret vēžu šūnu kultūrām tie ir ievērojami toksiskāki nekā pret normālām veselām šūnu kultūrām (fibroblastiem, keratinocītiem, endotēlija šūnām). Atsevišķos gadījumos ir novērots, ka tie ir pat šūnu proliferāciju un migrāciju veicinoši, turklāt, tas novērots vairākām attāli radniecīgām augu sugām un daļām (Massarotto et al, 2016; Ankola et al, 2020; Zaklos-Szyda & Budryn, 2020), kas liek domāt, ka darbības princips ir līdzīgs un nevarētu būt atkarīgs no kādai sugai specifiskas ekstrakta komponentes. Atkārtojot šādu eksperimentu ar vairākām šūnu līnijām vajadzētu arī iekoncentrēt ekstraktu, lai mazinātu šķīdinātāja ietekmi uz rezultātiem.

4.6. Iespējamie virzieni turpmākajam darbam

Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka *V.corymbosum* kallusu kultūras ir piemērotas dažādām manipulācijām ar mērķi iegūt augstāku sekundāro metabolītu līmeni. To sastāvs un bioloģiskā aktivitāte norāda uz iespējām tās izmantot gan kā antioksidantu piesātinātu uztura bagātinātāju un kosmētisko līdzekļu komponenti, gan kā antimikrobiālu līdzekli.

Zinot, ka augos esošo savienojumu antioksidatīvā darbība ir saistīta ne tikai ar brīvo radikāļu neitralizēšanu, bet arī ar dažādu oksidatīvā stresa veicinošu faktoru inhibēšanu, būtu vērtīgi noteikt arī ekstraktu metālu jonu piesaistīšanas spēju un fotoprotektīvās īpašības uz šūnu kultūrām *in vitro*.

Balstoties uz literatūrā atrodamo informāciju (t.sk., tās trūkumu dažās jomās), tālākos pētījumos noteikti būtu vērts turpināt ar apkārtējās vides un barotņu sastāva dažādošanu un to ietekmes novērtēšanu. Ir ļoti daudz maināmu faktoru, ar kuru palīdzību varētu iegūt vēl augstākas labvēlīgās bioloģiskās aktivitātes – gaismas daudzums un spektrs (tajā skatā UV), divu fāzu barotņu izmantošana, pH līmenis barotnēs un citi. Īpaši interesanti šķiet pētījumi ar paaugstinātu CO₂ koncentrāciju.

5. SECINĀJUMI

1. Pielāgojot barotni un temperatūras režīmus, kallusu kultūrām ir iespējams iegūt antioksidatīvo un antimikrobiālo aktivitāti, kas līdzinās lapu ekstraktiem;
2. Optimālās audzēšanas temperatūras un barotnes atšķiras pēc tālākā pielietojuma mērķa - ar MS pamata barotni kallusu kultūras vislabāk pārdzīvoja temperatūru režīmu radīto stresu, ar WP barotni tika iegūtas augstākās pārbaudītās bioloģiskās aktivitātes;
3. Pastāv spēcīga pozitīva korelācija starp kopējo fenolu saturu, kopējo flavonoīdu saturu un antioksidatīvo aktivitāti.
4. Kallusu un lapu ekstraktos ir ievērojami atšķirīgas vairāku organisko un fenolskābes koncentrācijas, kas piedalās kopējās antioksidatīvās un antimikrobiālās aktivitātes veidošanā;
5. Lapu ekstrakti bija citotoksiskāki par ogu un kallusu ekstraktiem, ar 2-7x zemākām IK50 vērtībām; ogu un vairākums kallusu ekstraktu nav citotoksiski līdz 0.625% koncentrācijai un nav ievērojami kaitīgāki par 70%EtOH līdz 10% koncentrācijai.

6. PATEICĪBAS

Darba autore izsaka pateicību Dr.biol. Nilam Rostokam par iespēju izstrādāt maģistra darbu viņa vadībā projekta ietvaros un Mag.biol. Annai Ramatai-Stundai par konsultēšanu darba plāna izstrādē un izpildē. Paldies LU Ķīmijas fakultātes Fizikālās ķīmijas katedras pētniecei Mag.chem. Valdai Valkovskai par HPLC-MS datiem un ievadu to interpretēšanā. Pateicība arī Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras kolektīvam, īpaši Dr.biol. Anetei Boroduškei, par atsaucību un palīdzību metožu apgūvē, un citiem praktiskiem ieteikumiem darba izstādes laikā.

Maģistra darbs tika izstrādāts ar Latvijas Zinātnes padomes projekta lzp-2018/1-0101 finansiālu atbalstu.

7. IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

1. Abdel-Salam O.M.E, Shaffie N.M., Omara E.A, Yasses N.N. 2018.Chapter 16 - Citric Acid An Antioxidant In Liver. - In:The Liver Oxidative Stress And Dietary Antioxidants. Academic Press: P183-198
2. Akula R., Ravishankar G.A. 2011. Influence Of Abiotic Stress Signals On Secondary Metabolites In Plants. -Plant Signaling & Behavior, 6(11), 1720-1731
3. Albuquerque B.R., Heleno S.A., Oliveira M.B.P.P, Barros L., Ferreira I.C.F.R. 2021.Phenolic Compounds: Current Industrial Applications, Limitations And Future Challenges.-Food&Function, 12:14-19
4. Ankola A.V., Kumar V., Thakur S., Singhal R., Smitha T, Sankeshwari R. 2020. Anticancer And Antiproliferative Efficacy Of A Standardized Extract Of Vaccinium Macrocarpon On The Highly Differentiating Oral Cancer Kb Cell Line Athwart The Cytotoxicity Evaluation Of The Same On The Normal Fibroblast L929 Cell Line. -Jomfp, 24(2):258-265
5. Fao Global Statistical Yearbook, Fao Regional Statistical Yearbooks,Http://Www.Fao.Org/Faostat/En/#Data/Qc
6. Ashraf M.F., Aziz M.A., Stansalas J., Ismail I., Kadir M.A. 2013.Assessment Of Antioxidant And Cytotoxicity Activities Of Saponin And Crude Extracts Of Chlorophytum Borivilianum.-The Scientific World Journal, 2013, 7
7. Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch Z. 2018.Antibiotic Resistance: A Rundown Of A Global Crisis.-Infct Drug Resist, 11:1645-1658
8. Aune D. 2019. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, And The Risk Of Cardiovascular Disease, Cancer, And Mortality: A Review Of The Evidence.-Advances In Nutrition, 10(S4):S404-S421
9. Aziz M.A., Diab A.S., Mohammed A.A. 2019. Antioxidant Categories And Mode Of Action.- Grām.: Antioxidants, Red. Shalaby E., Intechopen
10. Bhatia S., Bera T. 2015. Classical And Nonclassical Techniques For Secondary Metabolite Production In Plant Cell Culture.- In: Modern Applications Of Plant Biotechnology In Pharmaceutical Sciences. Academic Print, P231-291
11. Bhatia S. 2015b. Plant Tissue Culture.- In: Modern Applications Of Plant Biotechnology In Pharmaceutical Sciences. Academic Print, P31-107
12. Bhatia S. 2015a. Application Of Plant Biotechnology.- In: Modern Applications Of Plant Biotechnology In Pharmaceutical Sciences. Academic Print, P158-207
13. Bhojwani S.S., Dantu P.K. 2013. Production Of Industrial Phytochemicals. -In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text, P275-286
14. Böttger A., Vothknecht U., Bolle C., Wolf A. 2018.Plant Secondary Metabolites And Their General Function In Plants. -In: Lessons On Caffeine, Cannabis & Co. Learning Materials In Biosciences. Springer, Cham., P3-17
15. Bunea A., Rugină D., Sconța Z., Pop R.M., Pintea A., Socaciu C., Tăbăran F., Grootaert C., Struijs K., Van Camp J. 2013.Anthocyanin Determination In Blueberry Extracts From Various Cultivars And Their Antiproliferative And Apoptotic Properties In B16-F10 Metastatic Murine Melanoma Cells.-Phytochemistry,95:436-444
16. Camacho-Cristóbal J.J., Lunar L., Lafont F., Baumert A., González-Fontes A. 2004. Boron Deficiency Causes Accumulation Of Chlorogenic Acid And Caffeoyl Polyamine Conjugates In Tobacco Leaves. - Journal Of Plant Physiology, 161(7):879-881
17. Campos E.M., Stehle P., Simon M-C. 2019. Microbial Metabolites Of Flavan-3-Ols And Their Biological Activity. -Nutrients 11(10):2260
18. Casanal A., Zander U., Munoz C., Dupeux F., Luque I., Botella M.A., Schwab W., Valpuest V., Marquez J.A. 2013. The Strawberry Pathogenesis-Related 10 (Pr-10) Fra A Proteins Control Flavonoid Biosynthesis By Binding To Metabolic Intermediates. -The Journal Of Biological Chemistry 288(49):35322-35332
19. Chabert P., Auger C., Pincemail J., Schini-Kerth V.B. 2014. Overview Of Plant-Derived Antioxidants. - In: Systems Biology Of Free Radicals And Antioxidants, Red.I.Laher, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, P4005-4022
20. Chokshi A., Sifri Z., Cennimo D., Horng H. 2019. Global Contributors To Antibiotic Resistance. -J Glob Infect Dis. 11(1): 36-42
21. Coban H.B. 2019.Organic Acids As Antimicrobial Food Agents: Applications And Microbial Productions. -Bioprocess And Biosystems Engineering, 43:569-591

22. Cook S.D., Nichols D.S., Smith J., Chourey P.S., Mcadam E.L., Quittenden L., Ross J.J. 2016. Auxin Biosynthesis: Are The Indole-3-Acetic Acid And Phenylacetic Acid Biosynthesis Pathways Mirror Images? -*Plant Physiol.* 171(2): 1230–1241
23. Costa D.V.T.A., Almeida A.P.F., Pintado M. 2018. Effect Of Postharvest Application Of Ethylene On The Profile Of Phenolic Acids And Anthocyanins In Three Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum*). -*Sci Food Agric*, 98: 5052–5061
24. Cui H., Zhang C., Li C., Lin L. 2018. Antimicrobial Mechanism Of Clove Oil On *Listeria monocytogenes*. -*Food Control*, 94: 140-146
25. Dembinska-Migas W., Luczkiewicz M., Migas P., Cisowski W. 1988. Conditions For Efficient Induction And Maintenance Of Callus Cultures *Vaccinium corymbosum* Var. Bluecrop And Its Accumulation Of Polyphenolic Compounds. -*Biotechnologia*, 2: 174-185
26. Diaconeasa Z., Leopold L., Ruginã D., Ayvaz H., Socaciu C. 2015. Antiproliferative And Antioxidant Properties Of Anthocyanin Rich Extracts From Blueberry And Blackcurrant Juice. -*Int. J. Mol. Sci.*, 16(2): 2352-2365
27. "Dhumale Dipti R., Dudhare M. S., Mohite N. R., Shingote P. R., Jadhav P.V., Moharil M. P. 2015. Refinement Of In-Vitro Regeneration System In Elite
28. Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Genotypes. - *Journal Of Cell And Tissue Research*, 15(1):4849-4854"
29. Driscoll K., Deshpande A., Datta R., Ramakrishna W. 2020. Anti-Inflammatory Effects Of Northern Highbush Blueberry Extract On An In Vitro Inflammatory Bowel Disease Model. -*Nutrition And Cancer*, 72(7):1178-1190
30. Edreva A., Velikova V., Tsonev T., Dangon S., Gurel A.L., Aktas L.Y. 2007. Stress-Protective Role Of Secondary Metabolites: Diversity Of Functions And Mechanisms. -*Gen. Appl. Plant Physiology, Special Issue*, 34 (1-2): 67-78
31. Eggersdorfer M. 2000. Terpenes. -In: Ullmann's Encyclopaedia Of Industrial Chemistry, Ludwigshafen, Basf Aktiengesellschaft, P29-45
32. Ehlenfeldt M.K., Meredith F.I., Ballington J.R. 1994. Unique Organic Acid Profile Of Rabbiteye Vs. Highbush Blueberries. -*Hortscience* 29(4):321-323
33. Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. 2001. Oxygen Radical Absorbance Capacity (Orac) And Phenolic And Anthocyanin Concentrations In Fruit And Leaf Tissues Of Highbush Blueberry. -*J. Agric. Food Chem.*, 49(5): 2222–2227
34. Espinosa-Leal C.A., Puente-Garza C.A., García-Lara S. 2018. In Vitro Plant Tissue Culture: Means For Production Of Biological Active Compounds. -*Planta*, 248:1–18
35. Dina Falconi. 2013. Foraging & Feasting: A Field Guide And Wild Food Cookbook. Illustrator Wendy Hollender. Publisher Botanical Arts Press, Llc
36. Forney C.F., Kalt W., Jordan M.A., Vinqvist-Tymchuk M., Fillmore S.A.E. 2012. Blueberry And Cranberry Fruit Composition During Development. -*Journal Of Berry Research* 2:169–177
37. Galli R.L., Bielinski D.F., Szprengiel A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. 2006. Blueberry Supplemented Diet Reverses Age-Related Decline In Hippocampal Hsp70 Neuroprotection. -*Neurobiology Of Aging*, 27(2): 344-350
38. Gavrilova V., Kajdžanoska M., Gjamovski V., Stefova M. 2011. Separation, Characterization And Quantification Of Phenolic Compounds In Blueberries And Red And Black Currants By Hplc-Dad-Esi-Msn. -*J. Agric. Food Chem.* 59: 4009–4018
39. Gedik C.M., Boyle S.P., Wood S.G., Vaughan N.J., Collins A.R. 2002. Oxidative Stress In Humans: Validation Of Biomarkers Of Dna Damage. -*Carcinogenesis*, 23(9):1441–1446
40. Red George E.F., Hall M.A., De Klerk G-J. 2008. Plant Propagation By Tissue Culture. Volume 1. The Background., Springer Netherlands. 502p
41. Gough R.E. 1993. The Highbush Blueberry And Its Management. Crc Press, 288p
42. Graf E. 1990. Antioxidant Functions Of Phytic Acid. -*Free Radical Biology & Medicine*, 8: 61-69
43. Guerriero G., Berni R., Muñoz-Sanchez J.A., Apone F., Abdel-Salam E.M., Qahtan A.A., Alatar A.A., Cantini C., Cai G., Hausman J-F., Siddiqui K.S., Hernández-Sotomayor S.M.T., Faisal M. 2018. Production Of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips And Suggestions For Biotechnologists. -*Genes*, 9(6):309
44. Gülçin I., Elias R., Gepdiremen A., Chea A., Topal F. 2010. Antioxidant Activity Of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids From *Stephania rotunda*: Cepharanthine And Fangchinoline. -*Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 25(1): 44-53,
45. Hancock J., Hanson E. 1986. Highbush Blueberry Nutrition. -Cooperative Extension Service, Extension Bulletin E-2011, Michigan State University

46. Hao L., Guo L., Li R., Cheng Y., Huang L., Zhou H., Xu M., Li F., Zhang X., Zheng Y. 2019. Responses Of Photosynthesis To High Temperature Stress Associated With Changes In Leaf Structure And Biochemistry Of Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.). -*Scientia Horticulturae*, 246: 251-264
47. Herald T.J., Gadgil P., Tilley M. 2011. High-Throughput micro Plate Assays For Screening Flavonoid Content And Dpph-Scavenging Activity In Sorghum Bran And Flour. - *J Sci Food Agric*, 92: 2326–2331
48. Hernández-Blanco C., Xin Feng D., Hu J., Sánchez-Vallet A., Deslandes L., Llorente F., Berrocal-Lobo M., Keller H., Barlet X., Sánchez-Rodríguez C., Anderson L.K., Somerville S., Marco Y., Molina A. 2007. Impairment Of Cellulose Synthases Required For Arabidopsis Secondary Cell Wall Formation Enhances Disease Resistance. -*The Plant Cell*, 19(3): 890-903
49. Min Hong S., Hee Soe K., Hwan Lee T., Sook Kim I., Min Lee Y., Ou Lim B. 2017. Cognitive Improving Effects By Highbush Blueberry (*Vaccinium Crymbosum* L.) Vinegar On Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. - : *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 66 (1):99-107
50. Hosttetmann K., Marston A. 2005. Saponins. -*Chemistry & Pharmacology Of Natural Products*, Cambridge University Press
51. Huang R., Wu W., Shen S., Fan J., Chang Y., Chen S., Ye X. 2018. Evaluation Of Colorimetric Methods For Quantification Of Citrus Flavonoids To Avoid Misuse. -*Analytical Methods*, 10(22):2575-2587
52. Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status And Opportunities. -In: *Recent Advances In Plant In Vitro Culture*, Ed. Leva A., Rinaldi L., Intechopen
53. Ieviņš Ģ. 2016. 8.2. Augu Audu Kultūras. - *Grām.: Augu Fizioloģija. Funkcijas Un Mijiedarbība Ar Vidi, Rīga, Latvijas Universitāte*, 574-585. Lpp
54. Igamberdien A.U., Eprintsev A.T. 2016. Organic Acids: The Pools Of Fixed Carbon Involved In Redox Regulation And Energy Balance In Higher Plants. -*Front. Plant Sci.* 7:1042
55. Inostroza-Blancheteau I., Reyes-Díaz M., Aque F., Nunes-Nesi A., Alberdi M., Arce-Johnson P. 2011. Biochemical And Molecular Changes In Response To Aluminium-Stress In Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.). -*Plant Physiology And Biochemistry*, 49(9): 1005-1012
56. Johns A.E. 2018. Lessons For Plant Micropropagation. New Dheli, Educreation Publishing, 85p
57. Kader F., Rove B., Girardin M., Metche M. 1995. Fractionation And Identification Of The Phenolic Compounds Of Highbush Blueberries (*Vaccinium Corymbosum*, L.). -*Food Chemisrry*, 55(I): 3540, 1996
58. Kalt W., Ryan D.A.J., Duy J.C., Prior R.L., Ehlenfeldt M.K., Vander Kloet S.P. 2001. Interspecific Variation In Anthocyanins, Phenolics, And Antioxidant Capacity Among Genotypes Of Highbush And Lowbush Blueberries (*Vaccinium* Section *Cyanococcus* Spp.). -*J. Agric. Food Chem.*, 49: 4761–4767
59. Karlsons A., Osvalde A., Čekstere G., Pormale G. 2018. Research On The Mineral Composition Of Cultivated And Wild Blueberries And Cranberries. -*Agronomy Research* 16(2): 454 463
60. Karuppusamy S. 2009. A Review On Trends In Production Of Secondary Metabolites From Higher Plants By In Vitro Tissue, Organ And Cell Cultures. -*Journal Of Medicinal Plants Research Vol. 3(13):. 1222-1239*
61. Kasote D.M., Katyare S.S., Hegde M.W., Bae H. 2015. Significance Of Antioxidant Potential Of Plants And Its Relevance To Therapeutic Applications. -*Int J Biol Sci.* 11(8): 982–991
62. Kayashima T., Katayama T. 2002. Oxalic Acid Is Available As A Natural Antioxidant In Some Systems. -*Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects*, 1573(1): 1-3
63. Khanal R.C., Howard L.R., Brownmiller C.R., Prior R.L. 2009. Influence Of Extrusion Processing On Procyanidin Composition And Total Anthocyanin Contents Of Blueberry Pomace. -*Journal Of Food Science*, 74(2):H52-H58
64. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. 2017. Anthocyanidins And Anthocyanins: Colored Pigments As Food, Pharmaceutical Ingredients, And The Potential Health Benefits. -*Food & Nutrition Research*, 61:1
65. Kim J.J., Kim Y.S., Kumar V. 2019. Heavy Metal Toxicity: An Update Of Chelating Therapeutic Strategies. -*Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*, 54: 226-231
66. Kloet S.V.P. 1980. The Taxonomy Of The Highbush Blueberry, *Vaccinium Corymbosum*.. -*Can. J. Bot.*, 58 (10):1198-1201
67. Kolak U., Öztürk M., Özgökçe F., Ulubelena. 2006. Norditerpene Alkaloids From *Delphinium Linearilobum* And Antioxidant activity. -
68. Korcak R.F. 2011. Nutrition Of Blueberry And Other Calcifuges. - *Horticultural Reviews*, 183-227
69. Kundu A., Vadassery J. 2018. Chlorogenic Acid-Mediated Chemical Defence Of Plants Against Insect Herbivores
70. Kyte L., Kley J. 1996. Plants From Test Tubes. An Introduction To Micropropagation
71. Lagha A.B., Howell A., Greniera D. 2020. Highbush Blueberry Proanthocyanidins Alleviate *Porphyromonas Gingivalis*-Induced Deleterious Effects On Oral Mucosal Cells. -*Anaerobe*, 65: 10226

72. Leshem B., Werker E., Shalev D.P. 1988. The Effect Of Cytokinins On Vitrification In Melons And Carnation. -*Annals Of Botany*, 62 (3):271-276
73. Update Of The Lipid Maps® Comprehensive Classification System For Lipids. Fahy E., Subramaniam S., Murphy R., Nishijima M., Raetz C., Shimizu T., Spener F., Van Meer G., Wakelam M., And Dennis E., *Journal Of Lipid Research* 50, S9-S14 (2009)
74. Liu W., Mao Y., Schoenborn J., Wang Z., Tang G., Tang X. 2019. Whole Blueberry Protects Pancreatic Beta-Cells In Diet-Induced Obese Mouse. -*Nutrition & Metabolism* 16 (34)
75. Lloyd, G., Mccown, B.H. 1980. Commercially-Feasible Micropropagation Of Mountain Laurel, *Kalmia Latifolia*, By Use Of Shoot-Tip Culture. *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society*, 30: 421-427
76. Lü, J.-M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. 2010. Chemical And Molecular Mechanisms Of Antioxidants: Experimental Approaches And Model Systems. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 14: 840-860
77. Luby J.J., Ballington J.R., Draper A.D., Pliszka K., Austin M.E. 1991. Blueberries And Cranberries (*Vaccinium*). -*Acta Horticulturae*, (290):393-458
78. Makkar H.P.S., Siddhuraju P., Becker K. 2007. *Plant Secondary Metabolites*, Humana Press, 130p
79. Malczewska-Jaskóła K., Jasiewicz B., Mrówczyńska L. 2016. Nicotine Alkaloids As Antioxidant And Potential Protective Agents Against In Vitro Oxidative Haemolysis. - *Chem Biol Interact.* 243:62-71.
80. Maltenieks M. 2008. *Krūmmellenes. Publikācijas.* - Grām.: 400 Augļi Un Ogas Latvijā, As "Lauku Avīze"
81. Marques C., Sotiles A.R., Farias F.O. Oliveira G., Mitterer-Daltoé M.L., Masson M.L. 2020. Full Physicochemical Characterization Of Malic Acid: Emphasis In The Potential As Food Ingredient And Application In Pectin Gels. -*Arabian Journal Of Chemistry*, 13(12):9118-9129
82. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. 2017. Measurement And Clinical Significance Of Biomarkers Of Oxidative Stress In Humans.- *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 17-6501046, 32p
83. Massarotto G., Barcellos T., Garcia C.S.C., Brandalize A.P.C., Moura S., Schwambach J., Henriques J.A.P., Roesch-Ely, M. 2016. Chemical Characterization And Cytotoxic Activity Of Blueberry Extracts (Cv. Misty) Cultivated In Brazil. -*Journal Of Food Science*, 81: H2076-H2084.
84. Mérida H., Álvarez J., Acebes J.L., Encina A., Fry S.C. 2011. Changes In Cinnamic Acid Derivatives Associated With The Habituation Of Maize Cells To Dichlobenil. -*Molecular Plant*, 4(5):869-878
85. Migas P., Cisowski W., Dembińska-Migas W. 2005. Isoprene Derivatives From The Leaves And Callus Cultures Of *Vaccinium Corymbosum* Var. Bluecrop. -*Acta Pol Pharm*, 62(1):45-51.
86. Mostafa A.A., Al-Askar A.A., Almaary K.S., Dawoud T.M., Sholkamy E.N., Bakric M.M. 2017. Antimicrobial Activity Of Some Plant Extracts Against Bacterial Strains Causing Food Poisoning Diseases, 25(2):361-366
87. Može Š., Polak T., Gašperlin L., Koron D., Vanzo A., Ulrich N.P., Abram V. 2011. Phenolics In Slovenian Bilberries (*Vaccinium Myrtillus* L.) And Blueberries (*Vaccinium Corymbosum* L.). -*J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 13, 6998–7004
88. Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth And Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. -*Physiologia Plantarum*, 15(3):473-479
89. Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. 2002. Lipoic Acid: A Unique Antioxidant In The Detoxification Of Activated Oxygen Species. -*Plant Physiology And Biochemistry* 40(6-8):463-470
90. Peñalver C.N., Savino J., Bertini E.V., Castellanos De Figueroa L.I. 2014. Gluconic Acid Produced By *Gluconacetobacter Diazotrophicus* Pal5 Possesses Antimicrobial Properties. -*Research In Microbiology* 165(7)
91. Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M. O., Jin, Y.-W., Lee, E.-K., Loake, G. J. 2016. Plant Cell Culture Strategies For The Production Of Natural Products. -*Bmb Reports*, 49(3), 149–158.
92. Paciolla C., Fortunato S., Dipierro N., Paradiso A., De Leonardi S., Mastropasqua L., De Pinto M.C. 2019. Vitamin C In Plants: From Functions To Biofortification. *Antioxidants* 8, 519
93. Pâques, M. 1991. Vitrification And Micropropagation: Causes, Remedies And Prospects. *Acta Hort.* 289, 283-290
94. Pełkal, A., Pyrzynska, K. 2014. Evaluation Of Aluminium Complexation Reaction For Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* 7: 1776–1782
95. Pelletier S.W (Ed). 1983. *Alkaloids: Chemical And Biological Perspectives*
96. Petridis A., Van Der Kaay J., Chrysanthou E., Mccallum S., Graham J., Hancock R.D. 2018. Photosynthetic Limitation As A Factor Influencing Yield In Highbush Blueberries (*Vaccinium Corymbosum*) Grown In A Northern European Environment. - *Journal Of Experimental Botany*, 69(12): 3069–3080
97. Pervin M., Hasnat M.A, Lim B.O. 2013. Antibacterial And Antioxidant Activities Of *Vaccinium Corymbosum* L. Leaf Extract. -*Asian Pac J Trop Dis* 2013; 3(6): 444-453

98. Poljsak B., Šuput D., Milisav I. 2013. Achieving The Balance Between Ros And Antioxidants: When To Use The Synthetic Antioxidants.- *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2013-956792, 11p
- 99.
100. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey Km. 2001. Antimicrobial Properties Of Phenolic Compounds From Berries. -*J Appl Microbiol.*,90(4):494-507.
101. Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. 2006. Gluconic Acid: Properties, Applications And Microbial Production. -*Food Technol. Biotechnol.* 44 (2):185–195
102. Rehman S., Khan H. 2017. Advances In Antioxidant Potential Of Natural Alkaloids. -*Current Bioactive Compounds*,13 (2): 101-108
103. Retamales J.B., Hancock J.F. 2018. *Blueberries*, 2nd Edition. Cabi, 423p
104. Ribera-Fonseca A., Jiménez D., Leal P., Riquelme I., Roa J.C., Alberdi M., Peek R.M., Reyes-Díaz M. 2020. The Anti-Proliferative And Anti-Invasive Effect Of Leaf Extracts Of Blueberry Plants Treated With Methyl Jasmonate On Human Gastric Cancer In Vitro Is Related To Their Antioxidant Properties.-*Antioxidants*, 9(1):45
105. Riihinen K., Jaakola L., Karenlampi S., Hohtola A. 2008. Organ-Specific Distribution Of Phenolic Compounds In Bilberry (*Vaccinium Myrtillus*) And ‘Northblue’ Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* X *V. Angustifolium*). -*Food Chemistry* 110: 156–160
106. Rodriguez-Mateos A., Cifuentes-Gomez T., Tabatabaee S., Lecras C., Spencer J.P.E. 2012. Procyanidin, Anthocyanin, And Chlorogenic Acid Contents Of Highbush And Lowbush Blueberries. -*J. Agric.Food Chem.*,60: 5772–5778
107. Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F., Crespy V., Du Chaffaut L., Mennen L., Knox C., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A. 2010. Phenol-Explorer: An Online Comprehensive Database On Polyphenol Contents In Foods. Database, Doi: 10.1093/Database/Bap024.
108. Salaheen S., Nguyen C., Hewes D., Biswas D. 2014. Cheap Extraction Of Antibacterial Compounds Of Berry Pomace And Their Mode Of Action Against The Pathogen *Campylobacter Jejuni*. -*Food Control*, 46: 174-181
109. Salehi B., Mishra A. P., Nigam M., Sener B., Kilic M., Sharifi-Rad M., Fokou P., Martins N., Sharifi-Rad J. 2018. Resveratrol: A Double-Edged Sword In Health Benefits. -*Biomedicines*, 6(3), 91
110. Salehi B., Berkay Yilmaz Y., Antika G., Boyunegmez Tumer T., Fawzi Mahomoodally M., Lobine D., Akram M., Riaz M., Capanoglu E., Sharopov F., Martins N., Cho W.C., Sharifi-Rad J. 2019. Insights On The Use Of α -Lipoic Acid For Therapeutic Purposes. -*Biomolecules*, 9(8):356
111. Sánchez Range J.C., Benavides Lozano J.A., Heredia J.B., Jacobo-Velázquez D.A. 2013. The Folin-Ciocalteu Assay Revisited: Improvement Of Its Specificity For Total Phenolic Content Determination. -*Anal.Methods*, 5, 5990
112. Savoia D. 2012. Plant-Derived Antimicrobial Compounds: Alternatives To Antibiotics. -*Future Microbiol.* (2012) 7(8): 979–990
113. Shahzad A., Parveen S., Sharma S., Shaheen A., Saeed T., Yadav V., Akhtar R., Ahmad Z., Upadhyay A. 2017. *Plant Tissue Culture: Applications In Plant Improvement And Conservation*. -In: *Plant Biotechnology: Principles And Applications*, Singapore, Springer, P37-72
114. Shen X., Sun X., Xie Q., Liu H., Zhao Y., Pana Y., Hwang C-A., Wu V.C.H. 2014. Antimicrobial Effect Of Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Extracts Against The Growth Of *Listeria Monocytogenes* And *Salmonella Enteritidis*. -*Food Control*, 35(1): 159-165
115. Silva S., Cost E., Mendes M., Morais R., Calhau C., Pintado M. 2016. Antimicrobial, Antiadhesive And Antibiofilm Activity Of An Ethanolic, Anthocyanin-Rich Blueberry Extract Purified By Solid Phase Extraction. -*J Appl Microbiol*, 121: 693-703
116. Silva S., Costa E.M., Costa M.R., Pereira M.F., Pereira J.O., Soares J.C., Pintado M. 2015. Aqueous Extracts Of *Vaccinium Corymbosum* As Inhibitors Of *Staphylococcus Aureus*. -*Food Control*, 51: 314-320
117. Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. 2015. Bioactive Compounds And Antioxidant Activity In Different Types Of Berries. -*International Journal Of Molecular Sciences*, 16(10):24673-24706.
118. Srivastava J., Chandra H., Nautiyal A.R., Kalra S.J.S. 2014. Antimicrobial Resistance (Amr) And Plant-Derived Antimicrobials (Pdams) As An Alternative Drug Line To Control Infections. - *3 Biotech* 4, 451–460 (2014)
119. Stanner S., Hughes J., Kelly C., & Buttriss J. (2004). A Review Of The Epidemiological Evidence For The ‘Antioxidant Hypothesis’. -*Public Health Nutrition*, 7(3): 407-422.
120. Starast M., Karp K., Vool E., Moor U., Tonutare T., Paal T. 2007. Chemical Composition And Quality Of Cultivated And Natural Blueberry Fruit In Estonia. -*Journal Of Fruit And Ornamental Plant Research*, 66: 143-153.

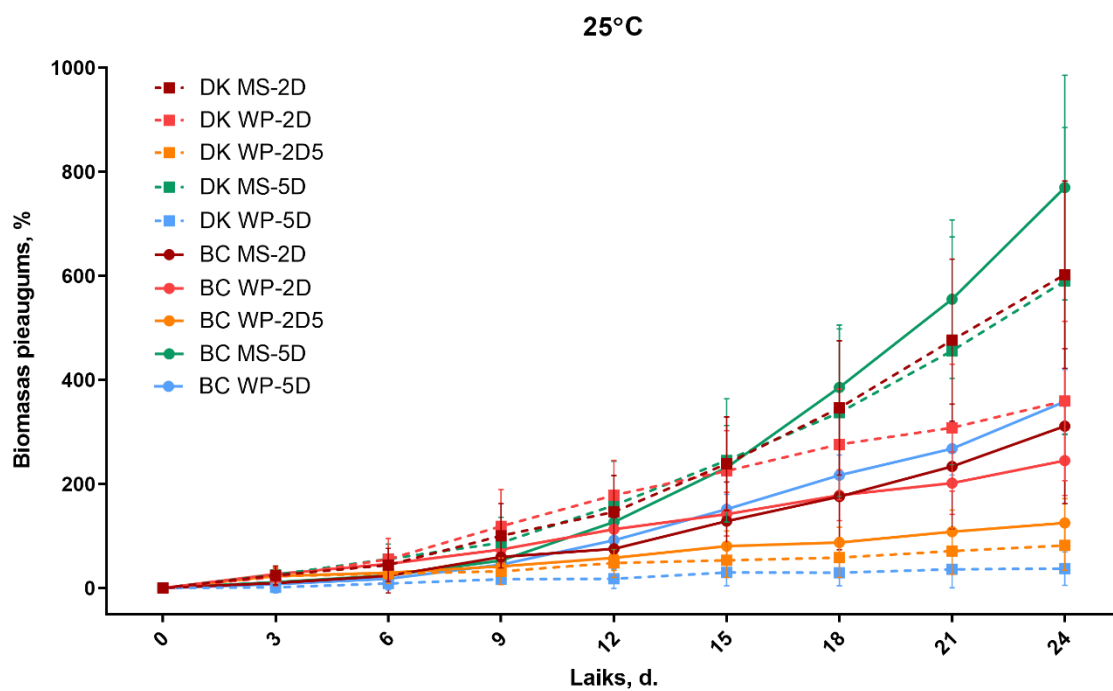
121. Ștefănescu B-E., Călinoiu L.F., Ranga F., Fetea F., Mocan A., Vodnar D.C., Crișan G. 2020. The Chemical And Biological Profiles Of Leaves From Commercial Blueberry Varieties. -Plants, 9(9):1193.
122. Stickland R.G., Sunderland N. 1972. Production Of Anthocyanins, Flavonols, And Chlorogenic Acids By Cultured Callus Tissues Of *Haplopappus Gracilis*. - Annals Of Botany, 36(3): 443–457
123. Strathearn K.E., Yousef G.G., Grace M.H., Roya S.L., Tambea M.A., Ferruzzic M.G., Wu Q-L., Simon J.E., Lil M.A., Rochet J-C. 2014. Neuroprotective Effects Of Anthocyanin- And Proanthocyanidin-Rich Extracts In Cellular Models Of Parkinson'S Disease. -Brain Research, 1555: 60-77
124. Subraman R., Narayanasamy M., Feussner K.D. 2017. Plant-Derived Antimicrobials To Fight Against Multi-Drug-Resistant Human Pathogens. - 3 Biotech 7, 172
125. Takó M., Kerekes E. B., Zambrano C., Kotogán A., Papp T., Krisch J., Vágvölgyi C. 2020. Plant Phenolics And Phenolic-Enriched Extracts As Antimicrobial Agents Against Food-Contaminating Microorganisms. -Antioxidants (Basel, Switzerland), 9(2), 165
126. Tetsumura T., Matsumoto Y., Sato M., Honsho C., Yamashita K., Komatsu H., Sugimoto Y., Kunitake H. 2008. Evaluation Of Basal Media For Micropropagation Of Four Highbush Blueberry Cultivars. - Scientia Horticulturae, 119(1):72-74
127. Trajtemberg S.P., Apostolo N.M., Fernandez G. 2006. Alluses Of *Cynara Cardunculus* Var. *Cardunculus* *Cardoon* (Asteraceae): Determination Of Cynarine And Chlorogenic Acid By Automated High-Performance Capillary Electrophoresis. -In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 42:534–537
128. Upadhyay A., Upadhyaya I., Kollanoor-Johny A., Venkitanarayanan K. 2013. Antibiofilm Effect Of Plant Derived Antimicrobials On *Listeria Monocytogenes*. -Food Microbiology, 36(1): 79-89
129. Upadhyay A., Upadhyaya I., Kollanoor-Johny A., Venkitanarayanan K. 2014. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview Of The Mechanistic Basis. - Bioactive Natural Products: Facts, Applications, And Challenges, 2014-761741
130. Veberic R., Slatnar A., Bizjak J., Stampar F., Mikulic-Petkovsek M. 2015. Anthocyanin Composition Of Different Wild And Cultivated Berry
131. Species. -Lwt - Food Science And Technology 60 (2015): 509-517"
132. Vescan L.A., Pamfil D., Clapa D., Fira A., Sisea C.R., Pop I.F., Petricele I.V., Ciuzan O., Pop R. 2012. Efficient Micropropagation Protocol For Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Cv. 'Elliot'. -Romanian Biotechnological Letters, Vol. 17, No. 1, 2012
133. Volpi E Silva N., Mazzafera P., Cesarino I. 2019. Should I Stay Or Should I Go: Are Chlorogenic Acids Mobilized Towards Lignin Biosynthesis?-Phytochemistry, 166- 112063
134. Walker R.P., Famiani F. 2018. Organic Acids In Fruits: Metabolism, Functions And Contents. - In:Horticultural Reviews, Volume 45, First Edition. Ed. Ian Warrington, Johnn Wiley & Sons, Inc
135. Wan C., Yuan T., Cirello A.L., Seeram .P. 2015. Antioxidant And A-Glucosidase Inhibitory Phenolics Isolated From Highbush Blueberry Flowers. - Food Chemistry, 135(3):1929-1937
136. Wang J., Liao X., Zhang H., Du J., Chen P. 2003. Accumulation Of Chlorogenic Acid In Cell Suspension Cultures Of *Eucommia Ulmoides*. -Plant Cell, Tissue And Organ Culture 74: 193–195
137. Wang L-J., Wu L., Wang H-X., Li S-S., Zheng X-C., Du H., Xu Y-J., Wang L-S. 2015. Composition Of Phenolic Compounds And Antioxidant Activity In The Leaves Of Blueberry Cultivars. -Journal Of Functional Foods 16 (2 0 1 5) 295–304
138. Wang N., Zongying Z., Jiang S., Chen X. 2016. Synergistic Effects Of Light And Temperature On Anthocyanin Biosynthesis In Callus Cultures Of Red-Fleshed Apple (*Malus Sieversii* F. Niedzwetzkyana). -China123plant Cell Tiss Organ Cult, 127:217–227
139. Werlein H.D., Küttemeyer C., Schatton G., Hubbermann E.M, Schwarz K. 2005. Influence Of Elderberry And Blackcurrant Concentrates On The Growth Of Microorganisms. -Food Control, 16(8): 729-733
140. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 141.
142. Wu H., Chai Z., Hutabarat R.P., Zeng Q., Niu L., Li D., Yu H., Huang W. 2019. Blueberry Leaves From 73 Different Cultivars In Southeastern China As Nutraceutical Supplements Rich In Antioxidants. -Food Research International 122: 548–560
143. Yang F., Bryla D. R., Strik B. C. 2019. Critical Temperatures And Heating Times For Fruit Damage In Northern Highbush Blueberry. -Hortscience Horts, 54(12): 2231-2239.
144. Yousef Gg, Brown Af, Funakoshi Y, Mbeunkui F, Grace Mh, Ballington Jr, Loraine A, Lila Ma. Efficient Quantification Of The Health-Relevant Anthocyanin And Phenolic Acid Profiles In Commercial Cultivars And Breeding Selections Of Blueberries (*Vaccinium* Spp.). J Agric Food Chem. 2013 May 22;61(20):4806-15.
145. Zakłós-Szyda, M.; Budryn, G. The Effects Of *Trifolium Pratense* L. Sprouts' Phenolic Compounds On Cell Growth And Migration Of Mda-Mb-231, Mcf-7 And Huvec Cells. Nutrients 2020, 12, 257

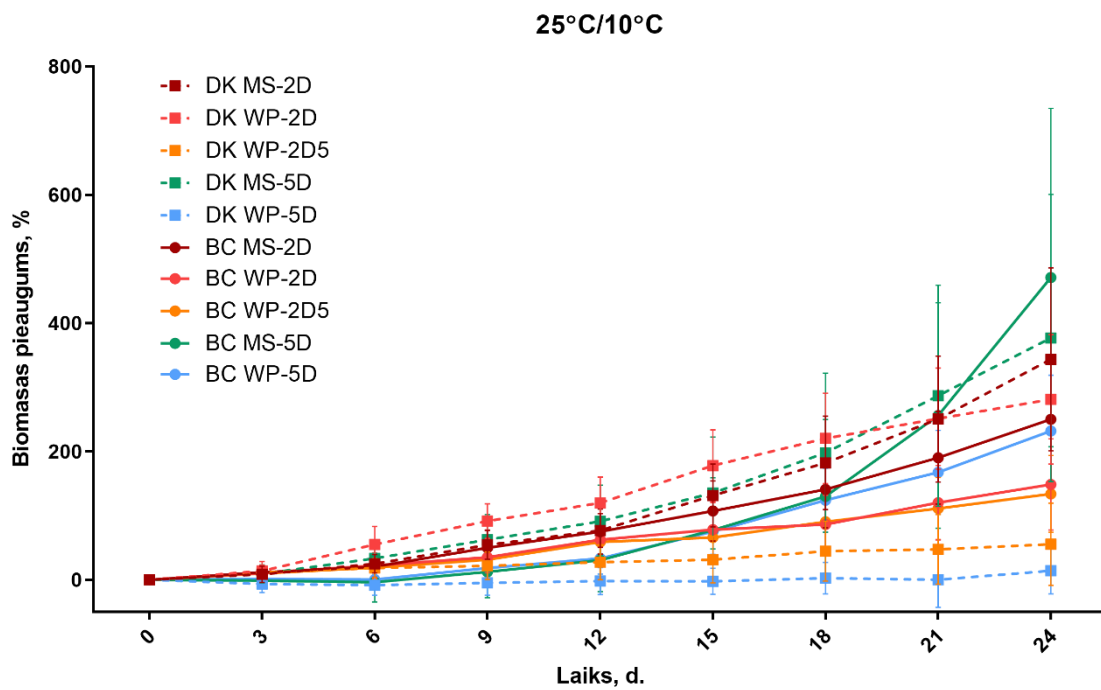
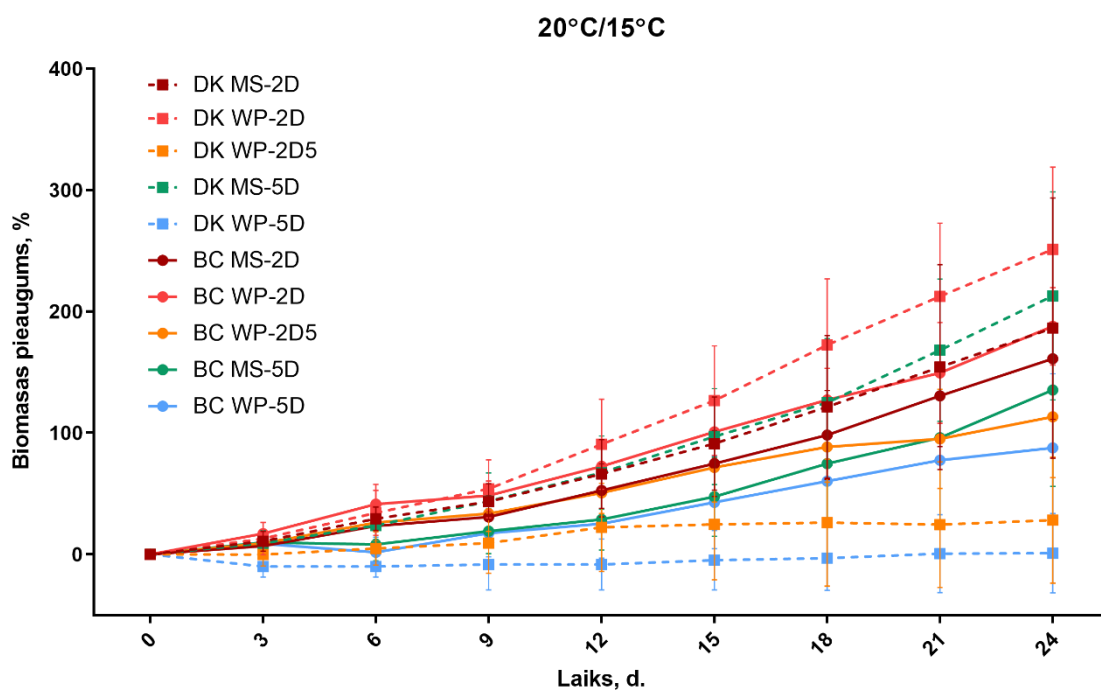
146. Zheng, Y., Renqiang, L., Sun, Y., Ming, X., Zhang, H., Huang, L., Zhu, Y., Wang, H., Genzhu, L., Liu, L., Fei, L., Guo, L., & Zhang, X. (2017). The Optimal Temperature For The Growth Of Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L .).
147. Zhou Y., Singh B.R. 2007. Characterization Of Environmental Stress-Regulated Anthocyanin Production And Growth Of Cranberry Callus. -*Journal Of Applied Horticulture*, 9(1): 17-21
148. Zhou L., Xie M., Yang F., Liu J., 2020. Antioxidant Activity Of High Purity Blueberry Anthocyanins And The Effects On Human Intestinal Microbiota. -*Lwt - Food Science And Technology* 117 (2020) 108621
149. Ziv M. 1991. Vitrification: Morphological And Physiological Disorders Of In Vitro Plants. -In: P.C. Debergh And R.H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation*, 45-69

PIELIKUMI

Kallusu biomasu augšanas līknes ar standartnovirzēm 25°C (A), 20/15°C (B) un 25/10°C (C) temperatūru režīmos (n=10).

Growth curves with standard deviation of calli biomass at 25°C (A), 20/15°C (B) and 25/10°C (C) temperature settings (n=10).





DK (A) un BC (B) kallusu biomasas pieauguma 24.dienā statistiskās analīzes dati. Atkārtoto mērījumu divu faktoru ANOVA un Takija salīdzināšanas tests šķirnes ietvaros, n=10.

Data of statistical analysis of DK (A) and BC (B) callus biomass growth on day 24. Repeated measures two-way ANOVA and Tukey's comparison test within each cultivar, n=10.

A

DK			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Dienas x Barotne	<0.0001	****	Jā
Dienas	<0.0001	****	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā
Kallusa Nr	<0.0001	****	Jā
Takija salīdzināšanas tests	P vērtība		
24.dienas rezultāti			
DK MS-2D 25°C vs. DK WP2D5 25°C	0.0002	***	
DK MS-2D 25°C vs. DK WP-5D 25°C	0.0001	***	
DK MS-2D 25°C vs. DK MS-2D 20/15°C	0.001	***	
DK WP-2D 25°C vs. DK WP2D5 25°C	0.009	**	
DK WP-2D 25°C vs. DK WP-5D 25°C	0.0032	**	
DK WP2D5 25°C vs. DK MS-5D 25°C	0.0138	*	
DK MS-5D 25°C vs. DK WP-5D 25°C	0.008	**	
DK MS-2D 20/15°C vs. DK WP-2D5 20/15°C	0.042	*	
DK MS-2D 20/15°C vs. DK WP-5D 20/15°C	0.0126	*	
DK WP-2D 20/15°C vs. DK WP-2D5 20/15°C	<0.0001	****	
DK WP-2D 20/15°C vs. DK WP-5D 20/15°C	<0.0001	****	
DK WP-2D5 20/15°C vs. DK MS-5D 20/15°C	0.002	**	
DK MS-5D 20/15°C vs. DK WP-5D 20/15°C	0.0006	***	
DK MS-2D 25/10°C vs. DK WP-2D5 25/10°C	0.0034	**	
DK MS-2D 25/10°C vs. DK WP-5D 25/10°C	0.0014	**	
DK WP-2D 25/10°C vs. DK WP-2D5 25/10°C	0.0014	**	
DK WP-2D 25/10°C vs. DK WP-5D 25/10°C	0.0003	***	
DK WP-2D5 25/10°C vs. DK MS-5D 25/10°C	0.044	*	
DK MS-5D 25/10°C vs. DK WP-5D 25/10°C	0.0206	*	

B

BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Dienas x Barotne	<0.0001	****	Jā
Dienas	<0.0001	****	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā
Kallusa Nr	<0.0001	****	Jā
Takija salīdzināšanas tests	P vērtība		
24.dienas rezultāti			
MS-2D 25°C vs. MS-5D 25°C	0.0019	**	
WP-2D 25°C vs. WP2D5 25°C	0.0203	*	
WP-2D 25°C vs. MS-5D 25°C	0.0007	***	
WP-2D 25°C vs. WP-5D 25°C	0.0231	*	
WP2D5 25°C vs. MS-5D 25°C	0.0002	***	
WP2D5 25°C vs. WP-5D 25°C	<0.0001	****	
MS-5D 25°C vs. MS-5D 20/15°C	0.0001	***	
WP-5D 25°C vs. WP-5D 20/15°C	<0.0001	****	
WP-2D 20/15°C vs. WP-5D 20/15°C	0.0216	*	
WP-5D 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	0.027	*	

Spīrmana korelācijas tests, r vērtības; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Spearman correlation test, r values; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2,4-D koncentrācija, µg/ml	1								
2	Biomasa pieaugums pēc 24 dienām, g	0.055	1							
3	Kallusu ūdens saturs, % no svaigās masas	0.455 *	0.525 *	1						
4	Sausā ekstrakta masa, % no šķidrās masas	0.161	-0.330	-0.305	1					
5	mg SE / g svaigās masas	-0.209	-0.481 *	-0.891 ****	0.643 **	1				
6	Kopējie fenoli, mg GSE/mg SE	-0.489 **	-0.141	-0.352	-0.241	0.153	1			
7	Kopējie flavonoīdi, mg RE/mg SE	-0.517 **	-0.010	-0.344	-0.214	0.131	0.849 ****	1		
8	DPPH neitralizēšana, mmol TE/mg SE	-0.464 **	-0.066	-0.331	-0.285	0.129	0.816 ****	0.941 ****	1	
9	DPPH IK50, mg SE/ml	0.393 *	0.005	0.263	0.301	-0.063	-0.821 ****	-0.931 ****	-0.971 ****	1

Kopējo fenolu satura testa statistiskās analīzes dati. Divu faktoru ANOVA, n=6.

Total phenolics count assay statistical data. Two-way ANOVA, n=6.

DK un BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0003	***	Jā
Temperatūra	0.0137	*	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā
DK			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0002	***	Jā
Temperatūra	0.0004	***	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā
BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.1221		Nē
Temperatūra	0.2787		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā

Kopējo flavonoīdu satura testa statistiskās analīzes dati. Divu faktoru ANOVA, n=6.

Total flavonoids count assay statistical data. Two-way ANOVA, n=6.

DK un BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0479	*	Jā
Temperatūra	0.2525		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā
DK			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.7032		Nē
Temperatūra	>0.9999		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā
BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0125	*	Jā
Temperatūra	0.0579		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā

DPPH radikāļa neutralizēšanas testa statistiskās analīzes dati. Divu faktoru ANOVA, n=9.

DPPH radical scavenging assay statistical data. Two-way ANOVA, n=9.

DK un BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	<0.0001	****	Jā
Temperatūra	0.0127	*	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā
DK			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0893		Nē
Temperatūra	0.283		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā
BC			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.0004	***	Jā
Temperatūra	0.0389	*	Jā
Barotne	<0.0001	****	Jā

Ekstraktu DPPH radikāļa neitralizēšanas aktivitātes IK50 vērtības (mg SE/mL) (A) un statistiskās analīzes dati (divu faktoru ANOVA) (B). SN- standartnovirze, n=9 (3 bioloģiskie x 3 tehniskie atkārtējumi).

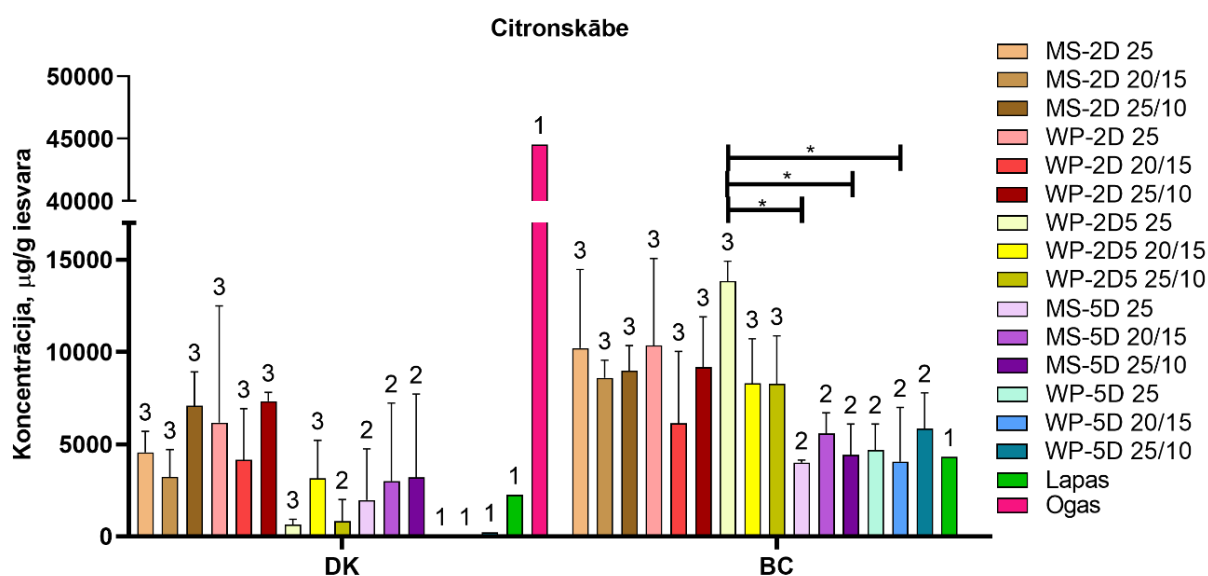
IC50 values of extract DPPH radical scavenging activity (mg DW/mL) (A) and statistical data (two-way ANOVA) (B). SN – standard deviation, n=9 (3 biological x 3 technical repeats).

		25°C		20/15°C		25/10°C		Augi	
		IK50	SN	IK50	SN	IK50	SN	IK50	SN
DK kallusi	MS-2D	1.007	0.775	0.610	0.218	0.365	0.122		
	WP-2D	0.345	0.198	0.282	0.044	0.183	0.032		
	WP-2D5	0.478	0.168	0.914	1.061	1.203	0.388		
	MS-5D	0.945	0.491	1.187	0.391	1.068	0.130		
	WP-5D	0.573	0.178	1.693	0.743	0.974	0.244		
BC kallusi	MS-2D	0.424	0.109	0.333	0.128	0.419	0.205		
	WP-2D	0.131	0.089	0.320	0.107	0.214	0.031		
	WP-2D5	0.187	0.058	0.203	0.024	0.202	0.062		
	MS-5D	0.927	0.285	0.867	0.122	0.874	0.050		
	WP-5D	0.210	0.033	0.188	0.036	0.269	0.110		
Augi	DK lapas							0.106	0.005
	DK ogas							1.738	0.312
	BC lapas							0.124	0.003

DK un BC IK50			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.1335		Nē
Temperatūra	0.2885		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā
DK IK50			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.1863		Nē
Temperatūra	0.2983		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā
BC IK50			
Variācijas avots	P vērtība		Būtisks?
Mijiedarbība	0.7013		Nē
Temperatūra	0.8987		Nē
Barotne	<0.0001	****	Jā

Ar HPLC-MS metodi noteiktās citronskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

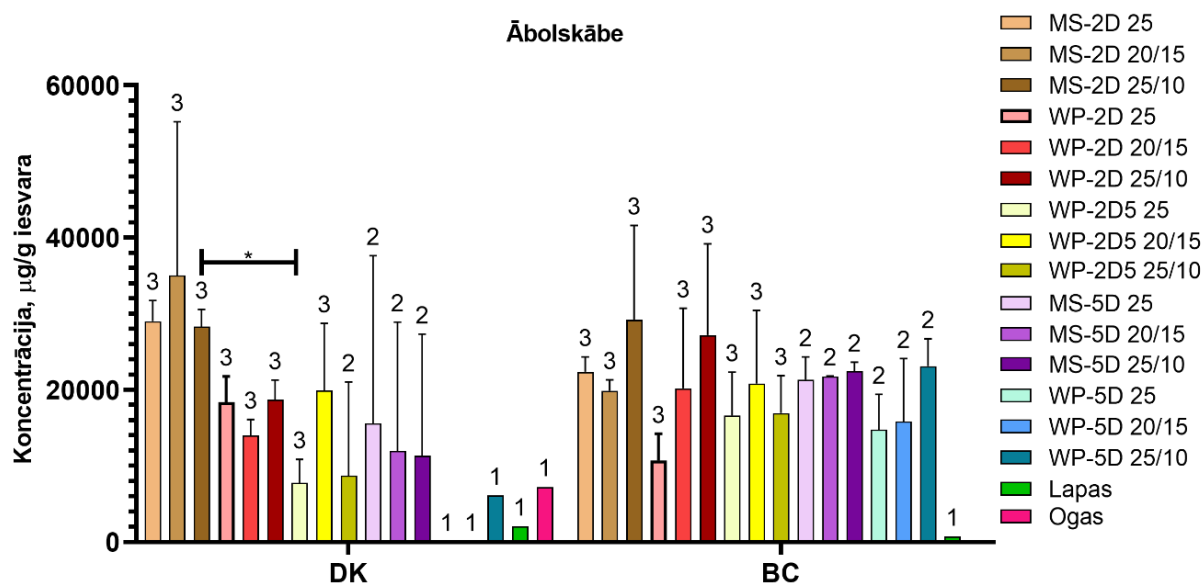
The concentrations of citric acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	0.1247	
Šķirne	<0.0001	****
Barotne + temperatūra	0.0079	**

Ar HPLC-MS metodi noteiktās ābolskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

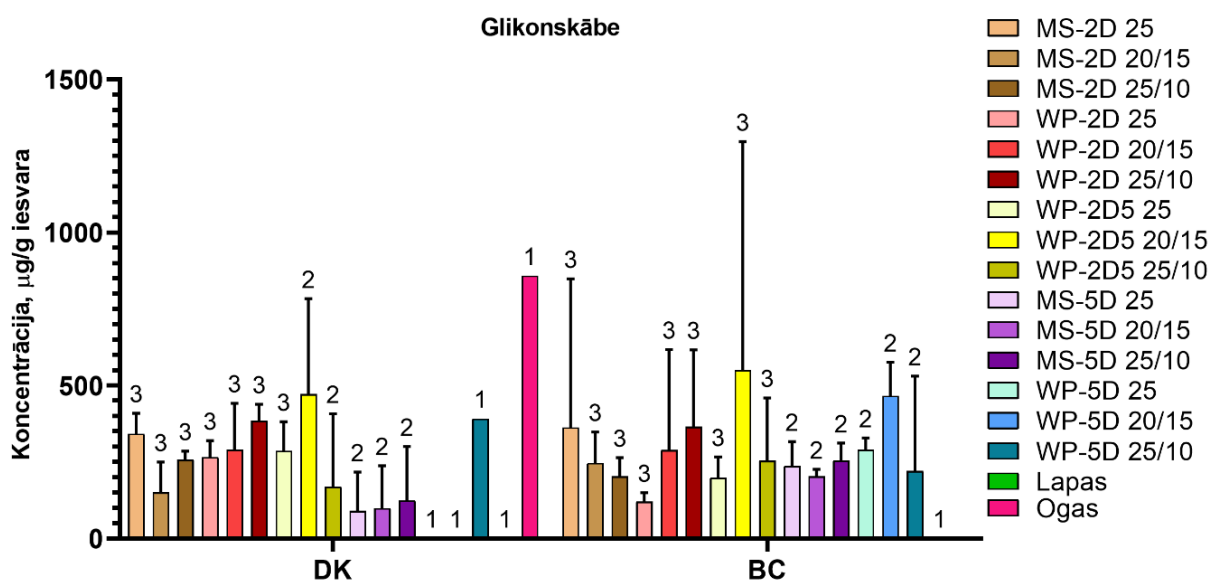
The concentrations of malic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	0.3133	
Šķirne	0.0345	*
Barotne + temperatūra	0.0042	**

Ar HPLC-MS metodi noteiktās glikonskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

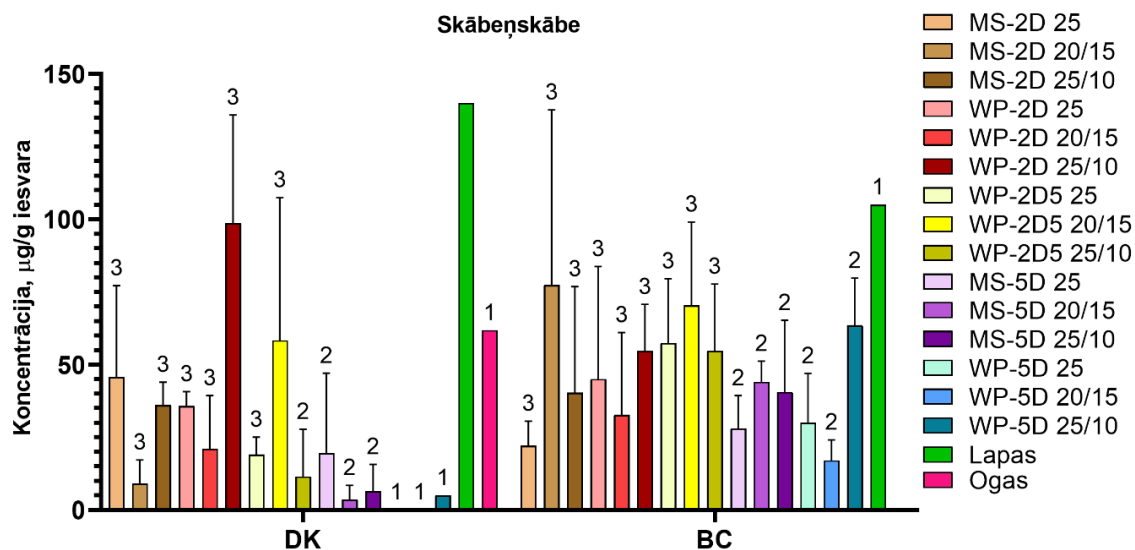
The concentrations of gluconic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība
Mijiedarbība	0.9797
Šķirne	0.3338
Barotne + temperatūra	0.5671

Ar HPLC-MS metodi noteiktās skābeņskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

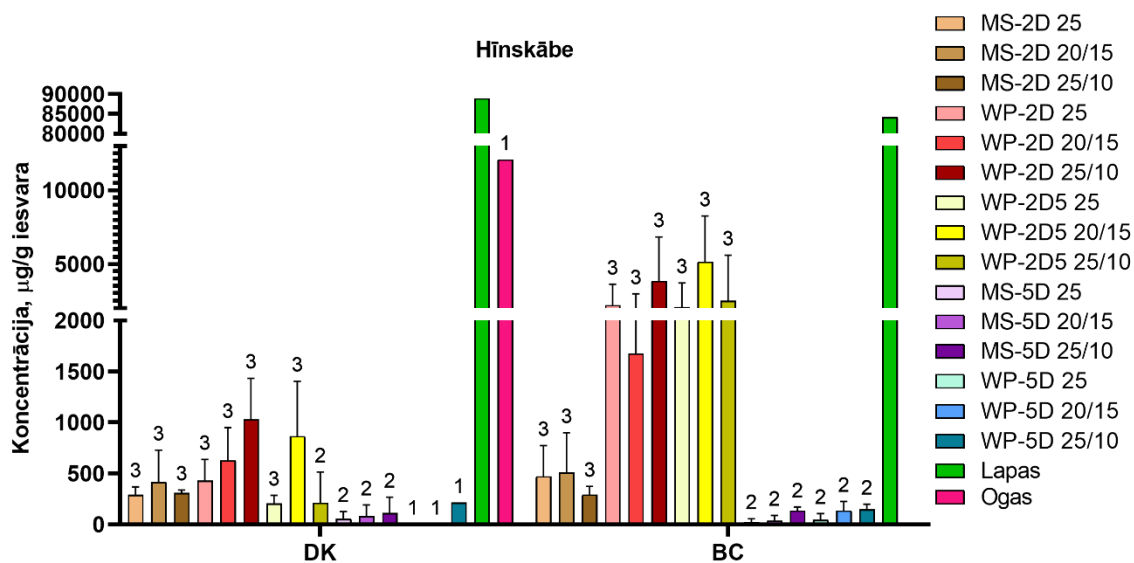
The concentrations of oxalic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	0.1143	
Šķirne	0.0141	*
Barotne + temperatūra	0.0015	**
Takija tests		
P vērtība		
DK		
MS-2D 20/15°C vs. WP-2D 25/10°C	0.0154	*
MS-2D 20/15°C vs. Lapas	0.0105	*
WP-2D 20/15°C vs. Lapas	0.0306	*
WP-2D 25/10°C vs. MS-5D 20/15°C	0.0272	*
WP-2D 25/10°C vs. MS-5D 25/10°C	0.0376	*
WP-2D5 25°C vs. Lapas	0.0258	*
WP-2D5 25/10°C vs. Lapas	0.0254	*
MS-5D 25°C vs. Lapas	0.0481	*
MS-5D 20/15°C vs. Lapas	0.013	*
MS-5D 25/10°C vs. Lapas	0.0168	*
WP-5D 25°C vs. Lapas	0.0454	*
WP-5D 20/15°C vs. Lapas	0.0454	*

Ar HPLC-MS metodi noteiktās hīnskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

The concentrations of quinic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

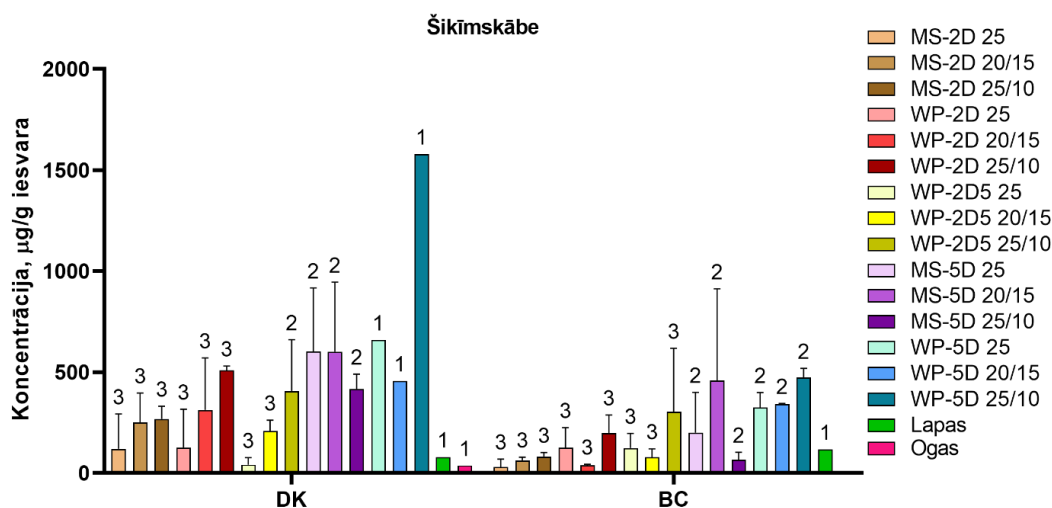


Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	0.0303	*
Šķirne	0.0609	
Barotne + temperatūra	<0.0001	****
Takija tests	P vērtība	
DK		
MS-2D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****

Takija tests (turpinājums)	P vērtība	
MS-2D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-2D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
BC		
MS-2D 25°C vs. WP-2D5 20/15°C	0.0043	**
MS-2D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-2D 20/15°C vs. WP-2D5 20/15°C	0.0048	**
MS-2D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-2D 25/10°C vs. WP-2D5 20/15°C	0.0025	**
MS-2D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 20/15°C vs. MS-5D 25°C	0.0056	**
WP-2D5 20/15°C vs. MS-5D 20/15°C	0.0058	**
WP-2D5 20/15°C vs. MS-5D 25/10°C	0.0075	**
WP-2D5 20/15°C vs. WP-5D 25°C	0.0059	**
WP-2D5 20/15°C vs. WP-5D 20/15°C	0.0075	**
WP-2D5 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	0.0077	**
WP-2D5 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-2D5 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
MS-5D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 25°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 20/15°C vs. Lapas	<0.0001	****
WP-5D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****

Ar HPLC-MS metodi noteikto šikīmskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būstisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

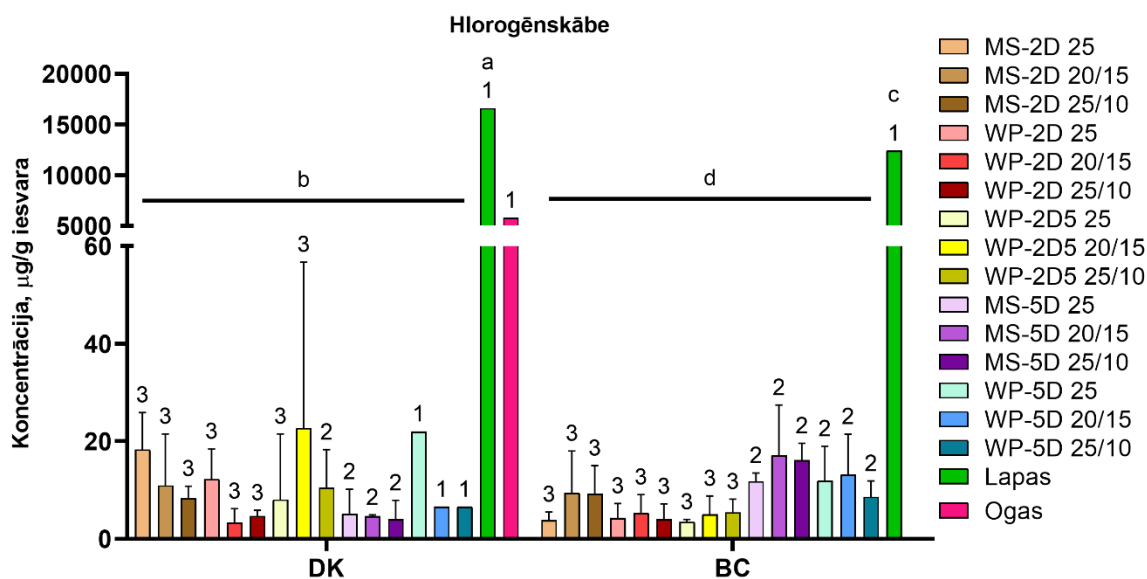
The concentrations of shikimic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	0.0138	*
Šķirne	<0.0001	****
Barotne + temperatūra	<0.0001	****
Takija tests		P vērtība
DK		
MS-2D 25°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
MS-2D 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
MS-2D 25/10°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D 25°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D 25/10°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D5 25°C vs. MS-5D 25°C	0.0285	*
WP-2D5 25°C vs. MS-5D 20/15°C	0.0291	*
WP-2D5 25°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D5 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-2D5 25/10°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
MS-5D 25°C vs. WP-5D 25/10°C	0.0009	***
MS-5D 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	0.0009	***
MS-5D 25/10°C vs. WP-5D 25/10°C	<0.0001	****
WP-5D 25°C vs. WP-5D 25/10°C	0.0148	*
WP-5D 20/15°C vs. WP-5D 25/10°C	0.001	***
WP-5D 25/10°C vs. Lapas	<0.0001	****

Ar HPLC-MS metodi noteiktās dzintarskābes koncentrācijas melleņu kallusu, lapu un ogu ekstraktos. Kļūdu nogrieznis – standartnovirze, skaitlis virs tās – n. Tabulā apkopoti statistiskās analīzes rezultāti (divfaktoru ANOVA un Takija tests pie liela skaita būsistisku rezultātu) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

The concentrations of succinic acid in highbush blueberry callus, leaf and berry extracts as determined by HPLC-MS method. Error bar – SD, number above it – n. Table shows summary of statistical analysis results (two-way ANOVA and Tukey's test for large numbers of significant differences) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



Variācijas avots	P vērtība	
Mijiedarbība	<0.0001	****
Šķirne	<0.0001	****
Barotne + temperatūra	<0.0001	****

Ekstraktu sausnes koncentrācijas vidējās vērtības un standartnovirzes, kas izmantotas antimikrobiālās aktivitātes testā (n=3).

Average values and standard deviations of dry weights of extracts used in antimicrobial activity assay (n=3).

Temperatūra	barotne		Sausā ekstrakta koncentrācijas antimikrobiālās aktivitātes testā, mg/ ml				
			100% konc	25%	12.5%	6.25%	
DK kallusi	25°C	MS-2D	Vid.	4.2	1.050	0.525	0.262
			SN	1.1	0.267	0.133	0.067
	20/15°C	MS-2D	Vid.	5.8	1.461	0.731	0.365
			SN	1.6	0.410	0.205	0.102
	25/10°C	MS-2D	Vid.	4.8	1.200	0.600	0.300
			SN	0.2	0.058	0.029	0.014
	25°C	WP-2D	Vid.	5.3	1.333	0.667	0.333
			SN	2.5	0.621	0.310	0.155
	20/15°C	WP-2D	Vid.	4.3	1.083	0.542	0.271
			SN	0.3	0.083	0.042	0.021
	25/10°C	WP-2D	Vid.	4.7	1.172	0.586	0.293
			SN	0.2	0.048	0.024	0.012
	25°C	WP-2D5	Vid.	3.6	0.906	0.453	0.226
			SN	0.6	0.150	0.075	0.038
	20/15°C	WP-2D5	Vid.	5.0	1.244	0.622	0.311
			SN	0.2	0.054	0.027	0.013
	25/10°C	WP-2D5	Vid.	3.4	0.851	0.426	0.213
			SN	2.8	0.691	0.345	0.173
	25°C	MS-5D	Vid.	3.9	0.967	0.483	0.242
			SN	0.4	0.093	0.046	0.023
20/15°C	MS-5D	Vid.	5.0	1.239	0.619	0.310	
		SN	0.3	0.075	0.038	0.019	
25/10°C	MS-5D	Vid.	5.0	1.244	0.622	0.311	
		SN	0.4	0.100	0.050	0.025	
25°C	WP-5D	Vid.	4.6	1.156	0.578	0.289	
		SN	0.5	0.123	0.061	0.031	
20/15°C	WP-5D	Vid.	3.8	0.941	0.470	0.235	
		SN	2.9	0.716	0.358	0.179	
25/10°C	WP-5D	Vid.	4.6	1.144	0.572	0.286	
		SN	1.5	0.373	0.187	0.093	

Temperatūra	barotne		Sausā ekstrakta koncentrācijas antimikrobiālās aktivitātes testā, mg/ ml				
			100% konc	25%	12.5%	6.25%	
BC kallusi	25°C	MS-2D	Vid.	3.8	0.944	0.472	0.236
			SN	0.4	0.096	0.048	0.024
	20/15°C	MS-2D	Vid.	4.5	1.128	0.564	0.282
			SN	0.2	0.051	0.025	0.013
	25/10°C	MS-2D	Vid.	4.8	1.211	0.606	0.303
			SN	1.3	0.328	0.164	0.082
	25°C	WP-2D	Vid.	3.4	0.850	0.425	0.212
			SN	0.2	0.044	0.022	0.011
	20/15°C	WP-2D	Vid.	3.9	0.967	0.483	0.242
			SN	0.3	0.076	0.038	0.019
	25/10°C	WP-2D	Vid.	3.8	0.956	0.478	0.239
			SN	0.6	0.151	0.076	0.038
	25°C	WP-2D5	Vid.	3.4	0.839	0.419	0.210
			SN	1.2	0.299	0.150	0.075
	20/15°C	WP-2D5	Vid.	5.2	1.289	0.644	0.322
			SN	1.4	0.338	0.169	0.084
	25/10°C	WP-2D5	Vid.	4.2	1.044	0.522	0.261
			SN	0.1	0.019	0.010	0.005
	25°C	MS-5D	Vid.	3.7	0.928	0.464	0.232
			SN	0.4	0.108	0.054	0.027
20/15°C	MS-5D	Vid.	4.5	1.117	0.558	0.279	
		SN	0.2	0.044	0.022	0.011	
25/10°C	MS-5D	Vid.	4.4	1.100	0.550	0.275	
		SN	0.3	0.076	0.038	0.019	
25°C	WP-5D	Vid.	4.2	1.039	0.519	0.260	
		SN	1.1	0.264	0.132	0.066	
20/15°C	WP-5D	Vid.	4.5	1.117	0.558	0.279	
		SN	0.8	0.196	0.098	0.049	
25/10°C	WP-5D	Vid.	5.8	1.439	0.719	0.360	
		SN	0.5	0.135	0.067	0.034	
Augi	DK lapas	Vid.	5.1	1.267	0.633	0.317	
		SN	0.4	0.101	0.051	0.025	
	DK ogas	Vid.	6.9	1.722	0.861	0.431	
		SN	0.3	0.069	0.035	0.017	
	BC lapas	Vid.	4.8	1.2	0.6	0.3	
		SN	0.2	0.05	0.025	0.0125	

Maģistra darbs „Barotņu sastāva un augšanas temperatūru variāciju ietekme uz krūmmelleņu *Vaccinium corymbosum* kallusu ekstraktu antioksidatīvo un antimikrobiālo aktivitāti” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Dora Livkiša *paraksts* 04.06.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Asoc.prof. Nils Rostoks *paraksts* _____.____._____.

Recenzents: *paraksts* asoc. prof., Dr.biol. Reinis Rutkis

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 04.06.2021.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. _____, vērtējums

Komisijas sekretārs/e: