



Uniwersytet Rzeszowski

## ROZPRAWA DOKTORSKA

**Fumigacja gazowym ozonem roślin jagody kamczackiej oraz  
haskapu japońskiego jako alternatywna metoda ochrony  
roślin przed chorobami grzybowymi oraz poprawy jakości  
owoców i wydłużenia czasu ich przechowywania**

**Fumigation of Kamchatka berry and Japanese haskap plants  
with gaseous ozone as an alternative method of protecting  
plants against fungal diseases and improving the quality of the  
fruit and extending their storage time**

mgr inż. Oskar Basara

Opracowanie stanowi rozprawę doktorską w dziedzinie nauk rolniczych,  
dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

Promotor: prof. dr hab. inż. Józef Gorzelany

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Natalia Matłok, prof. UR

Rzeszów, 2025

*Składam najserdeczniejsze wyrazy wdzięczności  
Panu prof. dr hab. inż. Józefowi Gorzelanemu  
oraz Pani dr hab. inż. Natalii Matłok prof. UR za  
cenne uwagi przekazywane w dużym spokoju, za  
wszechstronną pomoc, która była dużym  
wsparciem podczas pisania niniejszej pracy, a  
także za cały poświęcony czas.*

## SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	5
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM .....	9
1. WPROWADZENIE .....	12
2. PRZEGLĄD AKTUALNEGO STANU WIEDZY.....	14
2.1. Charakterystyka <i>L. caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i> oraz <i>L. caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i> .....	14
2.2. Agrotechnika uprawy i wskaźniki stanu fizjologicznego roślin.....	15
2.3. Właściwości prozdrowotne owoców .....	16
2.4. Właściwości mechaniczne owoców.....	16
2.5. Wykorzystanie ozonu w rolnictwie.....	17
2.6. Produkcja materiału nasadzeniowego roślin jagodowych .....	18
3. WYKAZ POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH ...	21
4. CEL I ZAKRES BADAŃ.....	22
4.1. Cel badań .....	22
4.2. Zadania badawcze.....	22
5. HIPOTEZY BADAWCZE.....	23
Publikacja 1 - Impact of ozone exposure on chlorophyll fluorescence, pigment content and leaf gas exchange on <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i> .....	25
Publikacja 2 - Assessment of selected chemical and morphological properties of <i>Lonicera</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera</i> var. <i>emphyllocalyx</i> treated with gaseous ozone.....	30
Publikacja 3 - Investigating the effect of ozonation on the mechanical parameters of <i>Lonicera caerulea</i> L. fruits using machine learning.....	35
Publikacja 4 - Assessment of micropropagation possibilities for japanese hascap ( <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i> L.).....	38
7. PODSUMOWANIE .....	40
8. Bibliografia .....	43
9. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO .....	51

## WYKAZ SKRÓTÓW

TPC – całkowita zawartość związków fenolowych

TA – kwasowość ogólna

Fv/Fm – Maksymalna efektywność fotosystemu II (PSII)

Mo - Szybkość zamykania PSII

PI total – Wskaźnik funkcjonowania PSII

ChlM - Zawartość chlorofilu

FlvM - Zawartość flawonoli

AnthM - Zawartość antocyjanów

NFI - Wskaźnik azotowo-flawonolowy

E – transpiracja

Ci - stężenie CO<sub>2</sub> w liściu

Gs - przewodnictwo szparkowe

ST – wierzchołek pędu

NF – fragment międzywęzłowy rośliny

BA - 6-benzyladenina

IBA – kwas indolilomasłowy

mT - meta-topolina

MAPE - błąd średni bezwzględny procentowy

## STRESZCZENIE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej, przedstawionej w formie cyklu powiązanych tematycznie artykułów, była ocena skuteczności fumigacji gazowym ozonem jako alternatywnej metody ochrony roślin przed chorobami grzybowymi u wybranych trzech odmian jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*) oraz jednej odmiany i dwóch klonów haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) w latach 2021–2024. W okresie wegetacji ocenie poddano wybrane wskaźniki fizjologiczne roślin, będące markerami ich zdrowotności. Dodatkowo określono wpływ proponowanej metody na właściwości mechaniczne i biologiczne owoców bezpośrednio po zbiorze oraz w czasie przechowywania, ze szczególnym uwzględnieniem poprawy jakości oraz wydłużenia ich trwałości pozbiorczej. Istotnym elementem pracy było również przedstawienie potencjału mikrorozmnażania *in vitro* w produkcji eksplantatów haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*).

Pierwszym etapem badań było określenie wpływu zastosowanych dawek gazowego ozonu na wybrane cechy fizjologiczne roślin, będące wskaźnikami kondycji i zdrowotności roślin, w tym szczególnie w aspekcie chorób grzybowych. Badania opisane w publikacji 1 obejmowały analizę krzywej indukcji OJIP (Fv/Fm, Mo, PI<sub>total</sub>), analizę zawartości ChlM, FlvM i AnthM, oraz indeksu NFI, a także analizę wybranych parametrów wymiany gazowej liści (E, Ci, Gs). Uzyskane wyniki badań wykazały, iż zastosowanie ozonowania nie wpłynęło istotnie na zróżnicowanie większości analizowanych parametrów fizjologicznych roślin badanych odmian *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz odmiany i klonów *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Istotne różnice średniej wartości cech fizjologicznych oraz wskaźników wymiany gazowej roślin względem próby kontrolnej występowały jedynie przy zastosowaniu najwyższej dawki ozonu (5 ppm przez 5 min). Średnia wartość wskaźnika PI<sub>total</sub> istotnie zmniejszyła się po zastosowaniu gazowego ozonu w dawce 5 ppm przez 5 min, w przypadku *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* dla klonu '139-24' oraz odmiany Lori w 2022 roku, w odniesieniu do próby kontrolnej. Jednocześnie odnotowano istotne zmniejszenie wartości wskaźnika E dla tej samej dawki ozonu u roślin klonu '21-17' *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* we wszystkich latach prowadzenia doświadczenia, w porównaniu do próby kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wyników badań oraz pomiarów, stwierdzono, że zaproponowane dawki gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin celem ochrony przed patogenami grzybowymi nie wywołały efektu fitotoksycznego.

Najlepsze rezultaty kondycji i zdrowotności roślin określanej wskaźnikami fluorescencji chlorofilu oraz wymiany gazowej odnotowano dla roślin *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* traktowanych gazowym ozonem o stężeniu 5 ppm przez 1 i 3 min.

W kolejnym etapie badań określono wpływ fumigacji gazowym ozonem na właściwości biologiczne owoców jagody kamczackiej oraz haskapu japońskiego (publikacja 2). Określono wpływ zaproponowanych dawek gazowego ozonu na zawartość witaminy C, całkowitą zawartość związków fenolowych oraz potencjał antyoksydacyjny badanych owoców. Ponadto oceniono wpływ przeprowadzonych zabiegów fumigacji roślin gazowym ozonem na wybrane parametry morfologiczne zebranych owoców. Wyniki uzyskane w toku prowadzonych badań pozwoliły stwierdzić różnice pomiędzy zawartością wybranych związków bioaktywnych w owocach badanych podgatunków *Lonicera caerulea* L., jednakże różnice te zależne były od sezonu wegetacyjnego, odmiany lub klonu, oraz testowanej dawkami gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin. Stwierdzono, że zastosowane dawki gazowego ozonu wpłynęły istotnie na kształtowanie całkowitej zawartości związków fenolowych oraz potencjału antyoksydacyjnego badanych owoców. Jednocześnie wykazano, że najlepsze rezultaty osiągnięto w przypadku owoców pobranych z roślin traktowanych gazowym ozonem w dawce 5 ppm przez 3 min. Całkowita zawartość związków fenolowych w owocach dla tego wariantu doświadczenia zwiększyła się o 11,5%, w odniesieniu do zawartości odnotowanej dla próby kontrolnej. Po zastosowaniu ozonu w dawce 5 ppm przez 5 min odnotowano wzrost potencjału antyoksydacyjnego FRAP i ABTS odpowiednio: o 6,7% oraz 6,1%, w porównaniu do potencjału owoców z próby kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, iż zastosowanie odpowiednio dobranych dawek gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin *Lonicera caerulea* L. może kształtować wartość biologiczną produkowanych owoców.

Następnym krokiem badawczym było określenie przydatności procesu ozonowania roślin *Lonicera caerulea* L. do przedłużania trwałości przechowalniczej zebranych owoców. W tym celu określano wpływ proponowanych dawek gazowego ozonu na wybrane właściwości morfologiczne i mechaniczne owoców *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* (publikacja 3). Przeprowadzono pomiary jednoosiowego przebiecia stemplem skórki oraz miąższu owoców jako wskaźnika trwałości owoców w łańcuchu dostaw w tym podczas

przechowywania. Przeprowadzone badania pozwoliły określić, że owoce badanej odmiany i klonów haskapu japońskiego charakteryzowały się większą odpornością na przebicie skórki i miąższu, w porównaniu do wybranych odmian jagody kamczackiej, co jest determinantem lepszej ich odporności na zbiór, transport i potencjalne magazynowanie. Należy jednak zaznaczyć, że odnotowane wartości siły niszczącej w obrębie danego podgatunku były zróżnicowane w zależności od odmiany i klonu. Testowane dawki gazowego ozonu w procesie fumigacji badanych roślin wpłynęły na wybrane parametry mechaniczne owoców. Wpływ ten jednak był zróżnicowany w zależności od czasu prowadzenia zabiegu. Najlepszą odpornością na uszkodzenia mechaniczne odznaczały się owoce *Lonicera caerulea* L. poddane fumigacji gazowym ozonem o stężeniu 5 ppm przez 3 min. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować iż, zastosowanie odpowiedniej dawki ozonu może przyczynić się do produkcji owoców o polepszonych właściwościach mechanicznych, bezpośrednio zapewniając lepszą trwałość przechowalniczą owoców. Dodatkowo zastosowanie nauczania maszynowego do zaprojektowania dokładnych modeli umożliwiło dokładniejszą interpretację uzyskanych wyników w zakresie oceny odporności owoców na uszkodzenia mechaniczne. Testowane algorytmy uczenia maszynowego dostarczyły jednocześnie dokładne modele do przewidywania deformacji i zużycia energii do momentu ich przebicia. Modele te mogą być wykorzystywane w praktyce do projektowania procesów przechowywania owoców jagody kamczackiej oraz haskapu japońskiego produkowanych z wykorzystaniem gazowego ozonu w procesie fumigacji.

Jednym z etapów przeprowadzonych prac badawczych było określenie możliwości mikrorozmnażania haskapu japońskiego, które w praktyce ogrodniczej dotychczasowo nie było stosowane. W publikacji 4 zaprezentowano wyniki dotyczące wpływu wybranych fragmentów rośliny do inicjacji kultur, substancji wzrostowych (IBA, BA, mT) i niskiej (4°C) temperatury na wzrost i rozwój nowotworzonego materiału nasadzeniowego w procesie mikrorozmnażania. Na podstawie uzyskanych wyników z przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że znacznie więcej eksplantatów ST niż NF rozpoczęło widoczny wzrost w fazie proliferacji. Zastosowanie substancji wzrostowej BA w stężeniu 1 mg · dm<sup>-3</sup> pozwoliło na uzyskanie istotnie lepszej zdrowotności roślin, a także na lepszą proliferację kultur, w porównaniu do roślin z próby kontrolnej (mikrorozmnażanie bez dodatku substancji wzrostowej). Ponadto stwierdzono, że zastosowanie niskiej temperatury, na etapie aklimatyzacji nowych roślin, istotnie

wpłynęło na ich przeżywalność. Wpływ ten jednak był zróżnicowany w zależności od odmiany i klonu. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku kultur *in vitro* klonu '139-24'.

**Słowa kluczowe:** *Lonicera caerulea* L., owoce, fumigacja, gazowy ozon, właściwości bioaktywne i mechaniczne, parametry fizjologiczne roślin, nauczanie maszynowe, *in vitro*

## STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

The aim of this doctoral dissertation, presented as a series of thematically related articles, was to evaluate the effectiveness of gaseous ozone fumigation as an alternative method of plant protection against fungal diseases in selected varieties of haskap (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*) and Japanese haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) between 2021 and 2024. Selected plant physiological indicators, which are markers of their health, were assessed. Additionally, the impact of the proposed method on the mechanical and biological properties of the fruit immediately after harvest and during storage was determined, with particular emphasis on improving quality and extending their postharvest shelf life. An important element of the work was also to present the potential of *in vitro* micropropagation in the production of Japanese haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) explants.

The first stage of the study was to determine the effect of the applied doses of gaseous ozone on selected plant physiological traits, which are indicators of plant condition and health, particularly in terms of fungal diseases. The study described in publication 1 included analysis of the OJIP induction curve (Fv/Fm, Mo, PI total), analysis of ChlM, FlvM, and AnthM content, and the NFI index, as well as analysis of selected leaf gas exchange parameters (E, Ci, Gs). The obtained results showed that the use of ozone did not significantly affect the variation in most of the analyzed physiological parameters of the tested *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* cultivars. Significant differences in the mean values of physiological traits and gas exchange indices of plants compared to the control group occurred only with the highest ozone dose (5 ppm for 5 minutes). The mean Pitotal value decreased significantly after the application of gaseous ozone at a dose of 5 ppm for 5 minutes in the case of *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* for the '139-24' clone and the Lori cultivar in 2022, compared to the control sample. At the same time, a significant reduction in the E index value was noted for the same ozone dose in plants of the '21-17' clone of *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* in all years of the experiment, compared to the control sample. Based on the obtained test results and measurements, it was concluded that the proposed doses of gaseous ozone in the process of plant fumigation for protection against fungal pathogens did not cause a phytotoxic effect. The best results in plant condition and health, determined by chlorophyll fluorescence and gas exchange

indices, were recorded for *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* treated with ozone gas at a concentration of 5 ppm for 1 and 3 min.

The next stage of the study involved determining the effect of gaseous ozone fumigation on the biological properties of the studied varieties and clones of *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* (publication 2). The effect of the proposed gaseous ozone doses on the vitamin C content, total phenolic compound content, and antioxidant potential of the studied fruits was determined. Furthermore, the effect of gaseous ozone fumigation on selected morphological parameters of the harvested fruits was assessed. The results obtained during the study revealed differences in the content of selected bioactive compounds in the fruits of the studied *Lonicera caerulea* L. subspecies. However, these differences depended on the growing season, variety or clone, and the gaseous ozone doses tested during the plant fumigation process. It was found that the tested gaseous ozone doses significantly influenced the total phenolic compound content and antioxidant potential of the studied fruits. At the same time, it was shown that the best results were achieved for fruit collected from plants treated with gaseous ozone at a dose of 5 ppm for 3 minutes. The total phenolic compound content for the tested fruits of this experimental variant increased by 11,5%, compared to the content recorded for the control sample. After the application of ozone at a dose of 5 ppm for 5 min, an increase in the antioxidant potential of FRAP and ABTS was noted by 6.7% and 6.1%, respectively, compared to the potential of the fruit from the control sample. Based on the obtained research results, it was concluded that the use of appropriately selected doses of gaseous ozone in the fumigation process of *Lonicera caerulea* L. plants can shape the biological value of the produced fruit.

The next research step was to determine the suitability of ozonation of *Lonicera caerulea* L. plants for extending the storage life of harvested fruit. To this end, the effect of proposed ozone gas doses on selected morphological and mechanical properties of *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* was determined (publication 3). Uniaxial puncture resistance of the fruit skin and flesh was measured as an indicator of fruit durability throughout the supply chain, including during storage. The study determined that the fruits of the studied Japanese haskap cultivars and clones were characterized by greater resistance to puncture of the skin and flesh compared to haskap, which determines their improved resistance to harvesting, transport, and potential storage. However, it should be noted that the observed values of destructive

force within a given subspecies varied depending on the cultivar and clone. The tested doses of gaseous ozone during the fumigation of the studied plants affected the mechanical parameters of the fruit. However, this effect varied depending on the duration of the treatment. The best resistance to mechanical damage was demonstrated by *Lonicera caerulea* L. fruits fumigated with gaseous ozone at a concentration of 5 ppm for 3 minutes. Based on the obtained results, it can be concluded that applying an appropriate dose of ozone can contribute to the production of fruit with improved mechanical properties, which directly translates into improved storage stability. Furthermore, the use of machine learning to design accurate models enabled a more accurate interpretation of the obtained results regarding the assessment of fruit resistance to mechanical damage. The tested machine learning algorithms also provided accurate models for predicting deformation and energy consumption until puncture. These models can be used in practice to design storage processes for *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* fruits produced using gaseous ozone during the fumigation process.

One of the research stages was to determine the potential for micropropagation of Japanese haskap, a method previously unused in horticultural practice. Publication 4 presents result on the effects of selected plant fragments, growth substances (IBA, BA, mT), and low temperature (4°C) on the growth and development of newly created planting material during micropropagation. Based on the experimental results, it was demonstrated that significantly more ST explants than NF explants began visible growth in the proliferation phase. The use of BA growth substance at a concentration of 1 mg · dm<sup>-3</sup> resulted in significantly better plant health and improved proliferation of the cultures compared to the control plants (micropropagation without the addition of growth substance). Furthermore, the use of low temperature during the acclimation phase of new plants significantly affected their survival. However, this effect varied depending on the variety and clone. The best results were obtained with *in vitro* cultures of the clone ‘139-24’.

Keywords: *Lonicera caerulea* L., fruit, fumigation, gaseous ozone, bioactive and mechanical properties, plant physiological parameters, machine learning, *in vitro*

## 1. WPROWADZENIE

Sadownictwo stanowi istotny element produkcji roślinnej w Polsce. W latach 2020–2024 całkowite zbiory owoców ogółem były zróżnicowane i wynosiły odpowiednio: 4,4 mln t (2020), 4,97 mln t (2021), 5,4 mln t (2022), 4,92 mln t (2023) do 4,1 mln t (2024). Największy udział w produkcji stanowiły jabłka, całkowity udział mieścił się w przedziale od 3,9 mln t w 2020, do 4,8 mln t w 2022. Inne owoce z drzew (wiśnie, śliwki, gruszki) są produkowane w znacznie mniejszej ilości (gov.pl1, stat.gov.pl). Owoce jagodowe (truskawki, maliny, borówki, porzeczki) stanowiły ok. 12-15% produkcji ogółem. Polska jest znaczącym producentem owoców jagodowych w UE - druga w UE w produkcji porzeczek, czwarta w światowej produkcji malin i wiśni w tym bardzo znacząca w borówce wysokiej (hortidaily.com, syngenta.pl). Produkcja owoców jagodowych jest ważna dla przetwórstwa i eksportu mrożonych owoców (gov.pl2). W Polsce w analizowanych latach, produkcja owoców jagodowych zmniejszała się z każdym rokiem w wyniku zmieniających się warunków produkcji oraz nowo powstających regulacji prawnych (Klepcka i in. 2022, GUS 2024). Produkcja poszczególnych gatunków roślin jagodowych różni się istotnie pod względem charakterystyki uprawy, co może znacznie wpłynąć na opłacalność produkcji. Dobór odpowiedniego gatunku do warunków uprawy znacznie przyczynia się do zmniejszenia nakładów pracy (Brondino 2022, Błaszczak 2022, Rysz i in. 2023). Spośród znanych gatunków roślin jagodowych coraz większą popularność zyskuje wiciokrzew siny, szerzej znany jako jagoda kamczacka - *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*. Owoce tego gatunku, w naszym kraju nazywane są „polskim superowocem”, ponieważ stanowią wartościowy składnik preparatów leczniczych lub suplementów diety, dzięki zawartości cennych związków bioaktywnych (Sokół Łetowska 2024, Majchrzak i in. 2024). Popularność zyskuje także podgatunek (odmiana botaniczna) *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*, czyli haskap japoński, charakteryzujący się nieco innymi owocami, a także późniejszym dojrzewaniem (Cheng 2023, Guo 2024). Dane z 2024 wskazują, że łączny areał wszystkich upraw jagodowych (truskawki, maliny, porzeczki i jagody kamczackiej) w Polsce przekracza 106 tys. ha, co oznacza, że jagoda kamczacka stanowi istotny jego komponent i uczestniczy w dynamicznym wzroście nowoczesnych upraw. Gatunek nabiera znaczenia ze względu na mechanizację zbiorów, trend przemysłowy i rosnący udział w konsumpcji świeżej i przetworzonej (polskiesuperowoce.pl, money.pl).

Współczesne sadownictwo opiera się na naukowej wiedzy, wykorzystaniu nowoczesnych technologii oraz precyzyjnych metod uprawy, co pozwala osiągać wysokie i jakościowe plony. Duży nacisk kładzie się na integrowane rozwiązania, które łączą postęp technologiczny i biologiczny, minimalizując negatywne skutki dla środowiska i zdrowia ludzi (Khobragade i in. 2021, Bhati 2024). Nowoczesne sadownictwo koncentruje się na hodowli odmian, które cechują się odpornością na choroby, są dobrze dopasowane do lokalnych warunków klimatycznych oraz wyróżniają się wysoką jakością owoców. W ramach nowoczesnego sadownictwa ogranicza się stosowanie syntetycznych środków ochrony roślin i nawozów mineralnych, a główny nacisk kładzie się na zrównoważone metody uprawy, takie jak wybór gatunków odpornych na choroby oraz ograniczanie użycia środków chemicznych w ochronie roślin (Khan i in. 2021, Finger 2024). Europejski Zielony Ład, opracowany przez Komisję Europejską, to plan rozwoju rolnictwa i terenów wiejskich. Jego kluczowe elementy to strategie „Od pola do stołu” oraz „Unijna strategia na rzecz bioróżnorodności” (European Comision 2020a, European Comision 2020b). Projekt ten przewiduje surowe ograniczenia dla rolnictwa, takie jak zmniejszenie do 2030 roku stosowania środków ochrony roślin o 50%, nawozów mineralnych o 20% oraz strat składników odżywczych o 50%, przy jednoczesnym zachowaniu żyzności gleby. Założenia Zielonego Ładu są bezpośrednio powiązane z ciągłym rozwojem nowoczesnego rolnictwa integrowanego, które umożliwia poprawę jakości surowca na wszystkich etapach ciągu logistycznego uprawy sadowniczej (Wrzaszcz 2023, Klepacka i in. 2022).

Zastosowanie gazowego ozonu ze względu na jego bardzo szybki rozkład i brak pozostałości po zastosowaniu, umożliwia potencjalne wykorzystanie podczas uprawy wybranych gatunków roślin, a także w trakcie większości etapów łańcucha logistycznego w produkcji sadowniczej (Fan i in. 2020, Dubey 2022, Kuźniar i in. 2022). Wdrożenie gazowego ozonu do produkcji sadowniczej nie narusza zasad ekologicznej uprawy, w której syntetyczne środki ochrony roślin podlegają regulacjom. Ozon działa bakteriobójczo, grzybobójczo i wirusobójczo, a także wykazuje wysoką skuteczność w eliminacji m.in. patogenów powodujących pleśnienie i psucie się owoców. Ponadto odpowiednio przeprowadzone zabiegi ozonowania owoców klimakterycznych, skutkują zmniejszeniem wydzielania etylenu oraz dwutlenku węgla przez surowce, co może jednocześnie przekładać się na ograniczanie strat magazynowych i zwiększyć trwałość owoców w łańcuchu dostaw. Ze względu na swoje szerokie zastosowanie oraz brak

pozostałości po zabiegu ozonowanie może być ekologiczną metodą ograniczenia strat w produkcji sadowniczej, która będzie się wpisywać w regulacje przewidziane w Zielonym Ładzie.

## 2. PRZEGLĄD AKTUALNEGO STANU WIEDZY

### 2.1. Charakterystyka *L. caerulea* var. *kamtschatica* oraz *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*

Wiciokrzew siny (*Lonicera caerulea* L.) należy do rodzaju *Lonicera* (Caprifoliaceae), który zawiera ponad 200 gatunków występujących w chłodnych regionach Azji Środkowej oraz Dalekiego Wschodu. Większość gatunków to rośliny ozdobne, około 17 z nich produkuje jadalne owoce (Gawroński i in. 2014, Kula i in. 2016). *Lonicera caerulea* L. ma wiele odmian, z których kilka jest szeroko uprawianych, pochodzą z Rosji (*L. caerulea* var. *edulis*, *L. caerulea* var. *kamtschatica*, *L. caerulea* var. *altaica*, *L. caerulea* var. *boczarnikovae*) oraz z wyspy Hokkaido w Japonii (*L. caerulea* var. *emphyllocalyx*) (Maxine 2006, Kucharska i in. 2017).



Rys. 1. Rośliny haskapu japońskiego w trakcie owocowania.

Źródło: Opracowanie własne

Krzewy osiągają wysokość 0,8–2,0 m, wytrzymują temperatury  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i zachowują aktywność biologiczną przez okres nawet 30 lat. Wymagają zewnętrznego zapylacza, aby wydać owoce rok po posadzeniu. Po trzech latach z jednej rośliny można

uzyskać około 500 g owoców. Jagody mają ciemnoniebieski lub ciemnofioletowy kolor, wielkość od 1,5 do 3,0 cm i przeważnie cylindryczny kształt z woskową powłoką (Bieniek 2021). Rośliny jagody kamczackiej wykazują odporność nawet na temperatury poniżej  $-45^{\circ}\text{C}$ , a kwiaty tolerują przymrozki sięgające około  $-8^{\circ}\text{C}$ . Rośliny mają minimalne wymagania nawozowe i glebowe, rosną w glebie o pH gleby 5,5 - 6,0, bez potrzeby stosowania nawożenia azotowego, co pozwala na możliwość uprawy w umiarkowanie żyznej glebie bez intensywnego nawożenia (Tremblay 2019, Wang 2024).

## 2.2. Agrotechnika uprawy i wskaźniki stanu fizjologicznego roślin

Produkcja przemysłowa owoców jagody kamczackiej i haskapu japońskiego prowadzona jest na plantacjach w warunkach polowych. Agrotechnika uprawy jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* L.) opiera się na precyzyjnym zarządzaniu wodą, nawożeniu oraz szeregu zabiegów mających na celu maksymalizację zdrowotności i produktywności roślin. Wskaźniki fizjologiczne roślin takie jak zawartość chlorofilu oraz parametry jego fluorescencji, tempo fotosyntezy, stężenie  $\text{CO}_2$  wewnątrz liści mogą służyć jako markery zdrowotności roślin. Pozwalają one na określenie optymalnych warunków wzrostu i rozwoju roślin nie powodujących stresów (Ge et al. 2024). Utrzymanie odpowiedniej wilgotności podłoża sprzyja uzyskiwaniu optymalnych zawartości chlorofilu w liściach, efektywnej fotosyntezie oraz stabilności czynności fotosystemu II. Stres indukowany suszą powoduje obniżenie intensywności fotosyntezy, ograniczenie przewodnictwa gazowego oraz redukcję fluorescencji chlorofilu (Yan et al. 2024). W uprawie polowej zaleca się jesienne sadzenie (wrzesień–październik), ściółkowanie i stosowanie fertygacji, co wspiera sprawną aktywność fotosyntetyczną liści. Po zbiorach istotne jest utrzymanie aktywności fotosyntetycznej liści poprzez odpowiednie nawożenie dolistnie, co wpływa korzystnie na wykształcenie długich jednorocznych pędów i przygotowanie roślin do kolejnego sezonu wegetacyjnego (Grewal 2020). Wartości poszczególnych parametrów fizjologicznych roślin, mogą się różnić w zależności od badanego gatunku, odmiany czy klonu, a także w zależności od stanowiska uprawy.

### 2.3. Właściwości prozdrowotne owoców

Owoce *Lonicera caerulea* L. są bogate w cukry, kwasy organiczne i związki fenolowe, co ma znaczący wpływ nie tylko na percepcję sensoryczną, ale także na ich prozdrowotne właściwości. Zawartość związków fenolowych, głównej grupy wykazującej aktywność biologiczną, może się różnić w zależności od odmiany i terminu zbioru (dojrzałości). Warunki uprawy (rodzaj gleby i sposób nawożenia) wpływają na zawartość związków bioaktywnych w owocach jagody kamiczackiej (Yu i in. 2023, Żurek i in. 2024). Owoce *Lonicera caerulea* L. charakteryzują się wysoką zawartością witaminy C oraz związków fenolowych, takich jak antocyjany, flawonoidy, proantocyjanidyny i kwasy fenolowe, przy czym dominującą grupą związków fenolowych są antocyjany, głównie cyjanidyno-3-O-glukozyd (Česonienė i in. 2021, Orsavová i in. 2022). Owoce ze względu na swój skład bogaty w związki bioaktywne wykazują szerokie działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, a także przeciwcukrzycowe (Dayar i in. 2021, Zhang i in. 2023). Aby zachować trwałość związków prozdrowotnych, jagody są suszone oraz wykorzystywane do produkcji dżemów, soków i win (Dadan i in. 2022, Chen i in. 2025). Ze względu na wyjątkowe bogactwo związków antocyjanowych, owoce te można uznać za doskonałe źródło oferujące gamę naturalnych barwników. Mają potencjalne zastosowania w różnych sektorach, w tym w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym (Senica i in. 2019, Guoi i in. 2023).

### 2.4. Właściwości mechaniczne owoców

Owoce *Lonicera caerulea* L. można zbierać ręcznie oraz mechanicznie. Ręczny zbiór pozwala na selekcję dojrzałych owoców, co jest istotne przy produkcji deserowej świeżych jagód, jednak jest czasochłonny i kosztowny. Owoce zbierane mechanicznie mogą być wykorzystane w przetwórstwie do produkcji soków, przetworów takich jak dżemy, a także jako naturalnych barwników. Na efektywność zbioru owoców *Lonicera caerulea* L. wpływa wiele czynników związanych zarówno z cechami roślin, jak i warunkami środowiskowymi (Jurikova i in. 2012, Grobelna i in. 2020). Istotną rolę odgrywa odmiana, poszczególne genotypy różnią się terminem dojrzewania, wielkością, jędrnością owoców oraz podatnością na opadanie. Odmiany o twardszej skórce i wyrównanym dojrzewaniu lepiej nadają się do zbioru mechanicznego i dłuższego przechowywania. Ważny jest także pokrój krzewu, formy zwarte i wzniesione ułatwiają lepszy dostęp maszyn zbierających, podczas gdy krzewy rozłożyste mogą utrudniać pracę

i zwiększać straty w czasie zbioru. Kolejnym czynnikiem jest stopień opadania owoców, niektóre odmiany szybko tracą owoce po osiągnięciu dojrzałości, co wymaga szybkiego i skoordynowanego zbioru. Nierównomierne dojrzewanie owoców utrudnia jednorazowe zbiory i może obniżać ich jakość (Ochmian i in. 2012, Leisso i in. 2022).

Owoce jagodowe wykazują wysoką podatność na uszkodzenia mechaniczne powstające w trakcie zbioru i transportu. Dodatkowo są wrażliwe na długotrwałe przechowywanie, nawet w warunkach chłodniczych (Thompson i in. 2018, Surucu-Balci i in. 2021). Zaburzenia w ciągu logistycznym, takie jak nieodpowiednia temperatura przechowywania, niewłaściwy skład atmosfery, zbyt długi czas transportu oraz nieodpowiednie opakowanie mogą prowadzić do zmniejszenia jakości surowca (Polak i in. 2023, Wulczyńska 2024). Owoce *L. caerulea* var. *kamtschatica* oraz *L. caerulea* var. *emphylocalyx* ze względu na szybkie przejrzenie, psucie się, a także swoją małą odporność na uszkodzenia mechaniczne oraz brak ustalonej technologii zbioru i magazynowania, mogą być przechowywane w optymalnych warunkach do 10 dni. Aby zachować wysoką jakość zebranego surowca stawia się szczególny nacisk na zapewnienie odpowiednich warunków podczas całego procesu logistycznego związanego z jego zagospodarowaniem (Kalisz i in. 2023, Lagarda-Clark i in. 2025).

## 2.5. Wykorzystanie ozonu w rolnictwie

Ozon ( $O_3$ ) znajduje coraz szersze zastosowanie w nowoczesnym rolnictwie, głównie ze względu na swoje silne właściwości utleniające, biobójcze i dezynfekujące. Jako gaz występujący naturalnie w atmosferze, w warunkach kontrolowanych może być wykorzystywany jako nietoksyczny i przyjazny dla środowiska środek wspomagający produkcję roślinną, zarówno przed zbiorem, jak i po zbiorze plonów. W rolnictwie ozon stosowany jest głównie w dwóch formach: jako gaz oraz jako substancja rozpuszczona w wodzie (Emberson i in. 2020, Kobayashi 2023).

Gazowy ozon jest wyjątkowo skuteczny w eliminowaniu bakterii, wirusów, a także grzybów zanim przejdą w stan przetrwalnikowy. Z tego powodu znajduje zastosowanie w dezynfekcji powierzchni roślin, ochronie upraw przed chorobami grzybowymi, przedłużaniu trwałości owoców i warzyw, poprawie jakości przechowywanych płodów rolnych oraz w ograniczaniu obecności niepożądanych gazów, takich jak etylen w warunkach magazynowych (Wang i in. 2023). Dzięki temu, że ozon ulega samoistnemu rozkładowi do tlenu, nie pozostawia toksycznych

pozostałości na powierzchni roślin ani w środowisku, czyni go szczególnie atrakcyjnym w rolnictwie ekologicznym. Dodatkowym atutem gazowego ozonu jest jego zdolność do pobudzania mechanizmów obronnych w roślinach. Stymuluje on produkcję związków fenolowych, flawonoidów i antocyjanów, które zwiększają odporność roślin na stres oraz poprawiają ich wartość biologiczną (Botondi i in. 2021). Należy jednak pamiętać, że ozon jako silny utleniacz, może także wywoływać reakcje niepożądane, jeśli zastosuje się go w zbyt wysokim stężeniu lub przez zbyt długi czas. Działanie takie może prowadzić do stresu oksydacyjnego, który z kolei może powodować uszkodzenia tkanek roślinnych, degradację chlorofilu, pogorszenie smaku, utratę jędrności i spadek ogólnej jakości owoców (Piechowiak i in. 2022a, Pinto i in. 2020, Karmakar i in. 2022).

Wykorzystanie gazowego ozonu podczas produkcji sadowniczej może przyczynić się do ograniczania i eliminacji niektórych szkodników roślin oraz patogenów grzybowych. Ozonowanie może mieć podwójne zastosowanie, podczas owocowania całe rośliny mogą być poddane zabiegowi fumigacji, aby zwalczyć potencjalne szkodniki oraz choroby, a także zwiększyć wartość biologiczną owoców oraz poprawić ich właściwości przechowalnicze (Remondino i in. 2018, Fan 2020). Skuteczne wykorzystanie ozonu w ochronie roślin i przechowywaniu owoców wymaga bardzo precyzyjnego doboru parametrów aplikacji, takich jak stężenie, czas ekspozycji oraz warunki środowiskowe, zwłaszcza temperatura i wilgotność. Ozon stanowi cenne narzędzie we współczesnym rolnictwie, umożliwiające redukcję stosowania syntetycznych środków ochrony roślin i poprawę jakości przechowywanej żywności. Gazowy ozon charakteryzuje się bardzo wysoką skutecznością działania i może być stosowany do dezynfekcji całych partii owoców lub roślin w warunkach kontrolowanych (Lemic i in. 2025). Z kolei ozon rozpuszczony w wodzie zapewnia bezpieczniejsze możliwości aplikacji, szczególnie w przypadku produktów spożywczych wymagających łagodnego traktowania. Kluczem do efektywnego i bezpiecznego wykorzystania ozonu w rolnictwie jest jednak precyzyjne dostosowanie parametrów jego użycia do konkretnego gatunku rośliny, etapu rozwoju oraz warunków przechowywania i transportu.

## **2.6. Produkcja materiału nasadzeniowego roślin jagodowych**

Polska jest światowym liderem w uprawie jagody kamczackiej, a także znaczącym producentem sadzonek. Roczna produkcja materiału nasadzeniowego w Polsce obejmuje miliony drzewek i sadzonek w tym znaczącą liczbę krzewów

jagodowych i truskawek. Produkcja zdrowego i certyfikowanego materiału nasadzeniowego (kwalifikowanego, elitarnego, lub CAC) to podstawa sukcesu w uprawach, zapewniająca lepszą zdrowotność, odporność i plonowanie roślin (gov.pl, jagodnik.pl). W 2024 roku wyprodukowano ponad 9 mln sadzonek krzewów jagodowych (kwalifikowanych), w stosunku do roku 2023 był to jednak spadek ilości o 23,6% (stat.gov.pl). Największe udziały w ilości wyprodukowanych sadzonek miały czarna porzeczka, malina oraz borówka wysoka. Choć konkretne liczby sadzonek jagody kameczackiej produkowanych co roku w Polsce nie są powszechnie publikowane, dostępne źródła wskazują na rosnące zainteresowanie tym gatunkiem i rozwojem produkcji szkółkarskiej (Mikuła i in. 2022, Singh i in. 2024). Sadzonki są dostępne i sprzedawane zazwyczaj jako rośliny doniczkowe gotowe do założenia nowych plantacji. Wykorzystanie sadzonek wyprodukowanych metodą *in vitro* (kultur tkankowych) niesie wiele istotnych korzyści, zwłaszcza w nowoczesnym sadownictwie, szkółkarstwie oraz przy produkcji materiału nasadzeniowego roślin jagodowych w tym między innymi: borówki, jagody kameczackiej oraz truskawki (Isac 2012, Kulikova i in. 2021).



Rys. 2. Roślina *Lonicera caerulea* L. podczas różnych etapów produkcji: A) nowo powstałe sadzonki, B) sadzonki z rozwiniętymi pąkami szczytowymi, C) sadzonki, D) rośliny podczas wzrostu w kontenerach, E) rozmnażanie *in vitro*, F) aklimatyzacja w pojemnikach.

Źródło: Opracowanie własne

### 3. WYKAZ POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

L.p.	Publikacja	punkty MNiSW	IF	Udział %
1	Basara, O., Gorzelany, J. (2025). Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphylocalyx</i> . <i>Sustainability</i> , 17, 2820. <a href="https://doi.org/10.3390/su17072820">https://doi.org/10.3390/su17072820</a>	100	3.9	80
2	Basara, O., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of <i>Lonicera</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera</i> var. <i>emphylocalyx</i> Treated with Gaseous Ozone. <i>Molecules</i> , 29, 3616. <a href="https://doi.org/10.3390/molecules29153616">https://doi.org/10.3390/molecules29153616</a>	140	4.2	80
3	Basara, O., Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of <i>Lonicera caerulea</i> L. Fruits Using Machine Learning. <i>Agricultural Engineering</i> , 29, 97-114	40	-	65
4	Basara, O., Litwińczuk, W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap ( <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphylocalyx</i> L.) <i>Appl. Sci.</i> 14, 9452. <a href="https://doi.org/10.3390/app14209452">https://doi.org/10.3390/app14209452</a>	100	2.838	60

Łączna liczba punktów MNiSW za publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu wynosi 380 pkt. Sumaryczny IF dla ww. publikacji zgodnie z rokiem publikowania wynosi IF=10,938.

## 4. CEL I ZAKRES BADAŃ

### 4.1. Cel badań

Celem badań zaprezentowanych w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, była ocena skuteczności fumigacji gazowym ozonem jako alternatywnej metody ochrony roślin przed chorobami grzybowymi u wybranych odmian jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*) oraz haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) w latach 2022–2024. Ocenie poddano wybrane wskaźniki fizjologiczne roślin będące markerami ich zdrowotności. Dodatkowo określono wpływ proponowanej metody na właściwości mechaniczne i biologiczne owoców bezpośrednio po zbiorze oraz w czasie przechowywania, ze szczególnym uwzględnieniem poprawy jakości oraz wydłużenia ich trwałości pozbiorczej. Istotnym elementem pracy było również przedstawienie potencjału mikrorozmnażania *in vitro* w produkcji eksplantatów haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*).

### 4.2. Zadania badawcze

Osiągnięcie powyższego celu wymagało realizacji następujących zadań badawczych:

- Celem badań było określenie wpływu fumigacji gazowym ozonem na zdrowotność roślin *Lonicera caerulea* L. poprzez analizę wybranych parametrów fizjologicznych roślin, w tym głównie fluorescencji chlorofilu liści oraz wskaźników wymiany gazowej roślin.
- Określenie wpływu gazowego ozonu na zawartość związków bioaktywnych w owocach.
- Określenie wpływu gazowego ozonu na wybrane właściwości morfologiczne i mechaniczne, a także trwałość przechowalniczą badanych owoców.
- Ocena wpływu zastosowania wybranych substancji wzrostowych oraz przechowywania kultur *in vitro* w warunkach chłodniczych na wzrost i rozwój eksplantatów haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*).

## 5. HIPOTEZY BADAWCZE

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego sformułowano następujące hipotezy badawcze:

**H1:** Zastosowanie odpowiednio dobranej dawki gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin *Lonicera caerulea* L. przyczyni się do poprawy ich kondycji fizjologicznej oraz ogólnej zdrowotności.

**H2:** Zastosowanie fumigacji gazowym ozonem roślin *Lonicera caerulea* L. zwiększy zawartość związków bioaktywnych w owocach, w tym całkowitą zawartość związków fenolowych, kwasu askorbinowego oraz wartość antyoksydacyjną.

**H3:** Proces ozonowania wpłynie na zwiększenie odporności owoców na uszkodzenia mechaniczne, przez co zwiększy ich trwałość przechowalniczą w łańcuchu dostaw.

**H4:** Wykorzystanie substancji wzrostowej BA i mT, a także przechowywania chłodniczego podczas mikrorozmnażania *in vitro* haskapu japońskiego poprawi zdrowotność oraz proliferację nowo wytwarzanych roślin.

## 6. CYKL PUBLIKACJI NAUKOWYCH I ICH OMÓWIENIE

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu publikacji naukowych, zgodnie z art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje naukowe:

**Publikacja 1:** Basara, O., Gorzelany, J. (2025). Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Sustainability, 17, 2820. <https://doi.org/10.3390/su17072820>

**Publikacja 2:** Basara, O., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. Molecules, 29, 3616. <https://doi.org/10.3390/molecules29153616>

**Publikacja 3:** Basara, O., Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of *Lonicera caerulea* L. Fruits Using Machine Learning. Agricultural Engineering, 29, 97-114

**Publikacja 4:** Basara, O., Litwińczuk, W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.) Appl. Sci.14, 9452. <https://doi.org/10.3390/app14209452>

## **PUBLIKACJA 1 - IMPACT OF OZONE EXPOSURE ON CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, PIGMENT CONTENT AND LEAF GAS EXCHANGE ON *LONICERA CAERULEA* VAR. *KAMTSCHATICA* AND *LONICERA CAERULEA* VAR. *EMPHYLLOCALYX***

Pierwszy artykuł wchodzący w skład pracy doktorskiej został opublikowany w 2025 roku w czasopiśmie *Sustainability* (100 pkt. MNiSW, 3,9 IF), pod tytułem „**Impact of ozone exposure on chlorophyll fluorescence, pigment content and leaf gas exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*”**. Niniejsza publikacja przedstawia wpływ procesu fumigacji gazowym ozonem (trzy dawki) na kondycję i zdrowotność roślin wybranych odmian i klonów *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* w trakcie uprawy.

We wstępie podkreślono, że ozon jest silnym utleniaczem, który w ostatnich latach znajduje coraz szersze zastosowanie, w tym również w rolnictwie. Jego działanie może pozytywnie wpływać na wzrost i zdrowotność roślin, głównie poprzez ograniczanie obecności patogenów. Jednakże w nieodpowiednich dawkach ozon może wywoływać stres fizjologiczny i prowadzić do zakłóceń w procesach metabolicznych roślin. Jako silny czynnik utleniający w nadmiernych stężeniach oraz przy zbyt długim czasie ekspozycji, wykazuje działanie fitotoksyczne, indukując stres oksydacyjny w komórkach roślinnych. Może to prowadzić m.in. do degradacji chlorofilu, uszkodzeń błon komórkowych oraz zaburzeń w funkcjonowaniu aparatów fotosyntetycznych. Z tego względu skuteczne i bezpieczne wykorzystanie ozonu w uprawach sadowniczych wymaga precyzyjnego doboru parametrów aplikacji, w tym przede wszystkim stężenia, czasu ekspozycji oraz warunków środowiskowych, takich jak temperatura i wilgotność (Gulke 2020).

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie uprawą *Lonicera caerulea* L., co wynika przede wszystkim z prozdrowotnych właściwości jej owoców oraz wysokiej odporności krzewów na niskie temperatury. Dynamiczny rozwój produkcji tego gatunku wiąże się jednak z rosnącym zagrożeniem ze strony chorób i szkodników, co generuje potrzebę poszukiwania skutecznych, a zarazem bezpiecznych metod ochrony roślin (Cheng i in. 2023). Jedną z rozważanych alternatyw dla tradycyjnych środków ochrony, takich jak fungicydy, jest zastosowanie procesu ozonowania roślin. Kluczowym zagadnieniem w tym kontekście jest określenie potencjalnych dawek ozonu, które nie

będą wywoływać uszkodzeń fizjologicznych roślin, a jednocześnie pozwolą na skuteczną poprawę kondycji i zdrowotności roślin, w tym ochronę przed patogenami grzybowymi.

Celem pracy była ocena wpływu procesu fumigacji gazowym ozonem na kondycję i zdrowotność roślin wybranych odmian i klonów *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* w trakcie uprawy.

W części dotyczącej wykorzystanych metodyk badawczych opisano schemat prowadzonego doświadczenia oraz wykonane pomiary i analizy, a także zastosowane metody. W ramach realizacji założonych celów i hipotez badawczych przeprowadzono trzyletnie (2021–2023) ścisłe doświadczenie wazonowe w układzie losowym, z dziesięcioma powtórzeniami dla każdego wariantu. W doświadczeniu wykorzystano trzy odmiany *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz jedną odmianę i dwa klony *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Badano wpływ fumigacji gazowym ozonem o stężeniu 5 ppm, stosowanej w trzech różnych czasach ekspozycji: 1, 3 oraz 5 minut. Dawkowanie zostało opracowane na podstawie wcześniejszych testów fitotoksyczności. Zabiegi fumigacyjne przeprowadzono z wykorzystaniem autorskiej, pilotażowej, przenośnej komory fumigacyjnej oraz generatora ozonu KORNOA OZON A40. Stężenie ozonu w komorze kontrolowano podczas zabiegu przy użyciu detektora Ozone Solution 106 M UV. Fumigację prowadzono trzykrotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego: w fazie zawiązywania owoców, w fazie dojrzewania oraz w fazie pełnej dojrzałości zbiorczej. Skuteczność zastosowanego procesu ozonowania jako alternatywnej metody ochrony i poprawy zdrowotności roślin, oceniono na podstawie analizy wybranych wskaźników fizjologicznych świadczących o ich kondycji. Określono względną zawartość chlorofilu (ChlM), flawonoli (FlvM) i antocyjanów (AnthM) w liściach, a także wybrane parametry fluorescencji chlorofilu (Fv/Fm, Mo, PI<sub>total</sub>) oraz wskaźniki wymiany gazowej liści (intensywność transpiracji (E), wewnętrzne stężenie CO<sub>2</sub> w liściu (Ci), przewodnictwo szparkowe (Gs)). Pomiary wykonano 1., 3. oraz 5. dnia po przeprowadzeniu zabiegu ozonowania.

Zaprezentowane w pracy wyniki z przeprowadzonych pomiarów wykazały, że średnia zawartość chlorofilu (ChlM), flawonoli (FlvM) i antocyjanów (AnthM) dla badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* L. wynosiła odpowiednio 0.45, 1.41 i 0.11. Natomiast średnia wartość wskaźnika NFI (indeks flawonowo-azotowy) wynosiła 0.33. Stwierdzono zróżnicowanie w wartościach badanych parametrów w zależności od podgatunku (odmiany botanicznej) *Lonicera caerulea* L. Odmiany *Lonicera caerulea*

var. *kamtschatica* charakteryzowały się wyższą zawartością ChlM, FlvM oraz AnthM niż odmiana i klony *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. Natomiast w przypadku indeksu azotowo-flawonolowego nie odnotowano różnic pomiędzy średnimi wartościami dla badanych podgatunków. Średnia wartość NFI dla obu podgatunków wynosiła 0,33. W zależności od roku uprawy również nie odnotowano istotnych różnic w zawartości barwników roślinnych w liściach badanych roślin *Lonicera caerulea* L.

Wpływ zastosowanego procesu ozonowania roślin *Lonicera caerulea* L. podczas uprawy na zawartość wybranych barwników w liściach był zróżnicowany w zależności od dawki gazowego ozonu oraz terminu wykonania pomiarów (czasu, jaki upłynął od ekspozycji roślin na ozon). W większości przypadków obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Znaczące zmiany w zawartości barwników roślinnych, w odniesieniu do próby kontrolnej, stwierdzono jedynie w przypadku zastosowania fumigacji gazowym ozonem o stężeniu 5 ppm przez 5 minut. Pomimo braku widocznych uszkodzeń morfologicznych, taka dawka ozonu istotnie obniżyła średnią zawartość chlorofilu (ChlM) w liściach, co przełożyło się również na spadek wartości indeksu azotowo-flawonolowego (NFI). W porównaniu z próbą kontrolną, zastosowanie ozonu w stężeniu 5 ppm przez 5 minut spowodowało obniżenie średnich wartości parametrów ChlM i NFI odpowiednio o 6,8% i 8,8%. Najbardziej korzystne rezultaty uzyskano przy zastosowaniu ozonowania roślin trwającego 3 minuty. W tym wariantcie średnia zawartość analizowanych barwników roślinnych dla badanych terminów pomiarów nie różniła się istotnie od średniej zawartości w próbie kontrolnej, co może świadczyć o braku reakcji stresowej ze strony roślin (zaburzeń fizjologicznych), przy jednoczesnym potencjale dezynfekującym tej dawki ozonu, mogącym wspierać ochronę roślin przed patogenami, w szczególności grzybowymi. Obserwacje te zostały potwierdzone przez innych badaczy (Fujiwara i in 2009).

Stres występujący w środowisku wzrostu roślin, w tym m.in. choroby grzybowe, a także nieodpowiednio prowadzony proces ozonowania może prowadzić do obniżenia maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II. Dlatego też w ramach niniejszych badań określono zdrowotność roślin oraz wpływ procesu ozonowania na badane rośliny poprzez pomiary wybranych właściwości fizjologicznych roślin, w tym wydajność fotosystemu II. Maksymalna efektywność fotosystemu II oceniana na podstawie wskaźnika Fv/Fm, dla wszystkich badanych roślin *Lonicera caerulea* L., mieściła się w optymalnym zakresie (0.79–0.84) niezależnie od odmiany, roku wegetacji i zastosowanej

dawki gazowego ozonu, co świadczy jednoznacznie o braku fitotoksycznego działania prowadzonych zabiegów fumigacji gazowym ozonem.

Wartość wskaźnika Mo (stanowiącego miarę szybkości zamykania centrów reakcji fotosystemu II) uzależniona była od badanego podgatunku i odmiany, zastosowanej dawki gazowego ozonu oraz roku prawy. Średnie wartości Mo w liściach jagody kamczackiej i haskapu japońskiego mieściły się w zakresie od 0,43 do 0,56. Zastosowanie gazowego ozonu w zaproponowanych dawkach nie miało istotnego wpływu na średnią wartość parametru Mo u większości badanych roślin LK i LE w analizowanych latach uprawy. Wyjątek stanowiła odmiana 'Jugana', u której w 2022 roku wartość Mo istotnie spadła o 12,3% po ozonowaniu roślin dawką 5 ppm przez 5 minut w odniesieniu do wartości odnotowanej dla próby kontrolnej. Należy jednak zaznaczyć, iż najprawdopodobniej mogło to wynikać z warunków prowadzenia zabiegu ozonowania, ponieważ w kolejnym roku badań odnotowano nieistotny wzrost wartości tego parametru. Natomiast w przypadku odmiany 'Aurora' (jagoda kamczacka) odnotowano istotny wzrost wartości Mo w liściach roślin ozonowanych przez 3 minuty (2022 rok) oraz przez 5 min (2022 i 2023 rok). Wahania wartości parametru Mo w liściach poza optymalne zakres (0,3-0,6) mogą powodować zmiany w procesach fotosyntezy podczas wzrostu roślin (Strasser i in. 2000). Warto podkreślić, że wszystkie odnotowane w badaniu wartości Mo mieściły się w zakresie uznawanym za optymalny, co sugeruje, że fotosystem II funkcjonował prawidłowo w analizowanych warunkach.

Istotnym wskaźnikiem określającym efektywności fotosyntezy u roślin jest całkowity indeks wydajności ( $PI_{total}$ ). Na wartość tego wskaźnika u badanych roślin wpływ miała odmiana, zastosowana dawka ozonu oraz rok uprawy. Dla większości zastosowanych dawek gazowego ozonu, niezależnie od klonu, odmiany oraz roku wegetacji, nie odnotowano istotnych różnic w wartości parametru  $PI_{total}$  w odniesieniu do próby kontrolnej. Istotny wpływ miała jedynie dawka gazowego wynosząca 5 ppm przez 5 min w 2022 roku, która w przypadku klonu '139- 24' (haskap japoński) wpłynęła na spadek badanego parametru o 23,1% w porównaniu do wartości odnotowanej dla próby kontrolnej. Natomiast w 2023 roku dla odmiany 'Lori' aplikacja tej dawki skutkowała obniżeniem wartości  $PI_{total}$  o 23,8% w porównaniu do kontroli. Uzyskane wyniki wskazują, że parametr  $PI_{total}$  może stanowić czuły i przydatny wskaźnik diagnostyczny do oceny reakcji roślin na działanie ozonu, uwzględniając zarówno zmienność genotypową, jak i warunki środowiskowe w poszczególnych sezonach wegetacyjnych.

Wczesną reakcją roślin na stres środowiskowy są zmiany w wymianie gazowej, które mogą wystąpić jeszcze przed redystrybucją (Hasanuzzman i in 2012). Parametry takie jak tempo transpiracji (E), przewodnictwo szparkowe (Gs) oraz międzykomórkowe stężenie CO<sub>2</sub> (Ci) odzwierciedlają rzeczywisty stan fizjologiczny rośliny i mogą wskazywać na wpływ ozonu stosowanego w procesie fumigacji. Wykorzystanie gazowego ozonu w proponowanych dawkach wykazało zróżnicowany wpływ na parametry wymiany gazowej liści *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. Jednakże u większości testowanych odmian i klonów, niezależnie od roku badań, średnie wartości parametrów wymiany gazowej nie uległy istotnym zmianom po fumigacji ozonem. Wyjątek stanowiła dawka 5 ppm przez 5 minut, która spowodowała fluktuacje tempa transpiracji (E) u roślin odmiany ‘Lori’. Dla tej odmiany odnotowano istotny spadek wartości parametru w porównaniu do kontroli, powtarzający się w obu sezonach badawczych. Podobne obserwacje poczyniono dla przewodnictwa szparkowego (Gs), którego wartość nie zmieniała się istotnie w odpowiedzi na większość analizowanych dawek gazowego ozonu. Jedynie najwyższa dawka (5 ppm przez 5 minut) miała istotny wpływ na wzrost Gs u roślin klonu ‘139-24’ w obu latach badań oraz u odmiany ‘Aurora’ w sezonie 2023, w porównaniu z wartością odnotowaną w wariacie kontrolnym. Z kolei wartość międzykomórkowego stężenia CO<sub>2</sub> (Ci) w liściach badanych roślin zależała głównie od testowanej odmiany i klonu. Aplikacja gazowego ozonu w procesie fumigacji modyfikowała wartości Ci, jednak istotne różnice względem kontroli zaobserwowano jedynie w przypadku najwyższej dawki ozonu. U odmiany ‘Lori’ odnotowano istotny spadek wartości Ci w obu sezonach badawczych, co może świadczyć o ograniczeniu dyfuzji CO<sub>2</sub> lub spadku aktywności fotosyntetycznej.

W podsumowaniu pracy wskazano, że dawka 5 ppm ozonu aplikowana przez 5 minut może negatywnie wpływać na procesy fizjologiczne u niektórych genotypów *Lonicera*, mimo ogólnej tolerancji większości odmian na działanie ozonu w badanych stężeniach. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ozon stosowany w dawce nieprzekraczającej 5 ppm przez 5 minut nie wykazuje działania fitotoksycznego wobec większości badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* L. Oznacza to, że może być bezpiecznie wykorzystywany w praktyce agrotechnicznej, bez istotnego wpływu na podstawowe parametry fizjologiczne roślin. Zastosowanie ozonowania jako elementu strategii ochrony roślin może stanowić perspektywiczną technologię wspomagającą

uprawę *Lonicera caerulea* L., m.in. w zwalczaniu patogenów grzybowych. Na podstawie prowadzonych badań i obserwacji roślin *Lonicera caerulea* L. na założonym doświadczeniu w analizowanych latach badań nie stwierdzono występowania patogenów grzybowych na roślinach poddanych procesowi ozonowania jak również na kontroli. Jednak w przypadku wystąpienia takich patogenów rozwój i optymalizacja tej technologii mogą przyczynić się do poprawy zdrowotności roślin oraz jakości plonu. Niemniej jednak wskazane jest kontynuowanie badań, ze szczególnym uwzględnieniem długoterminowego wpływu ozonu na fizjologię, biochemię oraz odpowiedzi molekularne roślin z rodzaju *Lonicera*.

## **PUBLIKACJA 2 - ASSESSMENT OF SELECTED CHEMICAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF *LONICERA VAR. KAMTSCHATICA* AND *LONICERA VAR. EMPHYLLOCALYX* TREATED WITH GASEOUS OZONE**

Drugi artykuł wchodzący w skład pracy doktorskiej został opublikowany w 2024 roku w czasopiśmie *Molecules* (140 pkt. MNiSW, 4,2 IF), pod tytułem „Assessment of selected chemical and morphological properties of *Lonicera var. kamtschatica* and *Lonicera var. emphylocalyx* treated with gaseous ozone. Niniejsza publikacja przedstawia wpływ procesu fumigacji gazowym ozonem (stężenie 5 pmm) stosowanego w różnych czasach ekspozycji (1, 3 i 5 minut) na wartość biologiczną (zawartość związków fenolowych, witaminy C oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny) oraz właściwości morfologiczne i prozdrowotne owoców wybranych klonów i odmian *Lonicera caerulea* L.

We wstępie podkreślono, iż zabieg fumigacji roślin gazowym ozonem może wpływać nie tylko na parametry fizjologiczne roślin (opisane w publikacji [1]), ale także modyfikować jakość produkowanych owoców. Ozon, aplikowany w odpowiednio dobranej dawce może kształtować przebieg procesów metabolicznych, zwiększając zawartość związków bioaktywnych oraz poprawiając właściwości antyoksydacyjne owoców. Ponadto, właściwie przeprowadzony proces ozonowania może przyczynić się do wydłużenia trwałości surowców roślinnych w łańcuchu dostaw poprzez ograniczenie utraty wody, redukcję obciążenia mikrobiologicznego oraz zmniejszenie emisji etylenu z owoców poddanych zabiegowi, co w efekcie przekłada się na dłuższy okres przydatności do spożycia (Piechowiak i in. 2022b, Fan 2021, Zapałowska i in 2021).

W ostatnich latach zauważa się zwiększone zainteresowanie *Lonicera caerulea* L. wynika to zarówno z wysokiej wartości prozdrowotnej owoców oraz możliwości ich wykorzystania w przetwórstwie. Jagody tych roślin są znane z wysokiej zawartości witaminy C, antocyjanów i polifenoli, co kształtuje ich właściwości przeciwutleniające i prozdrowotne. Popularność uprawy tej rośliny pociąga za sobą konieczność doboru odmian o największym potencjale gospodarczym, a ich znaczenie wynika bezpośrednio z wartości biologicznej owoców. Zaadaptowanie odpowiednio dobranych dawek ozonu może mieć istotny wpływ na poprawę ich wartości biologicznej, co może stanowić alternatywny zabieg mający na celu zwiększenie potencjału gospodarczego owoców (Rupasinghe i in. 2012).

Celem pracy była ocena wpływu procesu fumigacji gazowym ozonem, stosowanym w różnych dawkach (5 ppm) i czasach ekspozycji (1, 3 i 5 minut) na wartość biologiczną oraz właściwości morfologiczne i prozdrowotne owoców wybranych klonów i odmian *Lonicera caerulea* L.

W części dotyczącej wykorzystanych metodyk badawczych opisano przeprowadzone analizy oraz zastosowane metody. Owoce wykorzystane w niniejszym badaniu pozyskano z roślin uprawianych w ramach ścisłego doświadczenia wazonowego (po 100 g z każdego wariantu doświadczenia), którego szczegółowy przebieg został opisany w publikacji [1]. Materiał owocowy pochodził z roślin *Lonicera caerulea* L. poddanych fumigacji gazowym ozonem (5 ppm) przy różnych czasach ekspozycji (1, 3 i 5 minut). Próby owoców pobrano 24 godziny po zabiegu ozonowania w fazie pełnej dojrzałości zbiorczej, w celu określenia wpływu procesu fumigacji na wybrane właściwości biologiczne i morfologiczne. Wpływ zastosowanego ozonowania na wartość biologiczną owoców wybranych odmian wiciokrzewu siniego (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* i *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) oceniono na podstawie oznaczenia zawartości związków fenolowych, kwasu askorbinowego oraz właściwości antyoksydacyjnych. Dodatkowo określono pH oraz kwasowość ogólną owoców ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) zgodnie z normą PN-EN 12147:2000, które mają istotne znaczenie sensoryczne. Zawartość kwasu askorbinowego ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) oznaczono zgodnie z normą PN-A-04019:1998, a całkowitą zawartość związków fenolowych ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) metodą Folina–Ciocalteu. Właściwości antyoksydacyjne oznaczono trzema metodami: DPPH (procent inhibicji), FRAP ( $\mu\text{M Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ ) oraz ABTS ( $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Dodatkowo przeprowadzono ocenę cech morfologicznych owoców, obejmującą pomiar ich długości, szerokości oraz

masy. Analizę barwy owoców wykonano w systemie kolorymetrycznym CIE LAB. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczenia. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA) oraz testu istotności różnic Tukeya ( $p \leq 0,05$ ).

Zaprezentowane w pracy wyniki z przeprowadzonych analiz wykazały, że wartość pH oraz kwasowość ogólna owoców wykazywały zróżnicowanie w zależności od badanego podgatunku *Lonicera caerulea* L. Owoce *L. emphylocalyx* charakteryzowały się średnio o 6% niższym pH w porównaniu z owocami odmian *L. kamtschatica*. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku kwasowości ogólnej, co wynika z uwarunkowań odmianowych. W zależności od roku prowadzenia doświadczenia, w sezonach 2023–2024 odnotowano istotnie wyższą średnią kwasowość ogólną owoców badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* L. ( $2,35 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) w porównaniu do roku 2022, w którym wartość ta wynosiła  $1,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Z kolei wartość pH była istotnie wyższa dla owoców zebranych w roku 2023. Natomiast zastosowane dawki gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* L. nie miały istotnego wpływu na pH i kwasowość ogólną zebranych owoców. W dalszej części pracy zaprezentowano wyniki dotyczące wpływu procesu ozonowania na zawartość związków bioaktywnych w owocach, w tym witaminy C, zawartość związków fenolowych oraz oceny aktywności antyoksydacyjnej mierzonej metodami FRAP, DPPH i ABTS. Stwierdzono, iż w przypadku badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* i *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* wpływ na zawartość wybranych związków bioaktywnych w owocach miała zastosowana dawka gazowego ozonu w procesie fumigacji roślin, rok uprawy oraz badana odmiana oraz klon. Spośród badanych odmian oraz klonów, bez względu na roku produkcji oraz dawkę ozonu, najwyższą zawartość witaminy C stwierdzono w owocach klonu ‘21-17’ –  $57.80 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Ozonowanie nie miało istotnego wpływu na zawartość witaminy C w owocach badanych odmian niezależnie do zastosowanej dawki gazowego ozonu. Zaobserwowano jednak wyraźne różnice między latami uprawy, w 2023 roku średnia zawartość witaminy C dla danych odmian i klonów *Lonicera caerulea* L. była istotnie niższa w porównaniu do roku 2022 oraz 2024. Najprawdopodobniej wynikało to z warunków meteorologicznych panujących w trakcie okresu wegetacji.

Związki fenolowe obecne w owocach pełnią istotną rolę biologiczną, wykazując silne właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne oraz wspierające ochronę

organizmu przed stresem oksydacyjnym i chorobami cywilizacyjnymi (Ochmian i in. 2008). Oznaczona zawartość tych związków w owocach wiciokrzewu sinego wskazuje, że ich koncentracja zależna jest od podgatunku, odmiany i klonu. Średnia całkowita zawartość związków fenolowych w owocach *L. kamtschatica* i *L. emphylocalyx* wahała się od 261,38 do 310,12 mg·100 g<sup>-1</sup> i od 231,59 do 286,92 mg·100 g<sup>-1</sup>. Największą zawartość tych cennych związków identyfikowano w owocach jagody kamczackiej odmiany ‘Vostorg’ (310,12 mg·100 g<sup>-1</sup>). Najniższa natomiast była w owocach haskapu japońskiego klon ‘139-24’ (231.59 mg·100 g<sup>-1</sup>).

Prowadzone w trakcie wegetacji zabiegi fumigacji roślin gazowym ozonem kształtowały zawartość związków fenolowych w owocach wiciokrzewu sinego. Stwierdzono istotny wpływ zastosowanych dawek gazowego ozonu na wzrost zawartości tych związków w owocach w porównaniu do próby kontrolnej (bez fumigacji). Najlepsze rezultaty osiągnięto jednak prowadząc proces fumigacji przez 3 min (stężenie 5 ppm). Średnia całkowita zawartość związków fenolowych w owocach wiciokrzewu sinego traktowanych tą dawką była wyższa o 11,5% w odniesieniu do zawartości odnotowanej na kontroli.

Właściwości antyoksydacyjne owoców, związane przede wszystkim z obecnością związków fenolowych, mogą ulegać modyfikacjom w wyniku ozonowania roślin, które stymuluje biosyntezę związków bioaktywnych, zwiększając ich zdolność do neutralizacji wolnych rodników oraz ochrony przed stresem oksydacyjnym (Ochmian i in 2012). Średnia aktywność antyoksydacyjna owoców wiciokrzewu sinego wykazywała zróżnicowanie w zależności od podgatunku, odmiany oraz klonu. Aktywność antyoksydacyjna mierzona metodą FRAP w owocach *L. kamtschatica* wynosiła od 25,42 do 28,97 μM Fe<sup>2+</sup>·g<sup>-1</sup>, natomiast w owocach *L. emphylocalyx* od 28,00 do 29,53 μM Fe<sup>2+</sup>·g<sup>-1</sup>. Średnia aktywność antyoksydacyjna określona metodą DPPH w owocach *L. kamtschatica* i *L. emphylocalyx* mieściła się odpowiednio w zakresie 79,50–82,16% oraz 82,87–85,41% inhibicji. Wartości aktywności antyoksydacyjnej wyznaczone metodą ABTS również wykazywały zróżnicowanie i wynosiły od 0,31 do 0,36 mM TE·g<sup>-1</sup> dla *L. kamtschatica* oraz od 0,34 do 0,36 mM TE·g<sup>-1</sup> dla *L. emphylocalyx*.

Wpływ fumigacji gazowym ozonem na właściwości antyoksydacyjne owoców był zróżnicowany i zależał zarówno od zastosowanej dawki, jak i metody analizy. Dawka 5 ppm ekspozycja przez 5 minut istotnie zwiększyła wartość aktywności antyoksydacyjnej określanej metodami FRAP oraz ABTS w porównaniu do próby

kontrolnej, we wszystkich badanych odmianach i klonach *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. W przypadku analizy aktywności antyoksydacyjnej metodą DPPH, najwyższe wyniki (85,14% inhibicji) uzyskano po zastosowaniu dawki 5 ppm przez 3 minuty. Aplikacja tej dawki wpłynęła istotnie na zwiększenie się wartości badanego parametru względem próby kontrolnej u wszystkich badanych odmian oraz klonach *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* i *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Wyniki wskazują, że ozonowanie, zwłaszcza przy ekspozycji trwającej 3 i 5 minut, zwiększa aktywność antyoksydacyjną owoców wiciokrzewu siniego, co sugeruje jego korzystny wpływ na właściwości prozdrowotne tych owoców.

Analiza morfologiczna owoców wykazała istotne różnice między klonami i odmianami *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Owoce *L. kamtschatica* cechowały się wydłużonym, cylindrycznym kształtem, były dłuższe i węższe oraz miały średnio o 35,5% mniejszą masę niż owoce *L. emphyllocalyx*, które charakteryzowały się większą szerokością oraz bardziej kulistym kształtem. Ponadto, owoce *L. emphyllocalyx* wykazywały ciemniejszą barwę, co może wpływać na ich postrzeganą atrakcyjność konsumencką.

W podsumowaniu pracy stwierdzono, że fumigacja owoców *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* odpowiednio dobraną dawką ozonu wpływa na kształtowanie jakości produkowanych owoców. Odmiany *L. emphyllocalyx* wyróżniają się wyższą zawartością witaminy C oraz aktywnością przeciwutleniającą, co czyni je szczególnie wartościowymi z punktu widzenia przemysłu spożywczego. Zastosowanie fumigacji ozonem w dawce nieprzekraczającej 5 ppm przez 3 minuty istotnie poprawia wartość biologiczną owoców, zwiększając ich zawartość związków fenolowych, kwasu askorbinowego oraz potencjał antyoksydacyjny, nie powodując jednocześnie pogorszenia cech sensorycznych. Rok zbioru miał istotny wpływ na badane parametry, co można powiązać ze zróżnicowanymi warunków klimatycznymi w okresie wegetacji. Przeprowadzone badania potwierdzają potencjał wykorzystania zarówno badanych odmian, jak i technologii ozonowania w produkcji owoców jagodowych. Jednocześnie wskazane jest dalsze określenie optymalnej dawki gazowego ozonu, która pozwoli na poprawę właściwości biologicznych owoców bez negatywnego wpływu na ich jakość.

### **PUBLIKACJA 3 - INVESTIGATING THE EFFECT OF OZONATION ON THE MECHANICAL PARAMETERS OF *LONICERA CAERULEA* L. FRUITS USING MACHINE LEARNING**

Trzeci artykuł wchodzący w skład pracy doktorskiej został opublikowany w 2025 roku w czasopiśmie *Agricultural Engineering* (40 pkt. MNiSW), pod tytułem „**Investigating the effect of ozonation on the mechanical parameters of *Lonicera caerulea* L. fruits using machine learning**”. Niniejsza publikacja przedstawia badania dotyczące wpływu fumigacji roślin gazowym ozonem na wybrane właściwości mechaniczne owoców oraz trwałość przechowalniczą jagody karczackiej i haskapu japońskiego. Ponadto w pracy zaprezentowano możliwość wykorzystania predykcyjnych modeli uczenia maszynowego umożliwiających przewidywanie właściwości mechanicznych owoców danych gatunków i odmian w zależności od zmiennych parametrów badanego surowca, w tym również warunków przechowywania.

Wprowadzając w tematykę badań, we wstępie podkreślono, że w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania owocami *Lonicera caerulea* L. w przemyśle spożywczym, co bezpośrednio wiąże się z jej właściwościami prozdrowotnymi oraz wysoką zawartością antocyjanów, witaminy C i związków fenolowych. Główne problemy w uprawie *Lonicera caerulea* L. obejmują krótki okres zbioru, nierównomierne dojrzewanie owoców oraz ich podatność na uszkodzenia mechaniczne podczas zbioru i przechowywania. Zarówno uszkodzenia mechaniczne powstające w trakcie zbioru, jak i długotrwałe przechowywanie w warunkach chłodniczych mogą znacząco obniżać wartość prozdrowotną owoców. W tym kontekście proces ozonowania może stanowić obiecującą technologię, pozwalającą na przedłużenie trwałości owoców oraz ograniczenie ryzyka rozwoju patogenów, bez konieczności stosowania chemicznych środków ochrony roślin (Lv i in. 2019).

Ozon jako silny czynnik utleniający może redukować transpirację w owocach, a tym samym ograniczać utratę wody i wydłużać ich przydatność do przechowywania. Owoce poddane fumigacji gazowym ozonem wykazują mniejszą podatność na rozwój grzybów i pleśni oraz większą odporność na uszkodzenia mechaniczne, zarówno w trakcie zbioru, jak i przechowywania w łańcuchu dostaw. Ponadto zastosowanie odpowiednich modeli uczenia maszynowego umożliwia prognozowanie zmian właściwości mechanicznych owoców w zależności od zróżnicowanych wartości (wieloletnie dane) zastosowanych zmiennych (Niedbała i in. 2022).

Celem pracy była ocena wpływu procesu fumigacji gazowym ozonem w różnych dawkach na badane właściwości mechaniczne owoców *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* i *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*.

W części dotyczącej wykorzystanych metodyk badawczych opisano przeprowadzone analizy oraz zastosowane metody. Badania prowadzono w latach 2022–2024 na trzech odmianach *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* ('Vostorg', 'Jugana', 'Aurora') oraz jednej odmianie i dwóch klonach *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* ('Lori', '21-17', '139-24'). Owoce wykorzystane w niniejszym badaniu pozyskano z roślin uprawianych w ramach ścisłego doświadczenia wazonowego (po 100 g z każdego wariantu doświadczenia), którego szczegółowy przebieg został opisany w publikacji [1]. Materiał owocowy pochodził z roślin *Lonicera caerulea* L. poddanych fumigacji gazowym ozonem (5 ppm) przy różnych czasach ekspozycji (1, 3 i 5 minut). Po wykonaniu zabiegów fumigacji gazowym ozonem owoce z każdego wariantu doświadczenia zebrano i przechowywano w warunkach chłodniczych w temperaturze 5°C. Kolejno w 1., 3. i 5. dniu przechowywania przeprowadzano pomiary wybranych właściwości morfologicznych i mechanicznych badanych owoców. Analizowano następujące cechy morfologiczne (długość, szerokość, masę, gęstość, kulistość) oraz mechaniczne (siłę przebicia skórki i miąższu, deformację, energię deformacji), a także zawartość wody. Pomiary mechaniczne wykonywano za pomocą teksturometru CT3-1000 przy stałej głębokości penetracji i prędkości stempla testu. Innowacyjnym aspektem pracy było wykorzystanie trzech metod uczenia maszynowego (MLP – wielowarstwowej sieci neuronowej, RBF – radialnej funkcji bazowej i SVM – maszyn wektorów nośnych) do modelowania zależności między parametrami mechanicznymi, a czynnikami eksperymentalnymi (odmiana, rok, czas przechowywania, czas ozonowania).

Przedstawione w pracy wyniki pomiarów wykazały istotne różnice w właściwościach morfologicznych owoców odmian i klonów *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Niezależnie od czasu przechowywania i zastosowanej dawki gazowego ozonu, owoce odmian i klonów *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* charakteryzowały się średnią masą większą o 6,9% w porównaniu z *L. caerulea* var. *kamtschatica*. Ponadto owoce tego podgatunku cechowały się wyższym średnim współczynnikiem kulistości we wszystkich terminach przechowywania, niezależnie od dawki ozonowania.

Owoce odmian i klonów haskapu japońskiego (*L. caerulea* var. *emphyllocalyx*) wykazywały również większą odporność na uszkodzenia mechaniczne w porównaniu z odmianami jagody kamczackiej (*L. caerulea* var. *kamtschatica*). Średnia siła przebicia skórki i miąższu owoców oraz energia niszcząca były w ich przypadku wyższe odpowiednio o 16,91% i 7,42%. Dodatkowo stopień deformacji owoców *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* był niższy we wszystkich analizowanych warunkach, co wskazuje na ich większą jędrność i odporność na zgniatanie. Zestawione cechy predysponują odmiany *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* do zbioru mechanicznego oraz dłuższego przechowywania. Zastosowanie ozonowania miało pozytywny wpływ na właściwości mechaniczne badanych odmian i klonów *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Zastosowanie fumigacji roślin gazowym ozonem w dawce 5 ppm, przez 3 minuty, skutkowało istotnym zwiększeniem wartości siły przebicia oraz energii potrzebnej do deformacji owoców *Lonicera caerulea* L., w porównaniu do wariantu kontrolnego. Otrzymane wyniki wskazują, że ozonowanie może stanowić skuteczne narzędzie w poprawie trwałości pozbiorecznej owoców *Lonicera caerulea* L. poprzez zwiększenie ich odporności mechanicznej, co istotnie rozszerza możliwości ich dłuższego przechowywania i transportu.

Zmiany morfologiczne i mechaniczne badanych owoców były też zależne od roku zbioru i czasu przechowywania. Owoce *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* i *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* przechowywane przez 5 dni miały nieco większą podatność na deformację i zapotrzebowanie na energię przy przebiciu, co wskazuje na utratę ich jędrności.

W celu oceny przydatności metod uczenia maszynowego do prognozowania zmian właściwości mechanicznych owoców przeprowadzono modelowanie parametrów związanych z siłą przebicia skórki i miąższu, deformacją i energią niszcząca. Najdokładniejsze modele uzyskano dla parametrów: deformacji i energii (MAPE ok. 14–20%). Modele przewidujące siłę przebicia cechowały się niższą dokładnością, szczególnie w przypadku owoców haskapu japońskiego, co może wynikać z większego zróżnicowania tych danych. Analiza wrażliwości modeli wykazała, że najważniejszym czynnikiem wpływającym na siłę i energię przebicia owoców jagody kamczackiej miała odmiana, a na deformację – rok zbioru. W przypadku *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* wpływ wszystkich zmiennych (odmiana/klon, rok, czas przechowywania,

ozonowanie) był bardziej zrównoważony, co może świadczyć o większej stabilności mechanicznej owoców haskapu japońskiego.

W podsumowaniu stwierdzono, że owoce *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* wykazują lepsze właściwości mechaniczne i przechowalnicze w porównaniu do odmian var. *kamtschatica*, co czyni je bardziej odpowiednimi do zbioru mechanicznego i dłuższego magazynowania. Ozonowanie dawką 5 ppm, szczególnie 3-minutowe, może skutecznie poprawiać odporność mechaniczną owoców bez negatywnego wpływu na ich jakość. Modele predykcyjne oparte na uczeniu maszynowym mogą stanowić użyteczne narzędzie do projektowania optymalnych procesów przechowywania i transportu owoców jagodowych.

#### **PUBLIKACJA 4 - ASSESSMENT OF MICROPROPAGATION POSSIBILITIES FOR JAPANESE HASCAP (*LONICERA CAERULEA* VAR. *EMPHYLOCALYX* L.)**

Czwarty artykuł wchodzący w skład niniejszej rozprawy doktorskiej (publikacja 2) został opublikowany w 2024 roku, w czasopiśmie *Applied Sciences* (100 pkt. MNiSW, 2,836 IF), pod tytułem „**Assessment of micropropagation possibilities for japanese hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* L.)**”. Niniejsza publikacja przedstawia badania nad opracowaniem skutecznego sposobu mikrorozmnażania haskapu japońskiego (*Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*), skupiając się na dwóch nowych klonach hodowlanych – ‘21–17’ (J21) i ‘139–24’ (J13).

We wstępie podkreślono rosnące zainteresowanie produkcją owoców jagody kamczackiej ze względu na jej walory odżywcze i farmaceutyczne. Szczególną uwagę zwrócono na odmianę *emphylocalyx*, rzadziej opisywaną w literaturze, która cechuje się późniejszym kwitnieniem i dojrzewaniem owoców i mniejszym opadaniem owoców, co czyni ją atrakcyjną dla plantatorów. Tradycyjne metody rozmnażania, takie jak sadzonkowanie, są jednak mało wydajne i obciążone ryzykiem infekcji, dlatego autorzy proponują zastosowanie kultur *in vitro* jako alternatywy umożliwiającej szybkie i powtarzalne rozmnażanie zdrowego materiału roślinnego (Kumar i in. 2011).

Celem badań było opracowanie skutecznej metody mikrorozmnażania dla dwóch wyżej wymienionych klonów poprzez zastosowanie i porównanie różnych typów eksplantatów (fragmenty międzywęzłowe – NF i wierzchołki pędów – ST) oraz dwóch regulatorów wzrostu: BA (6-benzyladenina) i mT (meta-topolina). Dodatkowo badano

wpływ przechowywania roślin w niskiej temperaturze (4°C przez 4 tygodnie) na ich aklimatyzację.

W części dotyczącej wykorzystanych metodyk badawczych opisano trzyetapowy protokół mikrorozmnażania obejmujący: proliferację, ukorzenianie i aklimatyzację. Materiał roślinny pochodził z młodych roślin doniczkowych, które nie były wcześniej rozmnażane *in vitro*. W eksperymentach zastosowano pożywki oparte na Murashige i Skooga (MS) z różnymi dodatkami: cytokininy (BA lub mT) na etapie proliferacji, auksyny (kwas indolilomasłowy IBA) na etapie ukorzeniania oraz dodatkowe witaminy i mikroelementy.

Podczas fazy proliferacji zauważono, że znacznie więcej eksplantatów typu ST rozpoczęło wzrost w porównaniu z NF. Jednak to eksplantaty NF w połączeniu z BA wykazywały większą liczbę dłuższych pędów i lepszy ogólny wzrost. mT okazała się mniej skuteczna niż BA – zarówno pod względem liczby pędów, jak i ich długości. Kultury z mT charakteryzowały się mniejszą proliferacją i mniejszą wielkością kalusa, pomimo iż rzadziej obserwowano martwicę wierzchołkową. Nie odnotowano istotnych różnic między klonami w odpowiedzi na cytokininę, jednak J21 wykazywał większe wydłużanie pędów.

W fazie ukorzeniania eksplantaty NF również wykazały lepszą zdolność do ukorzeniania i rozwijały dłuższe korzenie niż ST. Ogólnie, klon J21 osiągał wyższy wskaźnik ukorzeniania niż J13, pomimo, iż różnice w martwicy wierzchołków nie były istotne. Zastosowana pożywka zawierała IBA (kwas indolomasłowy) w stężeniu 1,0 mg·dm<sup>-3</sup>, co pozytywnie wpływało na proces ukorzeniania.

Etap aklimatyzacji ujawnił wyraźne różnice między klonami i typami eksplantatów. Klon J21 rozwijał dłuższe korzenie, ale również charakteryzował się wyższym odsetkiem martwych roślin po przeniesieniu do warunków *ex vitro*. Zastosowanie chłodzenia przed aklimatyzacją zwiększało śmiertelność siewek, zwłaszcza w przypadku eksplantatów ST. Niemniej jednak chłodzone eksplantaty NF miały lepsze wyniki niż chłodzone ST. W pierwszych tygodniach aklimatyzacji zauważono zahamowanie wydłużania pędów u roślin poddanych chłodzeniu, szczególnie u klonu J21. Różnice te zanikły w późniejszych obserwacjach i wykonanych pomiarach.

W części dyskusyjnej porównano wyniki z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi innych odmian *Lonicera*. Zwrócono uwagę na kluczowe znaczenie genotypu, rodzaju eksplantatu oraz typu zastosowanej cytokiny w skutecznym

mikrorozmnażaniu. Cytokina BA, mimo większego ryzyka martwicy wierzchołkowej, była skuteczniejsza od mT w stymulowaniu wzrostu i tworzeniu pędów. Eksplantaty NF okazały się bardziej obiecującym materiałem do mikrorozmnażania niż ST, zarówno na etapie proliferacji, jak i aklimatyzacji.

W podsumowaniu stwierdzono, że najskuteczniejszy protokół mikrorozmnażania japońskiego haskapu obejmuje wykorzystanie eksplantatów typu NF oraz cytokininy BA. Opracowana metoda może być w przyszłości użyteczna dla rozmnażania nowych klonów użytkowych przeznaczonych do uprawy towarowej i mechanicznego zbioru. Przeprowadzone badania stanowią ważny krok w kierunku komercjalizacji mikrorozmnażania tej cennej odmiany jagody kamczackiej.

## 7. PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania umożliwiły wszechstronną ocenę wpływu fumigacji gazowym ozonem na rośliny i owoce *Lonicera caerulea* L., obejmującą aspekty fizjologiczne, biochemiczne, mechaniczne oraz przechowalnicze. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że technologia ta, przy odpowiednio dobranych parametrach prowadzenia procesu może stanowić istotny zabieg agrotechniczny wspierający produkcję sadowniczą oraz kształtowanie jakości handlowej owoców.

Wykazano, że krótkotrwała ekspozycja roślin na działanie gazowego ozonu o stężeniu 5 ppm nie wywołuje negatywnych zmian w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego ani nie powoduje objawów fitotoksyczności. Analizowane wskaźniki fluorescencji chlorofilu oraz parametry wymiany gazowej utrzymywały się w zakresie wartości optymalnych, co potwierdza prawidłowy przebieg procesów metabolicznych po przeprowadzonych zabiegach fumigacji gazowym ozonem. Jedynie wydłużony czas ekspozycji roślin na działanie tego gazu (5 ppm przez 5 min) prowadził do spadku zawartości chlorofilu i pogorszenia części parametrów fizjologicznych, co wskazuje na możliwość indukcji stresu oksydacyjnego. Wyniki te potwierdzają, że skuteczność i bezpieczeństwo ozonowania determinowane są przez stężenie O<sub>3</sub> i czas trwania zabiegu, a także przez cechy genotypowe badanych roślin. Zabieg ten stanowi obiecującą technologię wspierania zarówno ochrony roślin, jak i poprawy ich zdrowotności w zrównoważonej produkcji ogrodniczej. Jednakże wymaga dalszych badań, zwłaszcza w przypadku innych gatunków roślin, polegających na doborze optymalnych dawek ozonu.

Oceniając jakość produkowanych owoców stwierdzono, że ozonowanie nie obniża ich wartości biologicznej, a w wielu przypadkach prowadzi do istotnego wzrostu zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej. Uzyskane wyniki dowodzą, że fumigacja roślin gazowym ozonem może przyczyniać się do zwiększenia wartości prozdrowotnej produkowanych owoców, co podnosi ich atrakcyjność konsumpcyjną i handlową. Najkorzystniejsze efekty uzyskano przy zastosowaniu dawki gazowego ozonu wynoszącej 5 ppm przez 3 minuty, która sprzyjała podwyższeniu zawartości bioaktywnych metabolitów wtórnych przy jednoczesnym zachowaniu integralności tkanek owoców. Jednocześnie wykazano znaczące różnice pomiędzy badanymi odmianami botanicznymi (podgatunkami). Owoce *L. emphyllocalyx* charakteryzowały się większą masą, intensywniejszą barwą, wyższą aktywnością antyoksydacyjną oraz lepszymi właściwościami mechanicznymi w porównaniu do *L. kamtschatica*. Należy podkreślić, że istotny wpływ na jakość owoców miały również warunki środowiskowe w poszczególnych latach prowadzenia badań. Czynniki takie jak temperatura, opady czy nasłonecznienie w okresie wegetacji oddziaływały na biosyntezę witaminy C oraz związków fenolowych, powodując istotne wahania ich zawartości pomiędzy sezonami. Uzyskane wyniki dowodzą zatem, że efekty ozonowania kształtowane są przez zmienność warunkowaną przebiegiem pogody, co należy uwzględnić przy interpretacji rezultatów i planowaniu praktycznego wykorzystania tej technologii.

Istotnym aspektem przeprowadzonych badań była ocena trwałości pozbiorczej owoców. Wykazano, że ozonowanie wpływa korzystnie na ich jędrność i odporność mechaniczną, co ogranicza straty jakościowe podczas transportu i przechowywania. Zastosowane zabiegi fumigacji roślin ograniczały tempo degradacji ścian komórkowych i utraty wody w owocach, dzięki czemu zachowywały większą odporność mechaniczną w porównaniu do owoców z prób kontrolnych. Najkorzystniejsze efekty uzyskano przy zastosowaniu krótkotrwałej ekspozycji na ozon w dawce 5 ppm przez 3 minuty, która pozwalała na znaczące spowolnienie procesów starzenia, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości sensorycznej i technologicznej owoców. Pomimo, iż naturalny proces starzenia owoców prowadził do pogorszenia ich parametrów mechanicznych wraz z wydłużaniem okresu przechowywania, zastosowanie fumigacji ozonem pozwalało ten proces spowolnić. Nowatorskim elementem rozprawy było wykorzystanie algorytmów uczenia maszynowego do predykcji zmian jakości owoców w zależności od czasu

przechowywania, parametrów ozonowania i cech odmianowych. Uzyskane modele wykazały wysoką dokładność predykcijną, wskazując na duży potencjał integracji metod biologicznych i informatycznych do projektowania optymalnych procesów przechowywania i transportu owoców jagodowych.

Całość przeprowadzonych prac badawczych pozwala stwierdzić, że ozonowanie roślin i owoców *Lonicera caerulea* L. stanowi technologię o znaczącym potencjale aplikacyjnym, umożliwiającą poprawę jakości biologicznej, prozdrowotnej i przechowalniczej surowców, przy jednoczesnym wspieraniu zdrowotności roślin. Wyniki rozprawy poszerzają wiedzę o reakcjach roślin na działanie gazowego ozonu, a jednocześnie wskazują na realne możliwości praktycznego wdrożenia tej technologii w ogrodnictwie.

Wnioski te mają charakter zarówno poznawczy, jak i aplikacyjny. Z jednej strony wzbogacają podstawy naukowe dotyczące oddziaływania ozonu na procesy fizjologiczne roślin i biochemiczne owoców, z drugiej natomiast dostarczają narzędzi i wskazówek przydatnych w praktyce ogrodniczej. Rozprawa dowodzi, że odpowiednio przeprowadzony proces ozonowania stanowi bezpieczną i przyjazną środowisku metodę, która może odgrywać istotną rolę w rozwoju nowoczesnych i zrównoważonych systemów produkcji żywności wysokiej jakości.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Bhati, P., Saikia, A. R., Chaudhary, S., Bahadur, R., Nengparmoi, T., Talukdar, N., & Hazarika, S. (2024). Integrated farming systems for environment sustainability: a Comprehensive Review. *Journal of Scientific Research and Reports*, 30(1), 143-155.
2. Bieniek, A.A., Grygorieva, O., & Bielska, N. (2021). Biological Properties of Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.): A Review: The Nutrition, Health Properties of Honeysuckle. *Agrobiodivers. Improv. Nutr. Health Life Qual*, 5
3. Błaszczyk, J., Bieniasz, M., Nawrocki, J., Kopeć, M., Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Zaleski, T., Knaga, J., & Bogdał, S. (2022). The Effect of Harvest Date and Storage Conditions on the Quality of Remontant Strawberry Cultivars Grown in a Gutter System under Covers. *Agriculture*. 12(8):1193. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081193>
4. Botondi, R., Barone, M., & Grasso, C. (2021). A review into the effectiveness of ozone technology for improving the safety and preserving the quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Foods*, 10(4), 748.
5. Brewster, C., (2023). *Ground level ozone and wheat: an exploration of effects on yield, interactions with nitrogen, and potential sources of sensitivity and tolerance*. Bangor University (United Kingdom)
6. Brondino, L., Briano, R., Massaglia, S., & Giuggioli, N. R. (2022). Influence of harvest method on the quality and storage of highbush blueberry. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100415.
7. Česonienė, L., Labokas, J., Jasutienė, I., Šarkinas, A., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Kazernavičiūtė, R., Pažereckaitė, A. & Daubaras, R., (2021). Bioactive compounds, antioxidant, and antibacterial properties of *Lonicera caerulea* berries: Evaluation of 11 cultivars. *Plants*, 10(4), p.624.
8. Chen, S., Fan, L., Chen, X., Guo, Z., & Zhang, B. (2025). Microencapsulation of *Lonicera caerulea* pomace extract by spray drying: Characterization and stability studies. *LWT*, 223, 117778.
9. Cheng, Z., Bao, Y., Li, Z., Wang, J., Wang, M., Wang, S., Wang, Y., Wang, Y., & Li, B. (2023). *Lonicera caerulea* (Haskap berries): A review of development traceability, functional value, product development status, future opportunities, and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(27), pp.8992-9016.

10. Dadan, M., Grobelna, A., Kalisz, S., & Witrowa-Rajchert, D. (2022). The impact of ultrasound-assisted thawing on the bioactive components in juices obtained from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, *89*, 106156.
11. Dayar, E., Cebova, M., Lietava, J., Panghyova, E., & Pechanova, O. (2021). Antioxidant effect of *Lonicera caerulea* L. in the cardiovascular system of obese zucker rats. *Antioxidants*, *10*(8), 1199.
12. Dubey, P., Singh, A., & Yousuf, O. (2022). Ozonation: An evolving disinfectant technology for the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, *15*(9), 2102-2113.
13. Emberson, L. (2020). Effects of ozone on agriculture, forests and grasslands. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, *378*(2183), 20190327.
14. European Commission, 2020a. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the regions. A Farm to Fork strategy for a fair, healthy and environmentally friendly food system, 23 pp.
15. European Commission, 2020b. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the regions. EU Biodiversity Strategy for 2030 bringing Nature back into our lives, 27 pp.
16. Fan X., Shang D., Lan Y., Bai J., & Han X. (2020). Application of ozone technology and ozone plant protection devices in agriculture. *Journal of Agricultural science and technology*, *22*(5): 71-77.
17. Fan, X. (2021). Gaseous ozone to preserve quality and enhance microbial safety of fresh produce: Recent developments and research needs. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, *20*, 4993–5014.
18. Finger, R., Sok, J., Ahovi, E., Akter, S., Bremmer, J., Dachbrodt-Saaydeh, S., de Lauwere, C., Kreft, C., Kudsk, P., Lambarraa-Lehnhardt, F. & McCallum, C., (2024). Towards sustainable crop protection in agriculture: A framework for research and policy. *Agricultural Systems*, *219*, p.104037.
19. Gawronski, J., Hortynski, J., Kaczmarska, E., Dyduch-Sieminska, M., Marecki, W., & Witorozec, A. (2014). Evaluation of phenotypic and genotypic diversity of some Polish and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and clones. *Acta Sci. Polonorum. Hortorum Cultus*, *13*, 157–169.

20. Ge, L., Yan, J., Qi, Q., Zhang, Q., Jiang, W., Xue, J., Ju, P., Lin, M. & Lü, C. (2024). Antioxidant Enzyme Activity in the Leaves of *Lonicera caerulea* along an Altitude Gradient on the North Slope of Changbai Mountain. *Polish Journal of Environmental Studies*, 33(3).
21. Główny urząd statystyczny. 2025. Produkcja upraw rolnych i ogrodnich w 2024. Warszawa
22. Grewal, A. (2020). *Haskap (Lonicera caerulea L.)* Response to plastic Mulch colours and fertility amendments (Doctoral dissertation). Dalhousie University Halifax, Nova Scotia
23. Grobelna, A., Kalisz, S., Kieliszek, M., & Giurgiulescu, L. (2020). Blue honeysuckle berry (*Lonicera caerulea* L.), as raw material, is particularly predisposed to the production of functional foods. 144-155
24. Grulke, N.E., & Heath, R.L. (2020). Ozone effects on plants in natural ecosystems. *Plant Biol*, 22, 12–37.
25. Guo, L., Qiao, J., Sorokin, A., Li, J., Han, D., Qin, D., & Huo, J. (2024). Breeding trends on blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Plant Breeding*, 143(4), 552-561.
26. Guo, L., Qiao, J., Zhang, L., Yan, W., Zhang, M., Lu, Y., Wang, Y., Ma, H., Liu, Y., Zhang, Y., & Li, J., (2023). Critical review on anthocyanins in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) and their function. *Plant physiology and biochemistry*, 204, p.108090.
27. Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., da Silva, J.A.T., Fujita, M. (2012). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies*; Springer: Dordrecht, The Netherlands; pp. 261–315.
28. <https://jagodnik.pl/krajowe-observacje-i-wnioski-plynace-z-produkcji-sadzonek-jagody-kamczackiej>; data utworzenia – 18.08.2025
29. <https://polskiesuperowoce.pl/323164-rosnie-popularnosc-jagody-kamczackiej-i-jej-samozbiorow>; data utworzenia – 18.08.2025
30. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/rolnictwo/srodki-produkcji-w-rolnictwie-w-roku-gospodarczym-20222023%2C6%2C18.html>; data utworzenia – 18.08.2025

31. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/uprawy-rolne-i-ogrodnicze/wstepny-szacunek-glownych-ziemioplodow-rolnych-i-ogrodniczych-w-2024-roku,3,18.html>; data otworzenia – 18.08.2025
32. <https://www.gov.pl/web/piorin/ocena-polowa-materialu-szolkarskiego-w-2023-roku>; data otworzenia – 18.08.2025
33. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/owoce-i-warzywa2>; data otworzenia – 18.08.2025
34. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/wyzwania-i-perspektywy-rozwoju-rynku-owocow-i-warzyw>; data otworzenia – 18.08.2025
35. <https://www.hortidaily.com/article/9381119/production-of-raspberries-in-poland>; data otworzenia – 18.08.2025
36. <https://www.money.pl/gospodarka/oto-polski-superowoc-jestesmy-absolutnym-potentatem-w-produkcji-jagody-kamczackiej-6661871597320960a.html>; data otworzenia – 18.08.2025
37. <https://www.syngenta.pl/uprawy/sady-i-jagodniki/jagodniki>; data otworzenia – 18.08.2025
38. Isac, V., & M. Coman. (2012). Validated protocols for micropropagation of some fruit species to produce pre-basic plant material. *Fruit Growing Research (Article 20)*. 2286-0304, 28
39. Jurikova, T., Rop, O., Mlcek, J., Sochor, J., Balla, S., Szekeres, L., Hegedusova, A., Hubalek, J., Adam, V., & Kizek, R. (2011). Phenolic profile of edible honeysuckle berries (genus *Lonicera*) and their biological effects. *Molecules*, 17(1), pp.61-79.
40. Kalisz, S., Polak, N., Cacak-Pietrzak, G., Cendrowski, A., & Kruszewski, B. (2023). Impact of Production Methods and Storage Time on the Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Confitures Made from Blue Honeysuckle Berry (*Lonicera caerulea* L.). *Appl. Sci.*, 13, 12999. <https://doi.org/10.3390/app132412999>
41. Karmakar, S. P., Das, A. B., Gurung, C., & Ghosh, C. (2022). Effects of ozone on plant health and environment: a mini review. *Res. Jr. Agril. Sci*, 13, 612-619.
42. Khan, N., Ray, R. L., Sargani, G. R., Ihtisham, M., Khayyam, M., & Ismail, S. (2021). Current progress and future prospects of agriculture technology: Gateway to sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(9), 4883.
43. Khobragade, S., Mohapatra, S., Mahananda, M., Singh, A., & Singh, A. (2021). Integrated farming system (IFS): a review. *International Journal of Economic Plants*, 8(3), 181-187.

44. Klepacka, A. M., & Traczyk, R. (2022). Możliwości rozwoju gospodarstwa sadowniczego ze szczególnym uwzględnieniem elementów logistycznych. *Annals of the Polish Association of Agricultural and Agrobusiness Economists*, 24(4).
45. Kobayashi, K. (2023). Effects of ozone on agricultural crops. In *Handbook of air quality and climate change* (pp. 849-892). Singapore: Springer Nature Singapore.
46. Kucharska, A.Z., Sokół-Lętowska, A., Oszmiański, J., Piórecki, N., & Fecka, I. (2017). Iridoids, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.). *Molecules*, 22, 405.
47. Kula, M., & Krauze-Baranowska, M. (2016). Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). The current state of phytochemical research and biological activity. *Post Fitoter.* 17, 111–118.
48. Kulikova, E.I., Makarov, S.S., Kuznetsova, I.B. & Chudetsky, A.I., (2021). Russian and foreign cultivars of honeysuckle (*Lonicera edulis* Turcz.): cultivation studies *in vitro*. 712-722
49. Kumar, N., & Reddy, M.P. (2011). *In Vitro* plant propagation: A review. *J. For. Sci*, 27, 61–72.
50. Kuźniar, P., Belcar, J., Zardzewiały, M., Basara, O., & Gorzelany, J. (2022) Effect of Ozonation on the Mechanical, Chemical, and Microbiological Properties of Organically Grown Red Currant (*Ribes rubrum* L.) Fruit. *Molecules*. 27(23):8231.
51. Lagarda-Clark, E. A., Goulet, C., & Duarte-Sierra, A. (2025). Optimizing Haskap Berry (*Lonicera caerulea*) Storage Conditions and Monitoring Antioxidant Systems. *Future Postharvest and Food*
52. Leisso, R., Jarrett, B., Richter, R., & Miller, Z. (2022). Haskap maturity stages and their influence on postharvest berry quality. *Canadian Journal of Plant Science*, 102(3), 749-754.
53. Lemic, D., Zorić, B., Novak, A., Ivić, D., Galešić, M. A., & Viric Gasparic, H. (2025). The Effectiveness of Ozone Technology Application in Extending the Shelf Life of Berry Fruit. *Applied Fruit Science*, 67(1), 35.
54. Lv, Y., Tahir, I.I., & Olsson, M.E. (2019). Effect of ozone application on bioactive compounds of apple fruit short-term cold storage, 253, 49–60.

55. Majchrzak, W., Śmigielski, K., Motyl, I., Oracz, J., Skura, K., & Motyl, S. (2024). Kamchatka Berry (*Lonicera caerulea* L.) Pomace Bioferment as an Innovative Cosmetic Raw Material. *Appl. Sci*, 14, 3218. <https://doi.org/10.3390/app14083218>
56. Maxine, T.M. (2006). Introducing haskap, Japanese Blue honeysuckle. *J. Am. Pomol. Soc.*, 60, 164–168.
57. Mikuła, A., Chmielarz, P., Hazubska-Przybył, T., Kulus, D., Maślanka, M., Pawłowska, B. & Zimnoch-Guzowska, E. (2022). Cryopreservation of Plant Tissues in Poland: Research Contributions, Current Status, and Applications. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91.
58. Niedbała, G., Kurek, J., Świdorski, B., Wojciechowski, T., Antoniuk, I., & Bobran K. (2022). Prediction of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Yield Based on Artificial Intelligence Methods. *Agriculture*, 12, 2089.
59. Ochmian, I. D., Skupień, K., Grajkowski, J., Smolik, M., & Ostrowska, K. (2012). Chemical composition and physical characteristics of fruits of two cultivars of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in relation to their degree of maturity and harvest date. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 155-162.
60. Ochmian, I., Grajkowski, J., & Skupień, K. (2022). Field performance, fruit chemical composition and firmness under cold storage and simulated “shelf-life” conditions of three blue honeysuckle cultigens (*Lonicera caerulea*). *J. Fruit Orn. Plant Res.* 2008,
61. Orsavová, J.; Sytarová, I.; Mlcek, J.; & Mišurcová, L. Phenolic Compounds, Vitamins C and E and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Pojark) in Relation to Their Origin. *Antioxidants*, 11, 433. <https://doi.org/10.3390/antiox11020433>
62. Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczyk, K., Sójka, M., & Balawejder, M. (2022b). One-time ozone treatment improves the postharvest quality and antioxidant activity of *Actinidia arguta* fruit. *Phytochemistry*, 203, 113393
63. Piechowiak, T., Migut, D., Józefczyk, R. & Balawejder, M. (2022a). Ozone treatment improves the texture of strawberry fruit during storage. *Antioxidants*, 11(5), p.821.
64. Pinto, L., Palma, A., Cefola, M., Pace, B., D’Aquino, S., Carboni, C., & Baruzzi, F. (2020). Effect of modified atmosphere packaging (MAP) and gaseous ozone pre-packaging treatment on the physico-chemical, microbiological and sensory quality of small berry fruit. *Food Packag. Shelf Life*, 26, 100573.

65. Polak, N., Kalisz, S., Wawrzyńczak, A., & Kruszewski, B. (2023). Wpływ czasu przechowywania na wybrane wyróżniki jakościowe soków mieszanych z aronii czarnoowocowej i jagody kamczackiej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 30(2) (135)).
66. Remondino, M., & Valdenassi, L. (2018). Different Uses of Ozone: Environmental and Corporate Sustainability. Literature Review and Case Study. *Sustainability*, 10, 4783.
67. Rupasinghe, H.P.V., Arumuggam, N., Amaramathna, M., & De Silva, A.B.K.H. (2018). The potential health benefits of haskap (*Lonicera caerulea* L.): Role of cyanidin-3-O-glucoside. *J. Funct. Foods*, 44, 24–39.
68. Rysz, M., & Szymańska, E. J. (2023). Wdrażanie innowacji w gospodarstwach sadowniczych o różnej skali produkcji owoców. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Ekonomia i Organizacja Logistyki*, (8 [2]).
69. Senica, M., Stampar, F., & Mikulic-Petkovsek, M. (2019). Different extraction processes affect the metabolites in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subsp. *edulis*) food products. *Turk. J. Agric. For.*, 43, 576–585.
70. Singh, S., Villamor, D.E., Poudyal, D.S., Sierra-Mejia, A. & Tzanetakis, I.E., (2024). A systems-based approach to ensure berry crops health status: from the breeder to the field. *European Journal of Plant Pathology*, pp.1-19.
71. Sokół-Łętowska A., & Kucharska A. (2024). Jagoda kamczacka (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) – nowe (?) źródło cennych substancji, „Herbalism”, t.10, pp. 67–77.
72. Strasser, R.J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynth. Mech. Regul.*, 25, 445–483.
73. Surucu-Balci, E., & Tuna, O. (2021). Investigating logistics-related food loss drivers: A study on fresh fruit and vegetable supply chain. *Journal of Cleaner Production*, 318, 128561
74. Thompson, A. K., Prange, R. K., Bancroft, R., & Puttongsiri, T. (2018). *Controlled atmosphere storage of fruit and vegetables*. CABI.
75. Tremblay, C., Deslauriers, A., Lafond, J., Lajeunesse, J., & Paré, M.C. (2019). Effects of Soil pH and Fertilizers on Haskap (*Lonicera caerulea* L.) Vegetative Growth. *Agriculture*, 9, 56. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030056>

76. Wang, J., Wang, X., Ma, Y., Gao, R., Wang, Y., An, Z., Tian, Y., Wan, H., Wei, D., Wang F, Zheng, B., Duan, B., Xiang, L., Dong, G., Sun, W., & Xu, Z. (2024). *Lonicera caerulea* genome reveals molecular mechanisms of freezing tolerance and anthocyanin biosynthesis. *J Adv Res.* 26: S2090-1232(24)00615-5. doi: 10.1016/j.jare.2024.12.038.
77. Wang, Y., Li, Y., Yang, S., Li, C., Li, L., Gao, S. & Wu, Z. (2023). Mechanism of ozone treatment in delayed softening of fresh-cut kiwifruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 204, p.112469.
78. Wrzaszcz, W. (2023). Zielona transformacja polityki rolnej w Unii Europejskiej. *Zielone finanse*, 81-112.
79. Wulczyńska, M. (2022). Czynniki determinujące jakość produktów branży owocowo-warzywnej na przykładzie przedsiębiorstwa spożywczego. *Management & Quality/Zarządzanie i Jakość*, 4(4).
80. Yan, W., Lu, Y., Guo, L., Liu, Y., Li, M., Zhang, B., Zhang, B., Zhang, L., Qin, D., & Huo, J. (2024). Effects of Drought Stress on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence in Blue Honeysuckle. *Plants*, 13(15), 2115. <https://doi.org/10.3390/plants13152115>
81. Yu M, Li S, Zhan Y, Huang Z, Lv J, Liu Y, Quan X, Xiong J, Qin D, Huo J. (2023). Evaluation of the Harvest Dates for Three Major Cultivars of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in China. *Plants.*; 12(21):3758. <https://doi.org/10.3390/plants12213758>
82. Zapalowska, A., Matłok, N., Zardzewiały, M., Piechowiak, T., Balawejder, M. (2021). Effect of Ozone Treatment on the Quality of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Plants*, 10, 847.
83. Zhang, M., Ma, X., Xiao, Z., Sun, A., Zhao, M., Wang, Y., Huang, D., Sui, X., Huo, J. & Zhang, Y. (2023). Polyphenols in twenty cultivars of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.): Profiling, antioxidant capacity, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Food Chemistry*, 421, p.136148.
84. Żurek, N., Pluta, S., Seliga, Ł., Lachowicz-Wiśniewska, S., Kapusta, I. (2024). Comparative Evaluation of the Phytochemical Composition of Fruits of Ten Haskap Berry (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.) Cultivars Grown in Poland. *Agriculture.*; 14(10):1734. <https://doi.org/10.3390/agriculture14101734>

## 9. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Łączna liczba punktów dokumentujących osiągnięcia naukowe wynosi 1340 pkt. MniSW. Sumaryczny IF dla ww. Publikacji zgodnie z rokiem publikowania wynosi IF=30,00

L.p.	Publikacja	punkty MNiSW	IF
1	Matłok, N.; <b>Basara, O.</b> ; Zardzewiały, M.; Gorzelany, J.; Balawejder, M. Effectiveness of a Complex Fertilisation Technology Applied to Zea mays, Assessed Based on Normalised Difference Vegetation Index (NDVI) from Terra Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS). <i>Agriculture</i> 2021, 11, 754. <a href="https://doi.org/10.3390/agriculture11080754">https://doi.org/10.3390/agriculture11080754</a>	100	3,6
2	Gorzelany, J., <b>Basara, O.</b> , Kuźniar, P., Pawłowska, A. M., & Belcar, J. (2022). Effect of ozone treatment on mechanical and chemical properties of sea-buckthorn ( <i>Hippophaë rhamnoides</i> L.) fruit. <i>Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology</i> , 26(2).	140	0,6
3	Kuźniar, P.; Belcar, J.; Zardzewiały, M.; <b>Basara, O.</b> ; Gorzelany, J. Effect of Ozonation on the Mechanical, Chemical, and Microbiological Properties of Organically Grown Red Currant ( <i>Ribes rubrum</i> L.) Fruit. <i>Molecules</i> 2022, 27, 8231. <a href="https://doi.org/10.3390/molecules27238231">https://doi.org/10.3390/molecules27238231</a>	140	4,6
4	Gorzelany, J.; <b>Basara, O.</b> ; Kapusta, I.; Paweł, K.; Belcar, J. Evaluation of the Chemical Composition of Selected Varieties of <i>L. caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>L. caerulea</i> var. <i>emphylocalyx</i> . <i>Molecules</i> 2023, 28, 2525. <a href="https://doi.org/10.3390/molecules28062525">https://doi.org/10.3390/molecules28062525</a>	140	4,6
5	Gorzelany, J.; Kapusta, I.; Pluta, S.; Belcar, J.; Pentoś, K.; <b>Basara, O.</b> Effect of Gaseous Ozone and Storage Time on Polyphenolic Profile and Sugar Content in Fruits of Selected <i>Vaccinium corymbosum</i> L. Genotypes. <i>Molecules</i> 2023, 28, 8106. <a href="https://doi.org/10.3390/molecules28248106">https://doi.org/10.3390/molecules28248106</a>	140	4,6
6	Wójcik, T., <b>Basara, O.</b> et al. (2024). Monitoring <i>Fritillaria meleagris</i> (Liliaceae) na nowym stanowisku w Zaleskiej Woli (województwo podkarpackie). <i>Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica</i> , 29(2), 161-179.	20	-
7	Zardzewiały, M., <b>Basara, O.</b> , Belcar, J., Balawejder, M., & Gorzelany, J. (2024). The Impact of the Ozonation Process on the Content Of Bioactive Compounds in Zucchini Fruits and the Concentration of Selected Gases During Their Storage. <i>Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology</i> , 28(2).	140	0,6
8	Gorzelany, J., <b>Basara, O.</b> , Zardzewiały, M., Pluta, S., Seliga, Ł., Belcar, J., & Kuźniar, P. (2024). The Influence of Gaseous Ozone Fumigation on the Chemical and Mechanical Properties of Highbush Blueberry ( <i>Vaccinium corymbosum</i>	140	0,6

	L.) Fruits. <i>Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology</i> , 28(1).		
9	<b>Basara, O.</b> , Litwińczuk. W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap ( <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i> L.) Appl. Sci.14, 9452. <a href="https://doi.org/10.3390/app14209452">https://doi.org/10.3390/app14209452</a>	100	2,5
10	<b>Basara, O.</b> , Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of <i>Lonicera</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera</i> var. <i>emphyllocalyx</i> Treated with Gaseous Ozone. <i>Molecules</i> , 29, 3616. <a href="https://doi.org/10.3390/molecules29153616">https://doi.org/10.3390/molecules29153616</a>	140	4,6
11	<b>Basara, O.</b> , Gorzelany, J. (2025). Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i> and <i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i> . <i>Sustainability</i> , 17, 2820. <a href="https://doi.org/10.3390/su17072820">https://doi.org/10.3390/su17072820</a>	100	3,3
12	<b>Basara, O.</b> , Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of <i>Lonicera caerulea</i> L. Fruits Using Machine Learning. <i>Agricultural Engineering</i> , 29, 97-114	40	0,4
13	<b>Basara, O.</b> , Zardzewiały, M., Kuźniar, P., Pluta, S., Belcar, J., Gorzelany, J. (2025). Influence of gaseous ozone treatments on mechanical and 2 chemical properties of Japanese quince fruits during storage. <i>Foods</i> . Po etapie recenzji	100	5,1

### Dodatkowa działalność naukowa

Czynny udział w krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych:

- 1 czerwca 2022 - Poster pt. „Technologia produkcji napoju z truskawki i borówki amerykańskiej z wykorzystaniem grzyba herbacianego kombucha”. II Konferencja Młodych Naukowców. Rada Młodych Naukowców Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich - Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu,
- 4 - 6 października 2022 – Prezentacja pt. „Ocena energetyczna i chemiczna biomasy odpadowej z produkcji szkółkarskiej, wybranych gatunków drzewek owocowych”. Konferencja Naukowa „Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania”,
- 9 – 10 listopada 2023 - Prezentacja pt. „Produkcja materiału szkółkarskiego wybranych gatunków roślin jagodowych w latach 2019-2022”. Krajowa Konferencja Naukowa „Jakość Życia w Bio-, Tech- i Ekosystemach”, Uniwersytet Rzeszowski,

- 1 lutego 2025 - Poster pt. „Wpływ gazowego ozonu na właściwości mechaniczne oraz chemiczne owoców wybranych klonów pigwowca japońskiego *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl w czasie ich chłodniczego przechowywania”. V Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk Ścisłych i Przyrodniczych „BioIdea 5.0.
- 3 – 6 lutego 2025 - Prezentacja pt.„Wpływ ozonu gazowego i czasu przechowywania na właściwości chemiczne i mechaniczne *Vitis vinifera* L.”. XXXI Konferencja Naukowa ‘Postęp Naukowo-Techniczny i Organizacyjny w Rolnictwie’
- 29 – 30 maja 2025 - Prezentacja pt. „Logistyka i efektywność procesów zbioru, transportu i przechowywania owoców wybranych odmian jabłek”. VIII Konferencja Naukowa ‘Logistyka dziś i jutro’, Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej,

## Article

# Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*

Oskar Basara  and Józef Gorzelany 

Department of Food and Agriculture Production Engineering, University of Rzeszów, St. Zelwerowicza 4, 35 601 Rzeszow, Poland; jgorzelany@ur.edu.pl

\* Correspondence: oskarb@dokt.ur.edu.pl

**Abstract:** *Lonicera caerulea* is a species known for its fruit with a rich health-promoting composition and the high frost resistance of its bushes. The increase in the popularity of this species and the number and area of plantations increases the risk of diseases and pests. However, the use of ozone gas may involve the risk of physiological damage to the plant. In this experiment, in 2022–2023, the physiological response of six varieties of *Lonicera caerulea* L. to gaseous ozone at a concentration of 5 ppm·1 min, 5 ppm·3 min and 5 ppm·5 min was determined. The flavonoid–nitrogen index (NFI) remained unchanged at 0.33 in both non-ozonated leaves and those exposed to a 5 ppm·3 min dose of ozone. In general, ozonation did not lead to significant changes in the physiological parameters observed for most of the varieties studied. The mean performance index ( $P_{\text{total}}$ ) value of the ozonated leaves decreased by 23.1% for LE ‘Lori’ and 23.8% for ‘139-24’, after applying an ozone dose of 5 ppm·5 min in 2022. A significant decrease of 34.3% in the average transpiration rate (E) was observed after the use of 5 ppm·5 min ozone in plants of the variety ‘21-17’ across both years of cultivation. The different effects of the ozone doses used may indicate different reactions depending on the variety used and the year of cultivation. Overall, the study found that ozone does not have a phytotoxic effect on most varieties, which may indicate different reactions and differences between varieties. The use of an appropriate dose of ozone did not cause any disruption in the selected physiological parameters of *Lonicera caerulea* L. plants. The absence of phytotoxicity in some varieties may allow the use of ozonation treatments in agriculture; however, further research on the long-term effects on plants is required.

**Keywords:** *Lonicera caerulea*; ozonation; sustainability; NFI; Fm/Fv; leaf gas exchange



Academic Editor: Harvey Hou

Received: 24 February 2025

Revised: 20 March 2025

Accepted: 21 March 2025

Published: 22 March 2025

**Citation:** Basara, O.; Gorzelany, J. Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. *Sustainability* **2025**, *17*, 2820. <https://doi.org/10.3390/su17072820>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Genus *Lonicera* is one of 200 species belonging to family Caprifoliace. An important species from Central Asia and Eastern Europe is the blue honeysuckle—*Lonicera caerulea* [1]. This species contains several botanical varieties, such as *L. caerulea* var. *kamtschatica*, *altaica*, *edulis*, *emphyllocalyx* and *boczkarnikovae*, found in regions of Russia and Japan. *Lonicera caerulea* L. has a well-known botanical variety, *L. kamtschatica*, which is commonly referred to in Poland as the ‘Kamchatka berry’. It is recognized as one of the first fruit-bearing plants to mature in Poland [2,3]. Referred to as the ‘haskap berry’, *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* Nakai, which originated from Hokkaido, is a lesser-known botanical variety of *Lonicera caerulea* L., which thrives in the cold intermountain areas from central to northern regions of Japan [4]. *L. caerulea* varieties are well known for their rich content of compounds such as

cyanidin-3-glucoside and chlorogenic acid, which have a wide range of health-promoting effects [5,6]. *Lonicera caerulea* can reach heights of 0.8 to 3.0 m, has a lifespan of 25 to 30 years and is well adapted to adverse environmental conditions that induce plant growth [7]. The phytochemical composition of *Lonicera caerulea* L. provides various advantages for its growth, development and resistance to environmental stresses. These compounds also play a key role in improving the plant's ability to interact effectively with its environment [8,9].

Ozone (O<sub>3</sub>) is a broad-spectrum, high-efficiency and rapid bactericidal compound known for its strong oxidant effect [9]. Its application in suitable doses can influence the levels of bioactive compounds and positively impact storage possibilities by minimizing water loss, reducing microbial contamination and lowering ethylene emissions from treated fruits [10–12]. Due to its wide range of applications, apart from food processing, ozonation is increasingly used in agriculture [13]. The effective use of ozonation in agricultural practices requires determining the appropriate dose of ozone, which may vary depending on the plant species, variety and propagation season. Long-term exposure to ozone gas can cause a number of disorders in plant growth and development, thereby reducing plant growth, disturbing its gas exchange and the synthesis of biochemical compounds and reducing yield [14]. Numerous scientific studies have documented a decline in net photosynthesis (PN) as a result of exposure to elevated ozone levels. Photosynthesis is the primary physiological process impacted by excessive ozone in the troposphere, particularly in sensitive plants [15,16]. Physiological damage that may occur after the use of ozone gas requires the determination of an appropriate ozone dose, which may prevent a decrease in plant health [17,18]. Ozone eliminates agricultural pests through multiple mechanisms. It can penetrate cell walls and disrupt the enzyme metabolism of insects [13,19]. Ozone treatment, along with its ability to remove pesticide residues, has made it a widely adopted, residue-free method for improving soil quality, sanitizing food and purifying water [20]. The use of ozonation in plant production can be an effective means of reducing fungal diseases, reducing the microbial load and eliminating plant pests that transmit diseases [15,21]. When ozone is applied to soil or nutrient solutions, it boosts oxygen levels, which subsequently improves root respiration [22]. The European Green Deal's regulations, which seek to drastically cut the application of agricultural pesticide products in agriculture, are accelerating the lookout for sustainable alternatives. The search for eco-friendly alternatives that enhance plant protection while ensuring crop quality, safety and production profitability is being driven by initiatives aimed at drastically reducing the use of plant protection products in agriculture [23]. Due to the growing popularity of *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*, along with the large scale of their cultivation, using an appropriate dose of gaseous ozone could be beneficial in agrotechnical treatments for these species [24].

This study analyzes the main physiological characteristics of two botanical varieties of *Lonicera caerulea* after ozonation, such as the content of chlorophyll, flavanols and anthocyanins; chlorophyll fluorescence properties; and leaf gas exchange parameters. This study may reveal the effect of gaseous ozone on the physiological properties of plants and the possibility of using ozone treatments during cultivation. The research results are of great significance for improving the ozonation technology used on *Lonicera caerulea*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

The experiment was conducted in a potted plant nursery located in Tyczyn (49°57'52" N 22°2'47" E, Subcarpathian Voivodship, Poland), during years of 2021–2023. Plants of *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* cultivars 'Vostorg', 'Jugana' and 'Aurora', later referred

to as LK, and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* 'Lori', '21-17' and '139-24', later referred to as LE, were used in this study. The research material consisted of 3-year-old plants with a height of 1.40 cm to 1.50 cm in the early stage of fruit development. Growth conditions, fertilization method and weather conditions prevailing during this experiment are mentioned in our previous study [25].

## 2.2. Ozone Treatments

In each year of the experiment, ozonation was performed three times: during fruit setting, greening and ripening. Gaseous ozone was used at a concentration of 5 ppm for 1 min, 3 min and 5 min (flow 40 g O<sub>3</sub>·h<sup>-1</sup>). The concentrations used in the experiment were selected based on preliminary experiments, the results of which are not published in this experiment. Preliminary studies were carried out in 2021, on the same group of plants, at different times, to determine the optimal ozone dose and the appropriate time of day for ozonation. Based on preliminary research, it was determined that doses of gaseous ozone higher than 5 ppm·5 min caused visible symptoms of physiological damage in half of the ozonated plants. The optimal time of day for ozonation was the evening; ozonation performed in the morning when the plants were covered with dew or during the day when the sun was shining intensely resulted in increased symptoms of phytotoxicity [Figure 1].



**Figure 1.** Plant damage during preliminary tests. (A) Healthy LE plants; (B) physiological damage on LE caused by ozone exposure.

Ozone was produced with KORONA A 40 Standard (Korona, Piotrków Trybunalski, Poland) with the UV-106-M ozone solution detector (Ozone Solution, Hull, MA, USA). The ozonation treatment was performed in a chamber with dimensions of 1.50 × 1.20 × 1 m, created for the purposes of the study. Temperature and relative humidity inside and outside the chamber during ozonation were measured using BRESSER ClimaTemp IO (Bresser, Rhede, Germany). The plants taking part in the experiment were randomly divided; ten plants were used in the treatment and control groups. Plants were ozonated in batches of 10, and each variety was ozonated individually. Immediately after the ozonation treatment, the generator was turned off and the chamber was opened and the plants removed. An even distribution of ozone was possible thanks to two pipes that supplied ozone from two sides and a fan that allowed for the even injection of ozone into the cubicle of the entire chamber. Before taking measurements of physiological traits, several young upper shoots with young leaves were marked on each plant. Each measurement of physiological traits (pigment content, chlorophyll fluorescence and gas exchange) was taken from young

leaves located on these shoots; measurements were taken from each of the ozone-exposed plants. The parameters studied during the experiment were measured in accordance with the order established during ozonation.

### 2.3. Content of Chlorophyll, Flavonols and Anthocyanins

The content of chlorophyll (ChlM; T850 nm/T720 nm), flavonols (FlvM, F660 nm/F325 nm) and anthocyanins (AnthM; F660 nm/F525 nm) in *Lonicera caerulea* L. plants was determined using an MPM-100 multi-pigment meter (ADC Bioscientific Ltd., Hoddesdon, UK), based on the methodologies in study of Cerovic et al., 2008 [26]. The analysis was repeated in each year of the study, at the same time interval. Pigment content was measured on the 1st, 3rd and 5th day after ozonation. For each measurement, one leaf per plant was selected. Data were analyzed from 10 measurements each (one per plant), for both treatment and control groups. Using the initial data regarding content of chlorophyll and flavonols, the nitrogen–flavonol index (NFI; (T850/T720)/(F660/F3)) was calculated.

### 2.4. Chlorophyll Fluorescence

The OJIP fluorescence transient analysis was conducted using OS30p Chlorophyll Fluorometer (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Fully developed young leaves were used for analysis. Before measurement, leaves were dark adapted for 20 min. The analysis was repeated in each year of the study, at the same time interval. Fluorescence analyses were performed on the 1st, 3rd and 5th day after ozonation. For each measurement, one leaf per plant was selected. Data were analyzed from 10 measurements each (one per plant) for both treatment and control groups. The OJIP fluorescence parameters were calculated based on the formulas shown in Table 1.

**Table 1.** Explanation of formulas of the steps of fluorescence induction.

Parameter	Formula Explanation
F <sub>0</sub>	Minimum fluorescence intensity (50 μs)
F <sub>0</sub>	Fluorescence intensity on O step (20 μs)
F <sub>J</sub>	Fluorescence intensity on J step (2 ms)
F <sub>I</sub>	Fluorescence intensity on I step (60 ms)
F <sub>m</sub>	Maximal fluorescence also known as P step
F <sub>v</sub> (F <sub>m</sub> /F <sub>0</sub> )	Variable fluorescence of PSII (F <sub>v</sub> = F <sub>m</sub> – F <sub>0</sub> )
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Variable fluorescence to maximal fluorescence (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> = (F <sub>m</sub> – F <sub>0</sub> )/F <sub>m</sub> )
F <sub>v</sub> /F <sub>0</sub>	The stress-detecting parameter (F <sub>v</sub> /F <sub>0</sub> = (F <sub>m</sub> – F <sub>0</sub> )/F <sub>0</sub> )
V <sub>j</sub>	V <sub>j</sub> = (F <sub>j</sub> – F <sub>0</sub> )/F <sub>m</sub> – F <sub>0</sub>
M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub> = (F <sub>300</sub> – F <sub>50</sub> )/(F <sub>m</sub> – F <sub>50</sub> )/0.25 ms
Pi <sub>total</sub>	PI <sub>total</sub> = PI <sub>Abs</sub> × {(1 – V <sub>i</sub> )/(1 – V <sub>j</sub> )} / [1 – {(1 – V <sub>i</sub> )/(1 – V <sub>j</sub> )}]

The study evaluated the initial parameters of minimum fluorescence (F<sub>0</sub>) measured at 50 μs, F<sub>0</sub>—O step measured at 20 μs, F<sub>J</sub>—J step measured at 2 ms, F<sub>I</sub>—I step measured at 60 ms and maximum fluorescence (F<sub>m</sub>) and variable fluorescence (F<sub>v</sub>) according to Baker et al., 2004 [27]. The F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> ratio represents the maximum quantum yield of photosystem II (PS II) and serves as an indicator of the maximum efficiency of excitation energy transfer. The potential activity of PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>), sensitive stress detecting parameters, were measured. The JIP test translates the initial parameters to biophysical parameters, used to calculate fluorescence required for calculation of the initial slope (M<sub>0</sub>) and total fluorescence performance index (PI<sub>total</sub>) [28,29].

### 2.5. Gas Exchange Parameters of *Lonicera caerulea* L.

Gas exchange parameters of *Lonicera caerulea* L. were measured using L*Ci* T (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). The study evaluated the following gas exchange parameters: CO<sub>2</sub> assimilation rate—A (μmol·mol<sup>-1</sup>), stomatal conductance—G<sub>s</sub> (mol·m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), transpiration rate—E (mol·m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) and sub-stomatal CO<sub>2</sub> concentration—C<sub>i</sub> (μmol·mol<sup>-1</sup>), based on the methodologies in study of Joshi et al., 2020 [30]. The analysis was repeated in each year of the study, at the same time interval. Gas exchange parameters were measured on the 1st, 3rd and 5th day after ozonation. For each measurement, one leaf per plant was selected. Data were analyzed from 10 measurements each (one per plant), for both treatment and control groups.

### 2.6. Statistical Analysis

The Statistica 13.3. program (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA) was used to calculate results of a statistical evaluation, which included analysis of variance (ANOVA) and the significance LSD test at a significance level of  $\alpha = 0.05$ . The Kolmogorov–Smirnov test was used to check whether the data followed a normal distribution, while the Brown–Forsythe test was employed to evaluate the homogeneity of variances.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. The Value of Individual Pigments and the Nitrogen–Flavonol Index of Leaves

Pigments contained in leaves have a significant impact on plant biological processes. Plant stress caused through external factors can disrupt the biosynthesis of pigments in leaves and also accelerate their degradation. The extent of variation in chlorophyll levels is often regarded as an indicator of a plant's sensitivity [31]. The content of individual pigments and the nitrogen–flavonol index (NFI) depending on the year of the experiment and the tested botanical variety is presented in Table 2.

**Table 2.** The content of individual pigments and the nitrogen–flavonol index depending on the botanical variety and year of cultivation.

Variable	ChlM	FlvM	AnthM	NFI	
<i>Lonicera caerulea</i> var. <i>kamstchatica</i>					
Variety	Vostorg	0.47 ± 0.09 <sup>bc</sup>	1.36 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.09 <sup>ab</sup>
	Jugana	0.50 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.42 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.07 <sup>ab</sup>
	Aurora	0.50 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.07 <sup>b</sup>
	<i>Lonicera caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i>				
	Lori	0.44 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>a</sup>
	21-17	0.41 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>a</sup>
139-24	0.46 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>b</sup>	
Average	0.45 ± 0.09	1.41 ± 0.11	0.11 ± 0.06	0.33 ± 0.08	
<i>p</i> value	0.0054	0.0036	0.0058	0.0003	
Year of study	2022	0.45 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.07 <sup>a</sup>
	2023	0.43 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.08 <sup>a</sup>
	Average	0.44 ± 0.10	1.40 ± 0.11	0.12 ± 0.06	0.33 ± 0.07
	<i>p</i> value	0.1636	0.2441	0.1845	0.2054
Interaction	V	V	V	V	

Explanation: ChlM—chlorophyll content; FlvM—flavonol content; AnthM—anthocyanin content; NFI—nitrogen–flavonol index; V—variable. The values represent the mean ± SD; SD—standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of  $p < 0.05$ .

In the analyzed plants, the average values of individual pigments and the average nitrogen–flavonol index (NFI) were determined to be as follows: ChlM—0.45, FlvM—1.41, AnthM—0.11 and NFI—0.33. The LK plants exhibited a higher average content of the tested pigments, with LK leaves having an 11.2% higher ChlM compared to the LE plants. The nitrogen–flavonol index coefficient varied significantly between varieties within the LE group. The average NFI value in the tested botanical varieties was the same—0.33. The pigment values in the LK and LE leaves did not differ significantly depending on the year of cultivation. Chlorophyll levels serve as reliable indicators of a plant’s nitrogen status. In nitrogen deficit, plants generate increased amounts of flavonoids or carbon-based compounds. Since nitrogen is essential in the composition of chlorophyll in leaves, assessing chlorophyll levels can help determine the plant’s nutritional status in relation to this element and the potential negative impact of external factors on the plant [32,33].

Quantitative indicators of plant health can be assessed either during or immediately after abiotic and biotic stresses. Increased ozone content in the atmosphere can be a stress factor, causing a loss of chlorophyll in plant leaves, thereby reducing photosynthetic power [14]. The effect of gaseous ozone on LK and LE leaves was different depending on the applied dose and the day of measurement (Table 3).

**Table 3.** The content of individual pigments and the nitrogen–flavonol index in LK and LE leaves depending on ozone exposure time.

Lenght of Ozonation	Time After Ozonation [Days]	ChlM	FlvM	AnthM	NFI
Control	1	0.45 ± 0.10 <sup>cd</sup>	1.36 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.08 <sup>bc</sup>
	3	0.44 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.11 <sup>bc</sup>	0.12 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>c</sup>
	5	0.46 ± 0.10 <sup>d</sup>	1.43 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>c</sup>
	Average	0.44 ± 0.09	1.39 ± 0.10	0.13 ± 0.08	0.34 ± 0.08
5 ppm·1 min	1	0.44 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.11 <sup>abc</sup>	0.15 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.07 <sup>a</sup>
	3	0.44 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.11 <sup>bc</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>b</sup>
	5	0.45 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>b</sup>
	Average	0.44 ± 0.10	1.41 ± 0.11	0.13 ± 0.05	0.31 ± 0.07
5p pm·3 min	1	0.43 ± 0.10 <sup>bc</sup>	1.38 ± 0.10 <sup>abc</sup>	0.14 ± 0.08 <sup>bc</sup>	0.33 ± 0.09 <sup>bc</sup>
	3	0.45 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.36 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.09 <sup>c</sup>
	5	0.45 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>b</sup>
	Average	0.44 ± 0.09	1.39±0.12	0.12 ± 0.06	0.33 ± 0.08
5 ppm·5 min	1	0.43 ± 0.11 <sup>bc</sup>	1.37 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.15 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.08 <sup>a</sup>
	3	0.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.09 <sup>abc</sup>	0.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>b</sup>
	5	0.40 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.09 <sup>b</sup>
	Average	0.41 ± 0.13	1.43 ± 0.10	0.12 ± 0.03	0.31 ± 0.08
	<i>p</i> value	0.0008	0.0035	0.0024	0.0042
	Interaction	L × T	L × T	L × T	L × T

Explanation: ChlM—chlorophyll content; FlvM—flavonoid content; AnthM—anthocyanin content; NFI—nitrogen–flavonol index; L—length of ozonation; T—time after ozonation. The values represent the mean ± SD; SD—standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of  $p < 0.05$ .

The effect of gaseous ozone doses applied to the botanical varieties was similar. Significant differences between the tested plants occurred only after the dose of 5 ppm·5 min was applied. In our experience, a decrease in the tested parameters was observed in most variants on the 3rd day after ozonation. Despite the lack of visible plant damage by gaseous ozone, the use of ozone for 5 min significantly reduced the average value of the ChlM parameter, and consequently, the nitrogen–flavonol index. The use of an ozone dose of

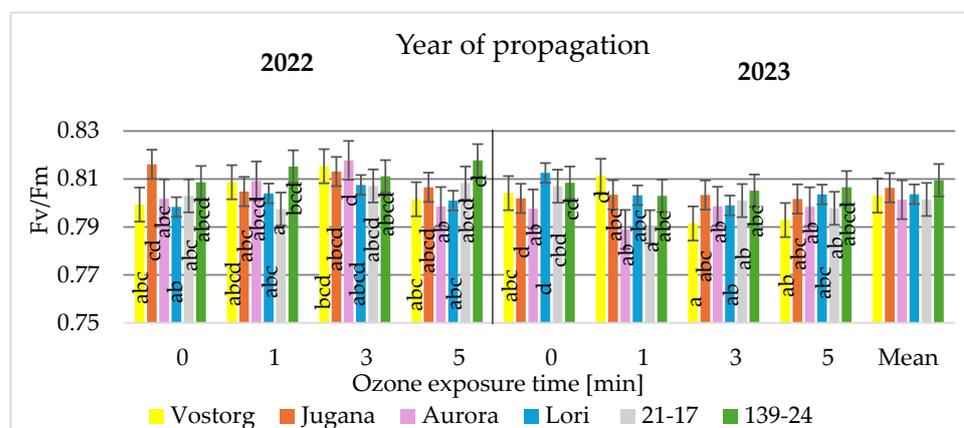
5 ppm·5 min, compared to the control sample, resulted in a decrease in the average ChlM and NFI parameters by 6.8% and 8.8%, respectively. A similar relationship can be observed in the study of Boublin et al., 2022 [34], where ozonation caused a decrease in the chlorophyll content in *Arabidopsis thaliana*; however, the response varied depending on the variety. Plant response to ozone may vary depending on plant species, variety, weather and ozone concentration. In study of Brazaitytė et al., 2009 [35], the use of gas had an effect depending on the plant species tested; however, it led to a reduction in the levels of chlorophyll and carotenoids.

The application of ozone gas at a dose of 5 ppm for 3 min did not significantly affect the tested parameters, compared to the control sample. This may indicate that ozone at this dose does not induce plant stress in *Lonicera caerulea* L. Similarly, in a study conducted by Fujiwara et al., 2009 [36], the application of lower doses of ozone did not cause stress reactions in cucumber leaves; while having the ability to disinfect powdery mildew, higher doses of ozone spray showed visible physiological disorder. The use of an appropriate dose of ozone to eliminate pests and reduce residues of plant protection products is consistent with the assumptions of sustainable agriculture, which encourages a decrease in pesticide use [10,37,38].

Based on the analysis of individual pigments of the LK and LE plants, it is concluded that the appropriate dose of gaseous ozone, 5 ppm for 3 min in our experiment, does not cause significant changes in the pigment content in leaves, thus not causing any disturbances in plant photosynthesis. The use of a longer time or a higher concentration of gaseous ozone may cause changes in the ChlM content and the nitrogen–flavonol index parameter. Applying an ozone dose of 5 ppm for 5 min significantly reduced the ChlM and NFI values in the tested plants, suggesting a potential negative impact of ozone.

### 3.2. Physiological Parameters of Leaves

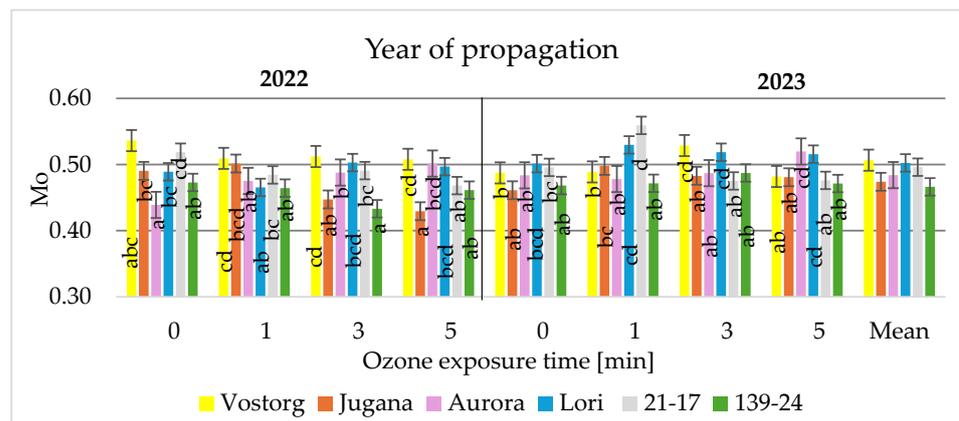
Stress occurring in the growing environment of the selected plants leads to a reduction in the maximum quantum efficiency of the photosystem. The maximum quantum efficiency of the photosystem II (Fv/Fm) serves as a commonly used measure to evaluate the condition of photosynthesis in plants [39]. The influence of ozone gas on Fv/Fm of LK and LE is presented in Figure 2. The Fm/Fv value in LK and LE leaves ranges from 0.79–0.81, regardless of the year of cultivation and the dose of gaseous ozone. The most favorable Fv/Fm range is from 0.79 to 0.84 for many species of plants. Reduced values may indicate the occurrence of plant stress [40].



**Figure 2.** The effect of gaseous ozone on the maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) of the leaves of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean (n = 10) ± SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of p < 0.05.

The use of gaseous ozone does not have a significant effect on the tested parameter in any of the tested varieties. The average Fv/Fm value of the leaves not subjected to ozonation was 0.80, and that of the leaves ozonated at any dose was 0.81. Conducting the Fv/Fm test on plants allows for an easy assessment of whether the applied biotic and abiotic factors have a stressful impact on the tested plants [39]. A similar relationship can be observed in the study of Zardzewiały et al., 2024 [41], where the gaseous ozone did not significantly impact the Fv/Fm parameter of tomato leaves.

The net rate of PS II closure (Mo) is one of the important physiological parameters defining the rate of primary photochemistry [41]. The impact of ozone gas on the Mo of the LK and LE varieties is presented in Figure 3.



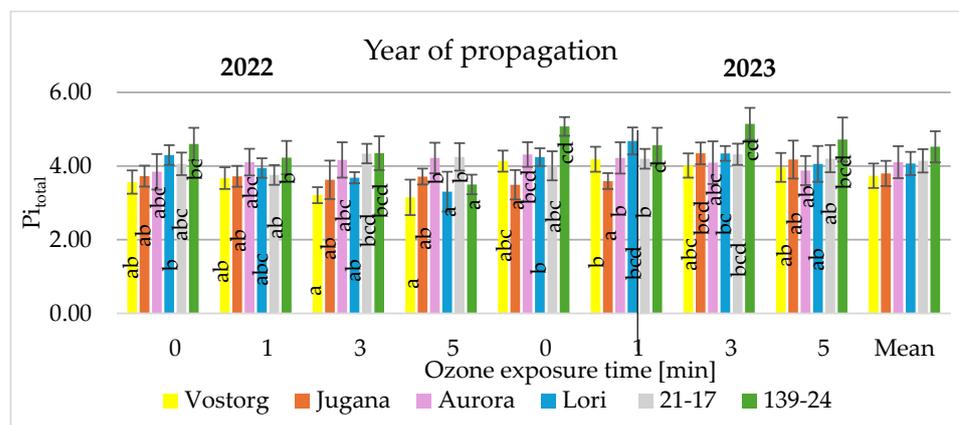
**Figure 3.** The effect of gaseous ozone on the net rate of PS II closure (Mo) of the leaves of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean ( $n = 10$ )  $\pm$  SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of  $p < 0.05$ .

The value of the Mo parameter depends on the year of the experiment, the plant variety and the dose of ozone used. The Mo value in LK and LE leaves ranges from 0.43–0.56, regardless of the year of cultivation and the dose of gaseous ozone. The use of gaseous ozone had no significant effect on the average value of the Mo parameter in most of the LK and LE leaves. However, in 2022, the LK variety ‘Jugana’ responded differently, showing a 12.5% decrease in the Mo value of ozonated leaves compared to the control sample. In the study of Thwe et al., 2014 [42], the authors observed an increase in the Mo parameter in ozonated plants by 26%. In our experience, a similar relationship can be observed in the LK ‘Aurora’ variety, which was characterized by an increase in Mo in 2022 and 2023 in ozonated leaves by 14.3% and 7.5%, respectively. Fluctuations in the Mo parameter of ozonated leaves may cause alteration of the photosynthesis processes during growth [43]. Deviations in the Mo value of ozonated LK and LE leaves may cause disturbances in plant photosynthesis.

The performance index of absorption basis ( $Pi_{total}$ ) is a multi-parametric expression of these three independent steps contributing to photosynthesis [44]. The performance index is utilized in multiple studies to measure the impact of environmental factors like cold stress, heat, drought and ozone on photosynthesis [45,46]. The influence of ozone gas on the  $Pi_{total}$  of the LK and LE varieties is presented in Figure 4.

The  $Pi_{total}$  parameter value is influenced by the year of the experiment, the plant variety and the dose of ozone used. The use of an ozone dose of 5 ppm·5 min in 2022, compared to the control sample, resulted in a decrease in the average  $Pi_{total}$  value of the LE varieties ‘Lori’ and ‘139-24’. The mean  $Pi_{total}$  value of the leaves of ‘Lori’ and ‘139-24’, ozonated for 5 min, was lower by 23.1% and 23.8%, respectively. For the remaining tested varieties, the  $Pi_{total}$  value in the ozonated leaves did not differ significantly from the control

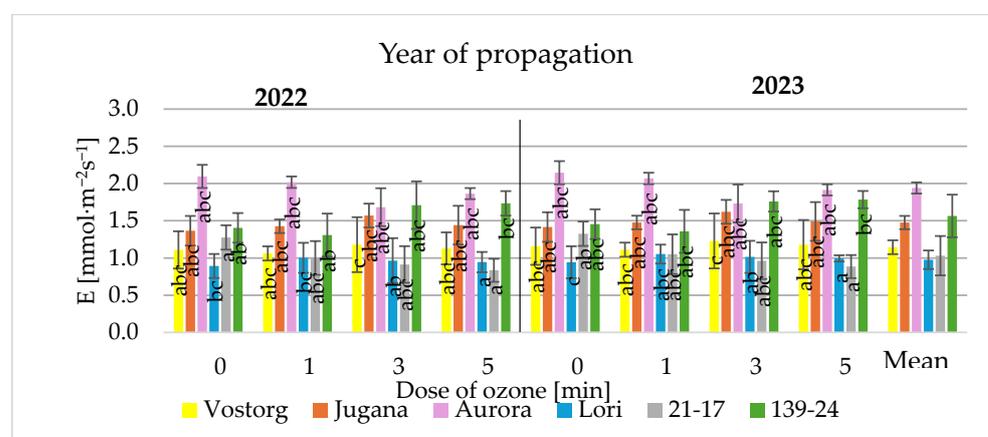
sample, regardless of the propagation year. According to study of Bussotti et al., 2007 [16], the use of leaf ozonation resulted in a decrease in the performance index ( $Pi_{total}$ ). In the study of Ballarin-Denti et al., 2005 [47], ozonation increased the  $Pi_{total}$  value, thus increasing the photosynthetic efficiency of *Quercus robur* and *Pulus nigra*. The susceptibility of plants to gaseous ozone is a species characteristic; some species may not react in the same way as others. The results obtained in the experiment indicate a different effect of ozone on varieties within one species. The lack of significant differences between the non-ozonated and ozonated plants indicates the good physiological condition of the plants.



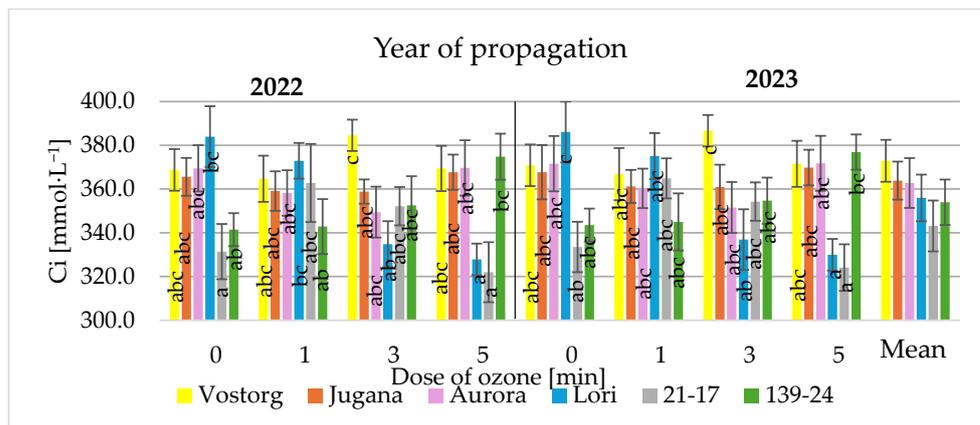
**Figure 4.** The effect of gaseous ozone on the performance index ( $Pi_{total}$ ) of the leaves of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean ( $n = 10$ )  $\pm$  SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of  $p < 0.05$ .

### 3.3. Gas Exchange Parameters of Leaves

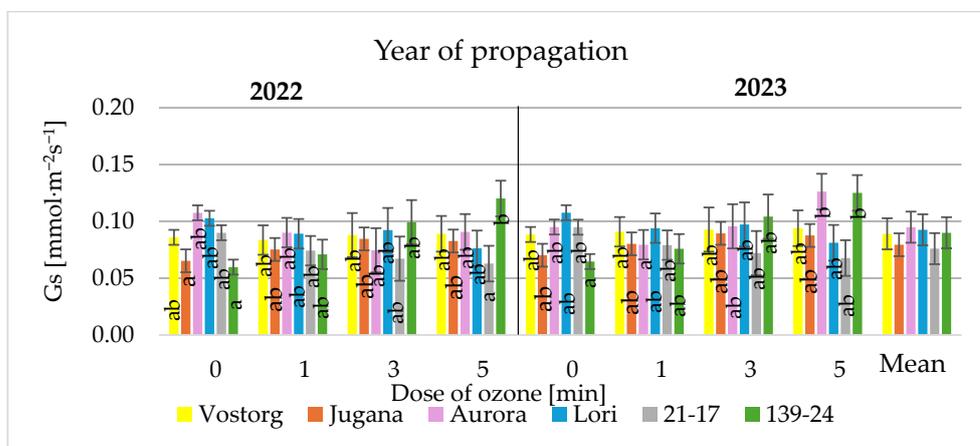
During cultivation, various factors impact plant development, inducing stress and disrupting physiological functions, which can ultimately restrict development and harvest. An early response to environmental stress is the alteration in gas exchange, occurring before the redistribution of biomass [48]. The gas exchange parameters  $E$ —transpiration rate,  $G_s$ —stomatal conductance and  $C_i$ —intercellular  $CO_2$  concentration may reflect the actual physiological state of the plant and the influence of ozone. Higher ozone contents in the atmosphere cause a reduction in stomatal conductance and thus transpiration in plants [49,50]. The effect of ozone gas on the transpiration parameters of *Lonicera caerulea* L. varieties is shown in Figures 5–7.



**Figure 5.** The effect of ozone gas on the transpiration rate ( $E$ ) of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean ( $n = 10$ )  $\pm$  SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of  $p < 0.05$ .



**Figure 6.** The effect of ozone gas on the intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci) of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean (n = 10) ± SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of p < 0.05.



**Figure 7.** The effect of ozone gas on the stomatal conductance (Gs) of LK and LE varieties in 2022–2023. The values represent the mean (n = 10) ± SD, where SD represents the standard deviation. The alphabetical letters represent significant differences at the level of p < 0.05.

The value of the gas exchange parameters depends on the year of the experiment, the plant variety and the dose of ozone used. Regardless of the year of production, the average value of the gas exchange parameters did not change significantly in most varieties after ozonation. A significant decrease of 34.3% in the transpiration rate, E, was observed in both years of cultivation in ozonated plants of the LE variety ‘21-17’. In 2022, a significant decrease of 29.1% in stomatal conductance (Gs) was observed in the LE variety ‘21-17’ after applying an ozone dose of 5 ppm for 5 min. In the study of Hoshika et al., 2022 [51], researchers point to the negative impact of ozone on stomatal conductance and transpiration rate. In study of Matłok et al., 2024 [52], the use of an appropriate dose of ozone gas did not cause any significant decline in the health of raspberry leaves. Chlorophyll fluorescence and gas exchange measurements that deviate from the norm in the case of ozonated plants indicate a decrease in the plant’s health. For the remaining varieties of LK and LE, the registered gas exchange measurement corresponded with the established values of the nitrogen–flavonol index and chlorophyll fluorescence parameter. The lack of significant deviations between the ozonated plants and non-ozonated plants indicates that the plants were in good physiological condition. The different reaction of the ‘21-17’ LE variety indicates the possibility of differences between varieties within a single species.

In our experience, it has been determined that gaseous ozone can be used in agrotechnical treatments of *Lonicera caerulea* L. plants because it does not cause disturbances in the

physiological parameters tested in most varieties. Apart from changes in the physiological parameters of the plants, no visible symptoms of growth disorders such as a significant reduction in the size of the bushes were observed. However, when using ozone, it is necessary to take into account possible differences between varieties, which will force the use of a different concentration, the determination of which is difficult due to the unstable nature of ozone.

#### 4. Conclusions

According to this study, changes in the chlorophyll fluorescence, contents of individual pigments and gas exchange parameters in leaves were found in different LK and LE varieties. The use of an appropriate dose of gaseous ozone does not cause significant deviations in the tested parameters, indicating a lack of phytotoxic effects in most varieties. The nitrogen–flavonol index (NFI) in the non-ozonated leaves and those ozonated for 3 min was the same—0.33. The mean  $Pi_{total}$  value of the leaves of the ‘Lori’ and ‘139-24’ varieties decreased by 23.1% and 23.8%, respectively, after 5 min of ozonation. In the other tested varieties, the  $Pi_{total}$  value in ozonated leaves showed no significant difference in comparison to the control group, irrespective of the propagation year. The average gas exchange parameters did not change significantly in most varieties after ozonation, although a significant decrease of 34.3% in the transpiration rate,  $E$ , was observed in both years of cultivation in ozonated plants of the LE variety ‘21-17’. This may indicate different reactions within the same species. On the basis of this study, ozone does not have a phytotoxic effect on most varieties. It was determined that ozone at a dose of no more than 5 ppm·5 min can be used for agrotechnical treatments without a significant effect on some physiological parameters. The use of ozonation for plant protection may contribute to the development of cultivation technology for *Lonicera caerulea* L. Further development of ozonation technology for *Lonicera* plants may contribute to the development of cultivation technology for this species. Further research on this species should focus on the long-term effects of ozone on plants and its impact on biochemical and molecular properties.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.B. and J.G.; methodology, O.B. and J.G.; software, O.B.; validation, O.B. and J.G.; formal analysis, O.B.; investigation, O.B.; resources, J.G.; data curation, O.B.; writing—original draft preparation, O.B.; writing—review and editing, O.B. and J.G.; visualization, O.B.; supervision, O.B. and J.G.; project administration, O.B. and J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

#### References

1. Bieniek, A.A.; Grygorieva, O.; Bielska, N. Biological Properties of Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.): A Review: The Nutrition, Health Properties of Honeysuckle. *Agrobiodivers. Improv. Nutr. Health Life Qual.* **2021**, *5*. [[CrossRef](#)]
2. Gawronski, J.; Hortynski, J.; Kaczmarek, E.; Dyduch-Sieminska, M.; Marecki, W.; Witorozec, A. Evaluation of phenotypic and genotypic diversity of some Polish and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and clones. *Acta Sci. Polonorum. Hortorum Cultus* **2014**, *13*, 157–169.
3. Kucharska, A.Z.; Sokół-Łętowska, A.; Oszmiański, J.; Piórecki, N.; Fecka, I. Iridoids, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.). *Molecules* **2017**, *22*, 405. [[CrossRef](#)]
4. Thompson, M.M.; Barney, D.L. Evaluation and breeding of haskap in North America. *J. Am. Pomol. Soc.* **2007**, *1*, 25.

5. Ochmian, I.D.; Skupień, K.; Grajkowski, J.; Smolik, M.; Ostrowska, K. Chemical Composition and Physical Characteristics of Fruits of Two Cultivars of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in Relation to their Degree of Maturity and Harvest Date. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2012**, *40*, 155–162.
6. Kula, M.; Krauze-Baranowska, M. Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)—The current state of phytochemical research and biological activity. *Post. Fitoter.* **2016**, *17*, 111–118.
7. Jia, L.; He, X.; Chen, W.; Liu, Z.; Huang, Y.; Yu, S. Hormesis phenomena under Cd stress in a hyperaccumulator—*Lonicera japonica* Thunb. *Ecotoxicology* **2013**, *22*, 476–485.
8. Nawaz, M.A.; Razaganova, M.P.; Rusakova, E.A.; Petrusha, E.N.; Sabitov, A.S.; Chunikhina, O.A.; Ercisli, S.; Tikhonova, N.G.; Golokhvast, K.S. Global metabolome profiles of *Lonicera caerulea* L. and *Lonicera caerulea* ssp. *kamtschatica* (Sevast.) Gladkova. *Turk. J. Agric. For.* **2024**, *48*, 745–759.
9. Miller, F.A.; Silva, C.L.M.; Brandão, T.R.S. A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Eng. Rev.* **2013**, *5*, 77–106.
10. Fan, X. Gaseous ozone to preserve quality and enhance microbial safety of fresh produce: Recent developments and research needs. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 4993–5014. [[CrossRef](#)]
11. Kuźniar, P.; Belcar, J.; Zardzewiały, M.; Basara, O.; Gorzelany, J. Effect of Ozonation on the Mechanical, Chemical, and Microbiological Properties of Organically Grown Red Currant (*Ribes rubrum* L.) Fruit. *Molecules* **2022**, *27*, 8231. [[CrossRef](#)]
12. Fan, X.; Shang, D.L.; Lan, Y.B.; Bai, J.B.; Han, X. Application of ozone technology and ozone plant protection devices in agriculture. *J. Agric. Sci. Technol.* **2020**, *22*, 71–77.
13. Msayleb, N.; Ibrahim, S. Treatment of nematodes with ozone gas: A sustainable alternative to nematicides. *Phys. Procedia* **2011**, *21*, 187–192. [[CrossRef](#)]
14. Grulke, N.E.; Heath, R.L. Ozone effects on plants in natural ecosystems. *Plant Biol.* **2020**, *22*, 12–37. [[CrossRef](#)]
15. Afsah-Hejri, L.; Hajeb, P.; Ehsani, R.J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1777–1808. [[CrossRef](#)]
16. Bussotti, F.; Strasser, R.J.; Schaub, M. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test: A review. *Environ. Pollut.* **2007**, *147*, 430–437. [[CrossRef](#)]
17. Díaz-López, M.; Siles, J.A.; Ros, C.; Bastida, F.; Nicolás, E. The effects of ozone treatments on the agro-physiological parameters of tomato plants and the soil microbial community. *Sci. Total Environ.* **2022**, *812*, 151429. [[CrossRef](#)]
18. Zardzewiały, M.; Matłok, N.; Piechowiak, T.; Saletnik, B.; Balawejder, M.; Gorzelany, J. Preliminary Tests of Tomato Plant Protection Method with Ozone Gas Fumigation Supported with Hydrogen Peroxide Solution and Its Effect on Some Fruit Parameters. *Sustainability* **2024**, *16*, 3481. [[CrossRef](#)]
19. Baskakov, I.V.; Orobinsky, V.I.; Gievsky, A.M.; Gulevsky, V.A.; Chernyshov, A.V. Ozone pest control of grain. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2023**, *1138*, 012026. [[CrossRef](#)]
20. Aidoo, O.F.; Osei-Owusu, J.; Chia, S.Y.; Dofuor, A.K.; Antwi-Agyakwa, A.K.; Okyere, H.; Gyan, M.; Edusei, G.; Ninsin, K.D.; Duker, R.Q.; et al. Remediation of pesticide residues using ozone: A comprehensive overview. *Sci. Total Environ.* **2023**, *894*, 164933. [[CrossRef](#)]
21. Di Vittori, L.; Mazzoni, L.; Battino, M.; Mezzetti, B. Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Sci. Hort.* **2018**, *233*, 310–322.
22. Remondino, M.; Valdenassi, L. Different Uses of Ozone: Environmental and Corporate Sustainability. Literature Review and Case Study. *Sustainability* **2018**, *10*, 4783. [[CrossRef](#)]
23. Cheng, S.; Wang, Y.; Sun, M.; Zheng, J.; Zhu, X.; Zhao, T. Effects of Elevated Surface Ozone Concentration on Photosynthetic Fluorescence Characteristics and Yield of Soybean Parents and Offspring. *Atmosphere* **2023**, *14*, 1368. [[CrossRef](#)]
24. Cheng, Z.; Bao, Y.; Li, Z.; Wang, J.; Wang, M.; Wang, S.; Li, B. *Lonicera caerulea* (Haskap berries): A review of development traceability, functional value, product development status, future opportunities, and challenges. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 8992–9016. [[CrossRef](#)]
25. Basara, O.; Gorzelany, J. Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. *Molecules* **2024**, *29*, 3616. [[CrossRef](#)]
26. Cerovic, Z.; Moise, N.; Agati, G.; Latouche, G.; Ben Ghazlen, N.; Meyer, S. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 650–654. [[CrossRef](#)]
27. Baker Neil, R.; Oxborough, K. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2004; pp. 65–82.
28. Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659–668.
29. Strasser, B.J.; Strasser, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1995; pp. 977–980.

30. Joshi, N.C.; Yadav, D.; Ratner, K.; Kamara, I.; Aviv-Sharon, E.; Irihimovitch, V.; Charuvi, D. Sodium hydrosulfide priming improves the response of photosynthesis to overnight frost and day high light in avocado (*Persea americana* Mill, cv. 'Hass'). *Physiol. Plant.* **2020**, *168*, 394–405. [[PubMed](#)]
31. Sulkiewicz, M.; Ciereszko, I. Fluorescencja chlorofilu a-historia odkrycia i zastosowanie w badaniach roślin. *Kosmos* **2016**, *65*, 103–115.
32. Muñoz-Huerta, F.R.; Guevara-Gonzalez, G.R.; Contreras-Medina, M.L.; Torres-Pacheco, I.; Prado-Olivarez, J.; Ocampo-Velazquez, R.V. A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances. *Sensors* **2013**, *13*, 10823–10843. [[CrossRef](#)]
33. Hu, H.; Zhang, G.; Zheng, K. Modeling Leaf Image, Chlorophyll Fluorescence, Reflectance from SPAD Readings. *IEEE J. Sel. Top. Appl. Earth Obs. Remote Sens.* **2014**, *7*, 4368–4373.
34. Boublin, F.; Cabassa-Hourton, C.; Leymarie, J.; Leitao, L. Potential involvement of proline and flavonols in plant responses to ozone. *Environ. Res.* **2022**, *207*, 112214. [[CrossRef](#)]
35. Brazaitytė, A.; Duchovskis, P.; Urbonavičiūtė, A.; Samuolienė, G.; Jankauskienė, J.; Kasiulevičiūtė-Bonakėrė, A.; Bliznikas, Z.; Novičkovas, A.; Breivė, K.; Žukauskas, A. The effect of light-emitting diodes lighting on cucumber transplants and after-effect on yield. *Zemdirb.-Agric.* **2009**, *96*, 102–118.
36. Fujiwara, K.; Fujii, T.; Park, J.-S. Comparison of Foliar Spray Efficacy of Electrolytically Ozonated Water and Acidic Electrolyzed Oxidizing Water for Controlling Powdery Mildew Infection on Cucumber Leaves. *Ozone Sci. Eng.* **2009**, *31*, 10–14. [[CrossRef](#)]
37. Antos, P.; Piechowicz, B.; Gorzelany, J.; Matlok, N.; Migut, D.; Jozefczyk, R.; Balawejder, M. Effect of Ozone on Fruit Quality and Fungicide Residue Degradation in Apples during Cold Storage. *Ozone Sci. Eng.* **2009**, *40*, 482–486. [[CrossRef](#)]
38. Heleno, F.F.; Queiroz, M.E.L.R.D.; Neves, A.A.; Freitas, R.S.; Faroni, L.R.A.; Oliveira, A.F.D. Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazole from strawberries and on their quality. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2014**, *49*, 94–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wu, Q.; Zhang, Y.; Xie, M.; Zhao, Z.; Yang, L.; Liu, J.; Hou, D. Estimation of Fv/Fm in Spring Wheat Using UAV-Based Multispectral and RGB Imagery with Multiple Machine Learning Methods. *Agronomy* **2023**, *13*, 1003. [[CrossRef](#)]
40. Kalaji, H.M.; Schansker, G.; Brestic, M.; Bussotti, F.; Calatayud, A.; Ferroni, L.; Goltsev, V.; Guidi, L.; Jajoo, A.; Li, P.; et al. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth. Res.* **2017**, *132*, 13–66. [[CrossRef](#)]
41. Zardzewiały, M.; Matlok, N.; Turan, J.; Balawejder, M.; Gorzelany, J. Yeast solution spray and ozone gas fumigation as methods of protecting tomato plants against diseases. *Agric. Eng.* **2024**, *28*, 215–233. [[CrossRef](#)]
42. Thwe, A.A.; Kasemsap, P. Quantification of OJIP fluorescence transient in tomato plants under acute ozone stress. *Agric. Nat. Resour.* **2014**, *48*, 665–675.
43. Strasser, R.J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynth. Mech. Regul. Adapt.* **2000**, *25*, 445–483.
44. Strasser, R.J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. Analysis of the fluorescence transient. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*; Papageogiou, G., Govindjee, Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2000; Volume 19, pp. 321–362.
45. Hermans, C.; Smeyers, M.; Rodriguez, R.M.; Eyletters, M.; Strasser, R.; Dehaye, J.P. Quality assessment of urban's trees: A comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP test. *J. Plant Physiol.* **2003**, *160*, 81–90. [[PubMed](#)]
46. Strauss, A.; Krüger, G.; Strasser, R.; Van Heerden, P. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environ. Exp. Bot.* **2006**, *56*, 147–157.
47. Ballarin-Denti, A.; Bussotti, F.; Cascio, C.; Desotgiu, R.; Gerosa, G.; Marzuoli, R.; Strasser, R.J.; Tagliaferri, A. An open-top chamber experiment at Curno (Northern Italy): Results of the first year of activity. Workshop: Critical levels of ozone: Further applying and developing the flux-based concept. In Proceedings of the Background Document of the ICP Vegetation Meeting, Obergurgl, Austria, 15–19 November 2005.
48. Hasanuzzaman, M.; Hossain, M.A.; da Silva, J.A.T.; Fujita, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; pp. 261–315.
49. Lombardozzi, D.; Levis, S.; Bonan, G.; Sparks, J.P. Predicting photosynthesis and transpiration responses to ozone: Decoupling modeled photosynthesis and stomatal conductance. *Biogeosciences* **2012**, *9*, 3113–3130. [[CrossRef](#)]
50. Yu, H.; Blande, J.D. A potential ozone defense in intercellular air space: Clues from intercellular BVOC concentrations and stomatal conductance. *Sci. Total Environ.* **2022**, *852*, 158456.

51. Hoshika, Y.; Paoletti, E.; Centritto, M.; Gomes, M.T.G.; Puértolas, J.; Haworth, M. Species-specific variation of photosynthesis and mesophyll conductance to ozone and drought in three Mediterranean oaks. *Physiol. Plant.* **2022**, *174*, e13639.
52. Matłok, N.; Piechowiak, T.; Szostek, M.; Kuboń, M.; Neuberger, P.; Kapusta, I.; Balawejder, M. Modification of Fungicide Treatment Needs and Antioxidant Content as a Result of Real-Time Ozonation of Raspberry Plants. *Molecules* **2024**, *29*, 3949. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

# Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone

Oskar Basara <sup>1,2</sup>  and Józef Gorzelany <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Food and Agriculture Production Engineering, University of Rzeszów, St. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland; oskarb@dokt.ur.edu.pl

<sup>2</sup> Doctoral School, University of Rzeszów, St. Rejtana 16C, 35-959 Rzeszow, Poland

\* Correspondence: jgorzelany@ur.edu.pl

**Abstract:** *Lonicera caerulea* L. fruits are a rich source of vitamins, organic acids, and phenolic compounds, which are characterised by their health-promoting properties. The content of bioactive compounds in this fruit may vary depending on the cultivar and the harvest date. This study analysed the effect of applying 5 ppm gaseous ozone for 1, 3, and 5 min on the chemical properties of *L. kamtschatica* varieties and newly created clones of *L. emphyllocalyx* for three years of cultivation. The fruits harvested from *L. emphyllocalyx*, depending on the year of harvest, had significantly larger size and weight compared to *L. kamtschatica*. On average, the acidity of the *L. emphyllocalyx* clones was 6% higher than other tested varieties. The average content of ascorbic acid was highest in *L. emphyllocalyx* clone '21-17'—57.80 mg·100 g<sup>-1</sup>; the year of harvest will significantly affect the content of vitamin C, reaching the highest level in 2022—53.92 mg·100 g<sup>-1</sup>. The total content of polyphenols was significantly dependent on the year of cultivation; reaching, on average, 54.8% more in 2022 compared to the rest of the years. The total antioxidant value using the FRAP, DPPH, and ABTS methods varied depending on the variety; exposure to ozone significantly increased the antioxidant value in each case. On the basis of the study, both botanical varieties can be used in food processing. Gaseous ozone exposure can significantly influence chemical composition, increasing the health-promoting value of fruit.



**Citation:** Basara, O.; Gorzelany, J. Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. *Molecules* **2024**, *29*, 3616. <https://doi.org/10.3390/molecules29153616>

Academic Editor: Francesco Cacciola

Received: 10 July 2024

Revised: 26 July 2024

Accepted: 29 July 2024

Published: 31 July 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** *Lonicera caerulea* L.; ozonation; ascorbic acid; polyphenol content; antioxidant value; morphological properties

## 1. Introduction

*Lonicera caerulea* L. is a known species found in forests and mountainous and low-lying wet regions of Europe, North Asia, and North America. The genus *Lonicera* consists of over 200 cultivars; the most commonly planted are blue honeysuckle, originating in Russia, Japan, and Canada [1]. *Lonicera caerulea* L. has several botanical varieties that come from Russia: *L. caerulea* var. *edulis*, *L. caerulea* var. *altaica*, *L. caerulea* var. *boczarnikovae*, and *L. caerulea* var. *kamtschatica*; and from the Japanese island of Hokkaido: *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* [2]. *L. kamtschatica*, commonly called the 'kamczatka berry' in Poland, is a well-known botanical variety of *Lonicera caerulea* L., recognised for its cylindrical shape berries, which are among the earliest ripening fruit plants in Poland [3]. *L. emphyllocalyx*, also known as the 'haskap berry', is a lesser-known variety characterised by fruit shape more reminiscent of highbush blueberries, lesser fruit falling, and later ripening time compared to *L. kamtschatica* [4].

*L. caerulea* L. fruits are primarily composed of fibre, protein, calcium, and magnesium, and they also have high concentrations of glucose and fructose, with traces of sucrose and sorbitol. They are a rich source of polyunsaturated fatty acids, especially linoleic acid and are notable for their high ascorbic acid content [5]. Studies have showed the richness of

*L. caerulea* L. in anthocyanin compounds, with cyanidin 3-glucoside being the predominant anthocyanin, comprising 79–92% of the total content. Other anthocyanins present in smaller amounts include cyanidin 3,5-diglucoside (4.27%), cyanidin 3-rutinoside (2.07%), peonidin 3-glucoside (3.44%), and pelargonidin 3-glucoside (0.83%) [6]. *L. caerulea* berries are characterised by high content of polyphenols ranging from 426.1 to 622.52 mg GAE·100 g<sup>-1</sup> f.w., which have strong antioxidant properties: 68.68–89.62% (DPPH inhibition), 1.91–2.26 mM TE·100 g<sup>-1</sup> f.w. (ABTS), and 27.96–49.90 μM Fe<sup>2+</sup>·g<sup>-1</sup> f.w. (FRAP) [7,8]. Berries are a known source of vitamin C (ascorbic acid), ranging from 30.8 to 62.6 mg·100 g<sup>-1</sup> f.w. [8]. The berries are used to produce spreads, juices, and wines, and the fruits are also dried to extend their shelf life and change the content of health-promoting compounds [9]. Due to their exceptional richness in anthocyanin compounds, these fruits can be regarded as excellent sources of natural colourants, offering a range of colours from red to purple, pink, or blue. They have potential applications in various sectors, including food, pharmaceuticals, and cosmetics.

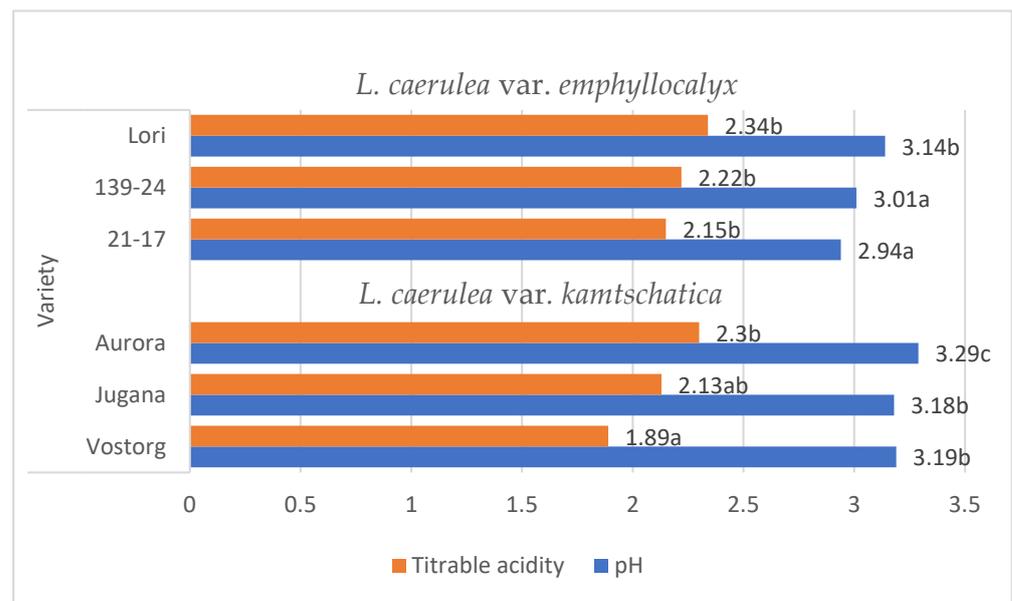
Ozone (O<sub>3</sub>) is a powerful oxidising agent commonly used in its gaseous form, without leaving any trace of toxic residues. Ozonation is an environmentally friendly, non-thermal food preservation method that does not decrease the quality of the fruit [10]. If used in the right dose, it can change metabolic processes, increasing a total amount of bioactive compounds and enhancing antioxidant value. The profile of phenolic compounds and the quantity of compounds may change when ozone gas is used [11]. The gaseous ozonation positively impacts fruit storage by reducing water loss, microbial load, and decreasing ethylene released from the treated fruit, thus extending the shelf-life of produce [12,13]. Food processing faces the challenge of preserving bioactive compounds in food while ensuring a long shelf life and maintaining fresh-like sensory quality. The processing of fruits can alter the sensory quality and levels of polyphenols; water loss caused by processing methods, such as heating, might change the concentration of some compounds. Ozone interacts with certain organic compounds in food, leading to the formation of by-products such as ketones, carboxylic acids, and aldehydes, which do not pose any risk to human health [13,14]. Ozonation may be superior to thermal processing for food preservation, as it minimises the loss of nutrients during storage and can increase amounts of phenolic compounds and ascorbic acid [15].

The purpose of our study was to compare the chemical compositions of the berries of *L. caerulea* var. *kamtschatica* ('Vostorg', 'Jugana', and 'Aurora' cultivars) and *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* ('Lori' cultivar and '21-17', '139-24' clones) and the potential use of the *L. emphyllocalyx* fruit and ozone fumigation in food processing. Various studies must be conducted before new breeding clones of *L. caerulea* are registered and introduced into cultivation. The results of studies on the chemical properties of *L. emphyllocalyx* clones 'Lori', '21-17' and '139-24' have not yet been published. The effect of ozone fumigation on the antioxidant activity, and total amount of polyphenolics and ascorbic acid was also examined.

## 2. Results and Discussion

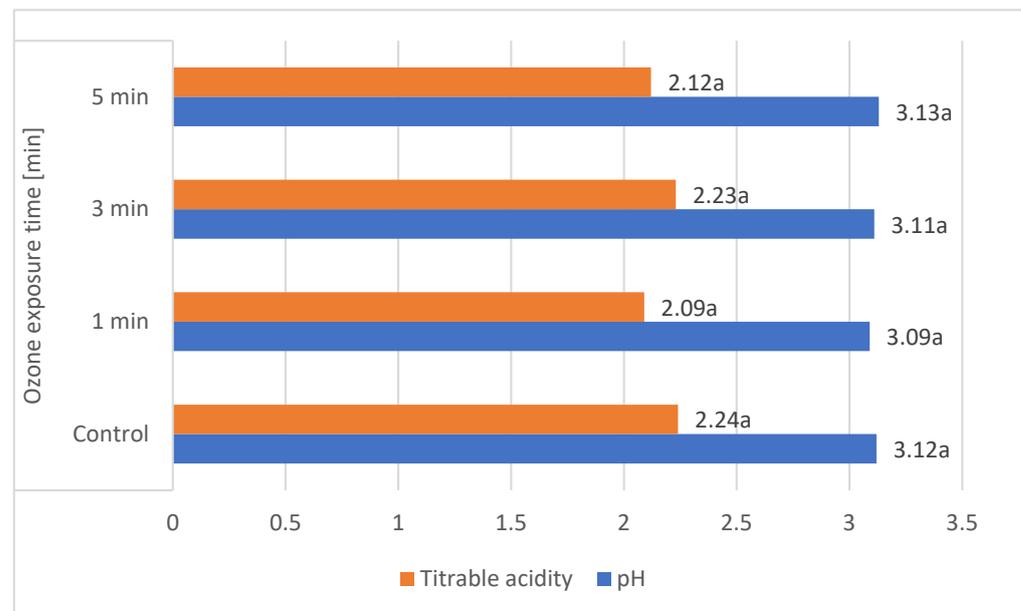
### 2.1. Changes in pH and Acidity in *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* Fruits in Relation to Ozonation Time

*Lonicera caerulea* L. berries are rich source of organic acids (e.g., citric, shikimic, quinic, tartaric acid), the contents of individual organic acids significantly influence the taste qualities of ripe fruit and their acceptability to consumers. A characteristic of *Lonicera caerulea* L. berries is their high level of acidity, which has a very negative impact on the sensory experience [15]. The organic acid content of the fruit decreases with successive stages of ripening. These organic acids are degradable and can change in concentration due to various factors, such as temperature [9,16,17]. The average pH values of the *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* berries were 3.18–3.29 and 2.94–3.14, respectively [Figure 1].



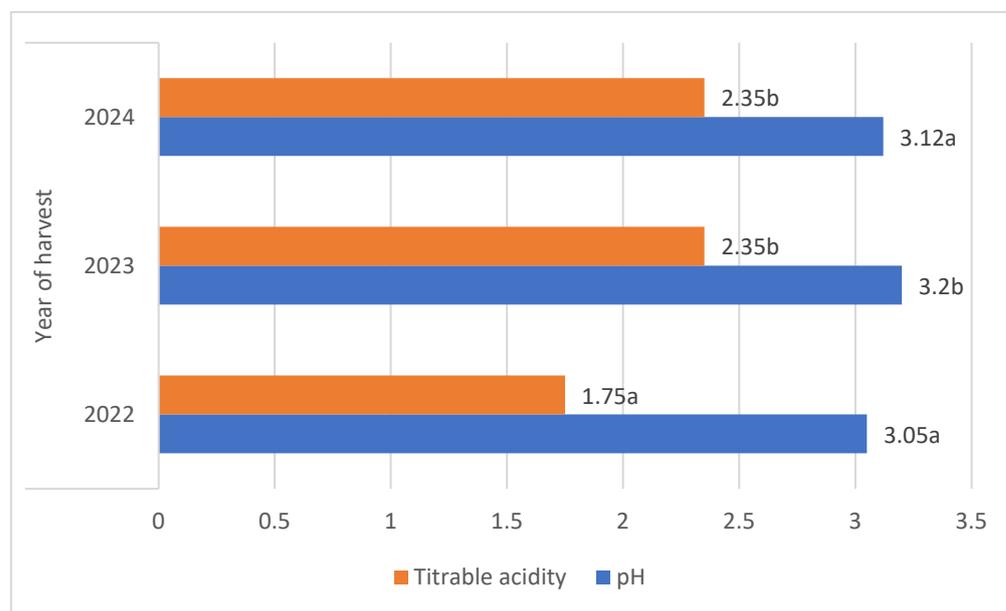
**Figure 1.** Average pH and total acidity (g·100 g<sup>-1</sup>) of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits obtained. Data are expressed as mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD; SD: standard deviation. Mean values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

These results are comparable to those obtained by other authors. According to Gerbrandt et al., 2018 [18], the fruit pH of *L. caerulea* ranged from 2.42 to 3.57, depending on the cultivar and location. According to MacKenzie et al., 2018 [19], the pH of *L. caerulea* berries ranged from 3.0 to 3.4, depending on cultivar and harvesting year. In this study, *L. emphyllocalyx* was characterised by a significant lower-than-6% average pH compared to analysed varieties of *L. kamtschatica*. The use of ozone gas did not significantly affect the pH. of the fruit [Figure 2].



**Figure 2.** Average pH and total acidity (g·100 g<sup>-1</sup>) of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits subjected to gaseous ozone exposure. Data are expressed as mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD; SD: standard deviation. Mean values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

There were significant differences in the fruit harvest date; berries of both botanical varieties harvested in 2023 were characterised by an average pH that was 5% higher compared to other years [Figure 3].



**Figure 3.** Average pH and total acidity ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits depending on year of harvest. Data are expressed as mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD; SD: standard deviation. Mean values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

The pH value is varied compared to other fruit species popular in Poland, e.g., high-bush blueberry fruit: 2.76–3.33 [20], raspberry: 3.72 [21], strawberry: 3.20–4.00 [22].

The average titrable acidity values of the *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* berries were 1.89–2.30  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  and 2.15–2.34  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , respectively [Table 1]. The results obtained in this study are comparable to those obtained by Gerbrandt et al., 2018 [18]; the titrable acidity of *Lonicera caerulea* L. berries were from 1.64 to 3.52% CAE. In this study, *L. kamtschatica* was characterised by a significant lower-than-6% average titrable acidity in comparison to *L. emphyllocalyx*. There were no significant changes in total acidity after the use of ozonation. Berries of all tested varieties harvested in year 2022 were characterised by a significant lower-than-25% titrable acidity in comparison to other years. A decrease in the pH and an increase in the acidity of the fruit can significantly affect the organoleptic properties of the fruit, making it more or less desirable to consumers [23]. The significantly higher pH and lower acidity of berries may be related to the content of bioactive compounds such as polyphenols or ascorbic acid [24]. Berries of *L. kamtschatica* are characterised by a higher pH and lower acidity average, making them potentially better in taste. In our study, the year of harvest had a significant impact on the pH and acidity of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx*, which coincides with the results obtained in the study of MacKenzie et al., 2018 [19], where there were significant differences between the year of harvest. Obtained results are comparable with other popular berries grown in Poland, e.g., cranberry (1.56–1.60  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) [25], raspberry (1.67–1.76  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) [21], red currant (0.7–1.6  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) [26].

## 2.2. Contents of Bioactive Compounds in *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* Berries

Ascorbic acid, known as vitamin C, is a water-soluble vitamin and antioxidant essential for human health. It plays a vital role in the synthesis of collagen, the absorption of iron, the maintenance of the immune system, and the repair of tissues. Ascorbic acid also helps protect cells from damage by free radicals [27,28]. The average content of ascorbic acid in

*L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* was 49.74–54.32 mg·100 g<sup>-1</sup> and 53.13–57.80 mg·100 g<sup>-1</sup> [Table 1].

**Table 1.** Average contents of ascorbic acid, total polyphenols content, and antioxidant value of ozonated *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits obtained in three harvesting years.

Variable		Ascorbic Acid [mg·100 g <sup>-1</sup> ]	Total Polyphenols Content [mg·100 g <sup>-1</sup> ]	FRAP [μM Fe <sup>2+</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	DPPH [% Inhibition]	ABTS [μM TE·g <sup>-1</sup> ]
<i>L. caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i>						
Variety	Vostorg	51.05 ab	310.12 d	28.97 c	82.16 ab	0.33 c
	Jugana	49.74 a	261.38 ab	29.81 b	79.89 a	0.31 a
	Aurora	54.32 d	278.08 c	25.42 a	79.50 a	0.36 d
	<i>L. caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i>					
	21-17	57.80 bc	276.05 bc	29.53 bc	83.10 ab	0.35 c
	139-24	53.13 cd	231.59 a	28.00 b	82.87 ab	0.34 b
	Lori	54.08 d	286.92 b	29.48 c	85.41 b	0.36 c
SL		***	***	***	***	***
Ozone exposure time [min]	Control	51.74 a	251.57 a	27.78 a	82.37 cd	0.33 a
	1 min	53.98 a	266.78 b	28.22 ab	81.62 ab	0.35 b
	3 min	51.69 a	299.71 c	28.51 ab	85.14 d	0.34 ab
	5 min	52.81 a	278.27 b	29.64 b	79.15 a	0.35 b
	SL		ns	***	***	***
Year of harvest	2022	53.92 b	390.88 b	32.69 b	83.44 b	0.33 a
	2023	50.43 a	212.31 a	22.14 a	85.50 b	0.35 b
	2024	53.18 b	219.05 a	30.78 b	79.48 a	0.35 b
SL		***	***	***	***	***

Data are expressed as mean values ( $n = 3$ ) ± SD; SD: standard deviation. Mean values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). SL: level of significance; ns: not significant; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

The results obtained in this study are comparable with those obtained by Ochmian et al., 2008 [29]. Researchers have shown that the content of ascorbic acid varies depending on the variety and ranges from 40.5 to 98.0 mg·100 g<sup>-1</sup>. According to Česonie et al., 2021 [30], the content of ascorbic acid in *L. caerulea* varies and ranges from 14.55 to 53.58 mg·100 g<sup>-1</sup> depending on the cultivar. The average content of ascorbic acid was higher in *L. emphyllocalyx* fruits, only the 'Aurora' variety *L. kamtschatica* had a comparable amount of vitamin C—54.32 mg·100 g<sup>-1</sup>. On average, *L. kamtschatica* varieties had 6.1% less ascorbic acid in comparison to tested *L. emphyllocalyx* varieties. The use of ozone did not significantly affect the ascorbic acid content. In the year 2023, significantly less vitamin C was recorded in fruit of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* compared to other years. In 2023, there was, on average, 5.9% less ascorbic acid compared to other years of cultivation. According to Ochmian et al., 2008 [29], the content of ascorbic acid varied depending on the variety and year of harvest, which coincides with the results obtained in this experiment. Most varieties of *L. emphyllocalyx* are characterised by the higher average content of vitamin C compared to *L. kamtschatica*, thus increasing their health-promoting properties. The vitamin C content in the fruit is much higher compared to other species grown in Poland, e.g., blackthorn, 21.94 mg·100 g<sup>-1</sup>; blackberry, 33.85 mg·100 g<sup>-1</sup> [31]; strawberry, 23.8–45.17 mg·100 g<sup>-1</sup> [32]; raspberry, 12.10–45.52 mg·100 g<sup>-1</sup> [33].

The phenolic compounds, primarily anthocyanins, in *L. caerulea* fruit extract demonstrate anti-inflammatory effects. They reduce cellular damage under oxidative stress in in vitro cultures of rat microsomes and decrease ROS production in cultures of proinflammatory gingival fibroblasts [34,35]. The average total polyphenol content value in *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* ranged from 261.38 to 310.12 mg·100 g<sup>-1</sup> and 231.59 to 286.92 mg·100 g<sup>-1</sup>. Results obtained in this study are comparable with those obtained by Pažereckaitė et al., 2020 [36], where the total polyphenol content ranged from 282 to

781 mg·100 g<sup>-1</sup>, depending on the tested cultivar. The choice of variety had a significant impact on the total content of phenolic compounds; the average content of compounds was higher in *L. kamtschatica*. The average content of polyphenols in the tested *L. kamtschatica* varieties was lower by 6.5% compared to the *L. emphyllocalyx* varieties. According to Kucharska et al., 2017 [3], different varieties contained different profiles of phenolic compounds; some varieties contained compounds that other varieties did not, e.g., variety 'Vostorg' did not contain di CQA 2 and di CQA 3, compared to other studied varieties. A different profile of phenolic compounds may significantly affect the total polyphenol content. Fruits with a larger diameter harvested at the optimal harvest time may contain higher anthocyanin content due to the larger skin area [9]. There was a significant effect of exposure to ozone gas (ozonation for 3 min); it significantly increased the content of phenolic compounds in fruits. The average total amount of phenolic compounds was higher by 11.5% in varieties subjected to ozone exposure of 5 ppm·3 min. The results obtained in this experiment coincide with those obtained by Piechowiak et al., 2019 [14], where ozonated fruits had a higher content of phenolic compounds. Significant differences in the total polyphenol content in individual years of cultivation prove the importance of cultivation conditions. The total amount of phenolic content in *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits was higher by 54.8% in 2022. The total polyphenol content in fruits of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* are comparable to other popular berries grown in Poland, e.g., strawberries—238.0 mg GAE·100 g<sup>-1</sup> f.w. [22], highbush blueberry—424.72 mg GAE·100 g<sup>-1</sup> f.w. [37], and blackberry—247.25 mg GAE·100 g<sup>-1</sup> f.w. [31].

Among bioactive compounds, polyphenols are the most abundant group of chemical compounds found in *L. caerulea* fruits. Fruit extract containing phenolic compounds is a highly effective antioxidant agent, significantly reducing reactive oxygen species (ROS) produced by immune cells during inflammation [38]. Antioxidant activity of berries primarily depends on their chemical composition, particularly the content and varied structure of polyphenolic compounds, which influence their antioxidant potential [38]. The average FRAP antioxidant activity is similar in all tested varieties, ranging from 25.42 to 28.97 μM Fe<sup>+2</sup>·g<sup>-1</sup> in *L. kamtschatica* berries and 28.00 to 29.53 μM Fe<sup>+2</sup>·g<sup>-1</sup> in fruits of *L. emphyllocalyx*. The results obtained in this study are comparable to those obtained by Rupasinghe et al., 2012 [7], where FRAP antioxidant activity was dependent on the tested variety and was within the range from 27.96 to 46.90 μM Fe<sup>+2</sup>·g<sup>-1</sup>. The average DPPH antioxidant activity in *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* was 79.50–82.16% and 82.87–85.41%, respectively. In the study by Lee et al., 2018 [39], the researchers obtained results similar to this experiment. The DPPH value ranged from 33.9 to 95.96%, depending on the concentration of the extract. The antioxidant value of ABTS varied; in the case of *L. kamtschatica*, it was in the range of 0.31–0.36 mM TE·g<sup>-1</sup>, and in the case of *L. emphyllocalyx*, it was in the range of 0.34–0.36 mM TE·g<sup>-1</sup>. The results obtained in this study are comparable to those obtained by Oszmiański et al., 2016 [40], where the antioxidant value of ABTS was 0.30 mM TE·g<sup>-1</sup>. The tested *L. emphyllocalyx* varieties showed, on average, higher antioxidant values tested using the FRAP, DPPH, and ABTS methods. Our previous study [8], as well as other studies [30,41], indicate the possibility of differences in the antioxidant value of different botanical varieties but also varieties of the same species. The results obtained in this experiment indicate that *L. emphyllocalyx* has more effective antioxidant activity, thus more significantly reducing ROS compared to the tested variety of *L. kamtschatica*. The effect of exposure to ozone gas was varied; however, the antioxidant value in ozonated fruits was higher compared to the control sample. In our previous study [26], the effect of ozonation within one variety was different depending on the chosen method of measuring the antioxidant value. Fruits exposed to ozone showed higher antioxidant content due to a lower loss of polyphenols compared to control samples. Climatic conditions and the date of harvest in particular years may significantly affect the saturation of the fruit with bioactive compounds, including the antioxidant value of berries [41]. In 2023, in the months during which the fruit ripened (May and April), the lowest average monthly temperature was observed during the years studied, which could

have a significant impact on the content of health-promoting compounds in the fruit. The berries of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* in 2023 were characterised by the lowest average content of bioactive compounds. This indicates the influence of monthly average temperature on vegetation, which may be directly related to the origin of plants from cold regions of the world. Research on the antioxidant activity of *L. caerulea* extracts has shown that the fruits of this plant possess strong antioxidant properties. Given the link between modern diseases and long-term oxidative stress, these strong antioxidant properties suggest that *L. caerulea* may be important not only for disease prevention but also for the treatment of various conditions.

### 2.3. Determination of the Morphology and Colour of Berries

In each year of the experiment, fruits from all cultivars were harvested six or seven times. The mass, size, and colour of the berries are crucial factors in assessing their quality and appeal to customers. Significant differences between the fruits of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* were found [Figures 4 and 5].



**Figure 4.** *L. caerulea* var. *kamtschatica* berries at different stages of maturity.

The average length and width of berries were 21.49 and 8.83 cm for *L. kamtschatica* and 20.09 and 10.70 cm for *L. emphyllocalyx* [Table 2].

A significant difference in fruit size was observed. The shape of *L. kamtschatica* fruits was more cylindrical, the average fruit length was longer, and the width was smaller, compared to *L. emphyllocalyx* fruits. The fruits of *L. emphyllocalyx* were characterised by a rounder shape, slightly resembling a highbush blueberry. On average, the weight of *L. kamtschatica* was lower, 35.5%. Larger fruits may be more attractive to a potential consumer. The *L. emphyllocalyx* varieties were characterised by fruits with a significantly average darker colour, 28.30, with a lower average redness value, 3.01. The shape and weight of the fruit have a significant impact on the transport and storage process.



**Figure 5.** *L. caerulea* var. *emphylocalyx* berries at different stages of maturity.

**Table 2.** Morphological features and colour of *L. kamtschatica* and *L. emphylocalyx* berries.

Variety	Length [mm]	Width [mm]	Weight [g]	L*	a*	b*
<i>L. caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i>						
Vostorg	22.54 b	9.11 ab	1.21 b	27.74 a	3.82 c	−2.87 c
Jugana	23.49 b	9.28 ab	1.38 c	26.79 a	3.15 b	−2.43 b
Aurora	18.46 a	8.10 a	0.86 a	27.92 a	2.92 b	−2.45 b
<i>L. caerulea</i> var. <i>emphylocalyx</i>						
Lori	19.30 a	8.95 a	1.49 c	27.94 a	2.45 a	−2.06 a
21-17	22.08 b	11.09 c	1.85 d	29.21 b	3.69 c	−2.49 b
139-24	18.90 a	12.07 c	2.01 e	27.76 a	2.88 b	−2.30 a
SL	***	***	***	*	***	***

Data are expressed as mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD; SD: standard deviation. Mean values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). SL: level of significance; ns: not significant; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Material

The fruits of the *L. kamtschatica* cultivars ‘Vostorg’, ‘Jugana’, and ‘Aurora’ and *L. emphylocalyx* ‘Lori’, ‘21-17’, and ‘139-24’ were obtained from a nursery crop located in Tyczyn (49°57′52″ N, 22°2′47″ E, Podkarpackie Voivodship, Poland) in the years 2022–2024. Both species were grown in pots filled with substrate-containing peat, sand, and perlite in a ratio of 20:1:1. In 2022, 3–4 m of Osmocote Exact (ICL, Sydney, Australia) and a 2.0 kg·m<sup>−3</sup> concentration of substrate were added. In 2023–2024, the plants were periodically supplied with Kristalon Blue (Yara, Oslo, Norway) in a concentration of 0.4 kg·m<sup>−3</sup>. The average monthly temperature and rainfall from 2022–2024 in the period of March to June in Tyczyn are represented in Table 3.

The fruits of the analysed cultivars were harvested by hand at the stage of their maturity, 1000 g each. The harvest time varied significantly, depending on the tested variety [Table 4]. In 2024, due to weather conditions and rapid plant development, fruit ripening and harvesting took place approximately 2 weeks earlier, compared to previous years. Immediately after harvest, the fruits were subjected to chemical analysis.

**Table 3.** The average monthly temperature and rainfall from 2022–2024 in the period of March to June in Tyczyn.

Year of Harvest	2022				2023				2024			
Month of Year	III	IV	V	VI	III	IV	V	VI	III	IV	V	VI
Average temperature [°C]	3	7	15	20	5.5	8.2	13.2	17.4	7	11	16	22
The lowest temperature in the month [°C]	−2.5	2.4	7.7	13	0.9	3.4	7.1	12	−3	1	5.7	10
The highest temperature in the month [°C]	8.9	12	21	27	7.7	13.3	18.9	23.1	9.5	17.2	20.5	23.1
Rainfall [mm]	28.1	51.1	38.8	27.3	79.8	45.9	52.1	45.4	23.1	35.6	59.4	67.3

**Table 4.** Harvest time of all analysed varieties in 2022–2024.

Variety	2022	2023	2024
Vostorg	15 May	17 May	5 May
Jugana	15 May	17 May	5 May
Aurora	25 May	29 May	17 May
21-17	12 June	12 June	5 June
139-24	6 June	8 June	26 May
Lori	6 June	8 June	30 May

### 3.2. Ozone Treatment of Berries

Before harvest, the whole *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* plants with fruits were subjected to ozonation treatment. The plants were randomised into four batches containing 10 plants, each bearing around 250 g of fruits. Gaseous ozone was used at a concentration of 5 ppm for 1 min, 3 min, and 5 min (flow 40 g O<sub>3</sub>·h<sup>−1</sup>, temperature 20 °C). The ozone was produced with a KORONA A 40 Standard (Korona, Piotrków Trybunalski, Poland) with a 106 M UV Ozone Solution detector (Ozone Solution, Hull, MA, USA).

### 3.3. Determination of pH and Acidity

The total acidity (as citric acid) and the pH of the *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* fruits were analysed through the potentiometric titration of the sample for analysis with a standard 0.1 M NaOH solution at pH = 8.1 using TitroLine 5000 (SI Analytics, Weiheim, Germany) according to the method given in PN-EN 12147:2000 [42]. The results are expressed as g of citric acid per 100 g of fruit. Each fruit was analysed 24 h after ozonation. The analyses were performed in triplicate.

### 3.4. Determination of the Contents of Bioactive Compounds in Fruit and Determination of Their Antioxidant Activity

The ascorbic acid (Vitamin C) content was determined according to PN-A-04019:1998 [43]. The total polyphenol content (mg GAE·100 g<sup>−1</sup> f.w.) was determined using the Folin-Ciocalteu method, according to the methodology described by Bakowska-Barczak et al., 2007 [44].

The antioxidant activity of the fruits was determined by using three different methods. DPPH antioxidant activity was measured according to a methodology given by Jurčaga et al., 2021 [45]; the results were expressed as the % of inhibition of DPPH radicals. The ABTS antioxidant activity was measured according to Gawroński et al., 2014 [46]; results were expressed in μM TE·g<sup>−1</sup> f.w. The FRAP antioxidant activity was determined according to the methodology given by Rupasinghe et al., 2012 [7]; results are given in μM Fe<sup>2+</sup>·g<sup>−1</sup> f.w. Each fruit was analysed 24 h after ozonation. All analyses were performed in triplicate.

### 3.5. Determination of the Morphological Characteristics of Berries

The sample size was 10 fruits from each variant. For individual fruits, the length and width [mm] were determined with an accuracy of 0.01 mm, and the weight was determined with an accuracy of 0.001 g. Each fruit was measured 24 h after ozonation.

### 3.6. Colour of *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx* Berries

The colour analysis of the fruits was conducted via a reflection method by using a Chrome Meter colorimeter (Konica Minolta, Osaka, Japan) with a CR 400 head ( $\varnothing = 11$  mm). The colorimeter was calibrated against a standard (No. 21833042) [47]. The reflectance method was applied at the standard lighting and 2° observer. The measurements results were read in the colorimetric system CIE LAB (CIE 1978)—L\* (lightness), a\* (redness), and b\* (yellowness), taking three measurements for each sample. Each fruit was analysed 24 h after ozonation.

### 3.7. Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed using Statistica 13.3. software (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA). The two-way analysis of variance (ANOVA) and LSD significance test were used with a significance level of  $\alpha = 0.05$ . The Tukey test was used for statistical testing of the research results.

## 4. Conclusions

Based on this study, differences in fruit morphology and chemical composition were found between *L. kamtschatica* and *L. emphyllocalyx*. Use of gaseous ozone significantly increases the chemical composition of the tested varieties. The acidity of *L. emphyllocalyx* clones was, on average, 6% higher than the tested *L. kamtschatica* varieties. The *L. emphyllocalyx* clone '21-17' had the highest average ascorbic acid content at 57.80 mg·100 g; the year of harvest significantly affected vitamin C levels, peaking at 53.92 mg·100 g in 2022. The total polyphenol content was also significantly influenced by the year of cultivation, with a 54.8% increase on average in 2022 compared to other years. The total antioxidant value, which was measured using the FRAP, DPPH, and ABTS methods, varied depending on the variety; ozone exposure significantly boosted antioxidant levels in all cases. On the basis of the study, there is significant improvement in the chemical composition of berries after exposure to gaseous ozone. The usage of ozone exposure was influential on the content of health-promoting compounds. The *L. emphyllocalyx* fruit differs significantly from its botanical variety, which may be useful in food processing. Further research on this botanical variety is required.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.B. and J.G.; methodology, O.B. and J.G.; validation, O.B. and J.G.; formal analysis, O.B.; investigation, O.B.; data curation, O.B.; writing—original draft preparation, O.B.; writing—review and editing, O.B. and J.G.; visualization, O.B.; supervision, J.G.; project administration, O.B. and J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Senica, M.; Stampar, F.; Mikulic-Petkovsek, M. Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subs. *edulis*) berry; a rich source of some nutrients and their differences among four different cultivars. *Sci. Hortic.* **2018**, *238*, 215–221. [[CrossRef](#)]
2. Bieniek, A.A.; Grygorieva, O.; Bielska, N. Biological Properties of Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.): A Review: The nutrition, health properties of honeysuckle. *Agrobiodiversity Improv. Nutr. Health Life Qual.* **2021**, *5*, 11–30. [[CrossRef](#)]
3. Kucharska, A.Z.; Sokół-Łętowska, A.; Oszmiański, J.; Piórecki, N.; Fecka, I. Iridoids, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.). *Molecules* **2017**, *22*, 405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yamamoto, Y.; Hoshino, Y.; Masago, H.; Kawano, T. Attempt for postharvest ripening of immature fruits of Haskap (*Lonicera caerulea* L. var. *emphylloclalyx* Nakai), an emerging fruit in Northern Japan. *Adv. Hortic. Sci* **2014**, *28*, 244–249.
5. Rupasinghe, H.P.V.; Arumuggam, N.; Amararathna, M.; De Silva, A.B.K.H. The potential health benefits of haskap (*Lonicera caerulea* L.): Role of cyanidin-3-O-glucoside. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 24–39. [[CrossRef](#)]
6. Caprioli, G.; Iannarelli, R.; Innocenti, M.; Bellumori, M.; Fiorini, D.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Buccioni, M.; Santinelli, C.; Bramucci, M.; et al. Blue honeysuckle fruit (*Lonicera caerulea* L.) from eastern Russia: Phenolic composition, nutritional value and biological activities of its polar extracts. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1892–1903. [[CrossRef](#)]
7. Rupasinghe, H.P.V.; Yu, L.J.; Bhullar, K.S.; Bors, B. Haskap (*Lonicera caerulea*): A new berry crop with high antioxidant capacity. *Can. J. Plant Sci.* **2012**, *92*, 1311–1317. [[CrossRef](#)]
8. Gorzelany, J.; Basara, O.; Kapusta, I.; Paweł, K.; Belcar, J. Evaluation of the Chemical Composition of Selected Varieties of *L. caerulea* var. *kamtschatica* and *L. caerulea* var. *emphylloclalyx*. *Molecules* **2023**, *28*, 2525.
9. Senica, M.; Stampar, F.; Mikulic-Petkovsek, M. Different extraction processes affect the metabolites in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subsp. *edulis*) food products. *Turk. J. Agric. For.* **2019**, *43*, 576–585.
10. Miller, F.A.; Silva, C.L.; Brandao, T.R. A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Eng. Rev.* **2013**, *5*, 77–106. [[CrossRef](#)]
11. Piechowiak, T.; Grzelak-Błaszczak, K.; Sójka, M.; Balawejder, M. One-time ozone treatment improves the postharvest quality and antioxidant activity of *Actinidia arguta* fruit. *Phytochemistry* **2022**, *203*, 113393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fan, X. Gaseous ozone to preserve quality and enhance microbial safety of fresh produce: Recent developments and research needs. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 4993–5014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zapałowska, A.; Matłok, N.; Zardzewiały, M.; Piechowiak, T.; Balawejder, M. Effect of Ozone Treatment on the Quality of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Plants* **2021**, *10*, 847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Piechowiak, T.; Antos, P.; Kosowski, P.; Skrobacz, K.; Józefczyk, R.; Balawejder, M. Impact of ozonation process on the microbiological and antioxidant status of raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit during storage at room temperature. *Agric. Food Sci.* **2019**, *28*, 35–44. [[CrossRef](#)]
15. Kaur, K.; Pandiselvam, R.; Kothakota, A.; Ishwarya, S.P.; Zalpouri, R.; Mahanti, N.K. Impact of ozone treatment on food polyphenols—A comprehensive review. *Food Control* **2022**, *142*, 109207. [[CrossRef](#)]
16. Rupasinghe, H.P.V.; Boehm, M.A.; Sekhon-Loodu, S.; Parmar, I.; Bors, B.; Jamieson, A.R. Anti-inflammatory activity of haskap cultivars is polyphenols-dependent. *Biomolecules* **2015**, *5*, 1079–1098. [[CrossRef](#)]
17. Molina, A.K.; Vega, E.N.; Pereira, C.; Dias, M.I.; Heleno, S.A.; Rodrigues, P.; Fernandes, I.P.; Barreiro, M.F.; Kostić, M.; Soković, M.; et al. Promising Antioxidant and Antimicrobial Food Colourants from *Lonicera caerulea* L. var. *Kamtschatica*. *Antioxidants* **2019**, *8*, 394. [[CrossRef](#)]
18. Gerbrandt, E.M.; Bors, R.H.; Meyer, D.; Wilen, R.; Chibbar, R.N. Fruit quality of Japanese, Kuril and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) germplasm compared to blueberry, raspberry and strawberry. *Euphytica* **2020**, *216*, 1–17. [[CrossRef](#)]
19. MacKenzie, J.O.; Elford, E.M.; Subramanian, J.; Brandt, R.W.; Stone, K.E.; Sullivan, J.A. Performance of five haskap (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and the effect of hexanal on postharvest quality. *Can. J. Plant Sci.* **2018**, *98*, 432–443. [[CrossRef](#)]
20. Cheng, K.; Bangzhu, P.; Fang, Y. Volatile composition of eight blueberry cultivars and their relationship with sensory attributes. *Flavour Fragr. J.* **2020**, *35*, 443–453. [[CrossRef](#)]
21. de Ancos, B.; Gonzalez, E.; Cano, M. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Z. Für. Leb. Und-Forsch. A* **1999**, *208*, 33–38. [[CrossRef](#)]
22. Temocico, G.; Sturzeanu, M.; Ion, V.; Cristea, S. Evaluation of strawberry fruit quality for new selections and cultivars. *Rom. Biotechnol. Lett.* **2019**, *24*, 742–748. [[CrossRef](#)]
23. Akhtar, I.; Rab, A. Effect of the fruit ripening stages on strawberry (*Fragaria x ananasa* Duch) fruit quality for fresh consumption. *J. Agric. Res.* **2015**, *53*, 413–424.
24. Horvitz, S. Postharvest handling of berries. *Postharvest Handl.* **2017**, *6*, 107–123.
25. Gorzelany, J.; Belcar, J.; Kuźniar, P.; Niedbała, G.; Pentoś, K. Modelling of Mechanical Properties of Fresh and Stored Fruit of Large Cranberry Using Multiple Linear Regression and Machine Learning. *Agriculture* **2022**, *12*, 200. [[CrossRef](#)]
26. Kuźniar, P.; Belcar, J.; Zardzewiały, M.; Basara, O.; Gorzelany, J. Effect of Ozonation on the Mechanical, Chemical, and Microbiological Properties of Organically Grown Red Currant (*Ribes rubrum* L.) Fruit. *Molecules* **2022**, *27*, 8231. [[CrossRef](#)]
27. Du, J.; Cullen, J.J.; Buettner, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1826*, 443–457. [[CrossRef](#)]
28. Njus, D.; Kelley, P.M.; Tu, Y.J.; Schlegel, H.B. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *159*, 37–43. [[CrossRef](#)]

29. Ochmian, I.; Grajkowski, J.; Skupień, K. Field performance, fruit chemical composition and firmness under cold storage and simulated “shelf-life” conditions of three blue honeysuckle cultigens (*Lonicera caerulea*). *J. Fruit Ornament. Plant Res.* **2008**, *16*, 83–91.
30. Česonienė, L.; Labokas, J.; Jasutienė, I.; Šarkinas, A.; Kaškonienė, V.; Kaškonas, P.; Kazernavičiūtė, R.; Pažereckaitė, A.; Daubaras, R. Bioactive compounds, antioxidant, and antibacterial properties of *Lonicera caerulea* berries: Evaluation of 11 cultivars. *Plants* **2021**, *10*, 624. [[CrossRef](#)]
31. Jabłońska-Ryś, E.; Zalewska-Korona, M.; Kalbarczyk, J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* **2009**, *2*, 115–120.
32. Turmanidze, T.; Gulua, L.; Jgenti, M.; Wicker, L. Potential antioxidant retention and quality maintenance in raspberries and strawberries treated with calcium chloride and stored under refrigeration. *Braz. J. Food Technol.* **2017**, *20*, 2016089. [[CrossRef](#)]
33. Turmanidze, T.; Jgenti, M.; Gulua, L.; Shaiashvili, V. Effect of ascorbic acid treatment on some quality parameters of frozen strawberry and raspberry fruits. *Ann. Agrar. Sci.* **2017**, *15*, 370–374. [[CrossRef](#)]
34. Svarcova, I.; Heinrich, J.; Valentova, K. Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea*. *Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc* **2007**, *151*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zdarilová, A.; Svobodová, A.R.; Chytilová, K.; Simánek, V.; Ulrichová, J. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1555–1561. [[CrossRef](#)]
36. Pažereckaitė, A.; Jasutienė, I.; Šarkinas, A.; Česonienė, L. Antimicrobial Activity and Composition of Different Cultivars of Honeysuckle Berry *Lonicera caerulea* L. *Biol. Life Sci. Forum.* **2021**, *4*, 71.
37. Khattab, R.; Brooks, M.S.-L.; Ghanem, A. Phenolic analyses of haskap berries (*Lonicera caerulea* L.): Spectrophotometry versus high performance liquid chromatography. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 1708–1725. [[CrossRef](#)]
38. Ochmian, I.D.; Skupien, K.; Grajkowski, J.; Smolik, M.; Ostrowska, K. Chemical composition and physical characteristics of fruits of two cultivars of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in relation to their degree of maturity and harvest date. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2012**, *40*, 155–162. [[CrossRef](#)]
39. Lee, Y.S.; Cho, I.J.; Kim, J.W.; Lee, S.K.; Ku, S.K.; Lee, H.J. Evaluation of in vitro anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean and Chinese *Lonicera caerulea*. *Nutr. Res. Pract.* **2018**, *12*, 486–493.
40. Oszmiański, J.; Wojdyło, A.; Lachowicz, S. Effect of dried powder preparation process on polyphenolic content and antioxidant activity of blue honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica*). *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *67*, 214–222.
41. Auzanneau, N.; Weber, P.; Kosińska-Cagnazzo, A.; Andlauer, W. Bioactive compounds and antioxidant capacity of *Lonicera caerulea* berries: Comparison of seven cultivars over three harvesting years. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *66*, 81–89. [[CrossRef](#)]
42. PN-EN 12147:2000; Fruit and Vegetable Juices—Determination of Titrable Acidity. Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2000.
43. PN-A-04019:1998; Food Products—Determination of Vitamin C Content. Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1998.
44. Bakowska-Barczak, A.M.; Marianchuk, M.; Kolodziejczak, P. Survey of bioactive components in Western Canadian berries. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *85*, 1139–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jurčaga, L.; Bobko, M.; Kolesárová, A.; Bobková, A.; Demianová, A.; Haščík, P.; Belej, L.; Mendelová, A.; Bučko, O.; Kročko, M.; et al. Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and Kamchatka Honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *Kamtschatica*) Extract Effect on Technological Properties, Sensory Quality, and Lipid Oxidation of Raw-Cooked Meat Product (Frankfurters). *Foods* **2021**, *10*, 2957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gawronski, J.; Hortynski, J.; Kaczmarek, E.; Dyduch-Sieminska, M.; Marecki, W.; Witorozec, A. Evaluation of phenotypic and genotypic diversity of some Polish and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and clones. *Acta Sci. Polonorum. Hortorum Cultus.* **2014**, *13*, 157–169.
47. Commission International de Eclairage (1971) to 1-1; CIE Publication No 15 (E-1.3.1); CIE: Paris, France, 1976.

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## INVESTIGATING THE EFFECT OF OZONATION ON MECHANICAL PARAMETERS OF *LONICERA CAERULEA* L. FRUITS USING MACHINE LEARNING

Oskar Basara<sup>a\*</sup>, Katarzyna Pentos<sup>b</sup>, Józef Gorzelany<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food and Agriculture Production Engineering, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza Street, 35-601 Rzeszów, Poland, e-mail: oskarb@dokt.ur.edu.pl, ORCID 0000-0001-7672-5209; e-mail: jgorzelany@ur.edu.pl, ORCID 0000-0002-1028-097X

<sup>b</sup> Institute of Agricultural Engineering, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 37b Chelmonskiego Street, 51-630 Wrocław, Poland, e-mail: katarzyna.pentos@upwr.edu.pl, ORCID 0000-0002-0666-1948

Corresponding author: e-mail: oskarb@dokt.ur.edu.pl

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received: February 2025

Received in the revised form: March 2025

Accepted: April 2025

#### Keywords:

*Lonicera caerulea* L.;  
morphological properties;  
mechanical properties;  
gas exchange;  
machine learning

### ABSTRACT

*Lonicera caerulea* L. - well - known in Poland as Kamchatka berry, has been gaining increasing popularity in recent years. The tests carried out on newly established Japanese haskap clones aimed at demonstrating the suitability of the fruits for mechanical harvesting and storage. This study focused on evaluation of mechanical properties and assessment of three distinct machine learning techniques to create predictive models that elucidate the connection between key mechanical attributes of the fruit and storage conditions of *L. caerulea*. The average force needed to puncture the fruits skin and flesh of *L. caerulea* var. *emphylocalyx* varieties is 16.91% higher than that required for the tested *L. caerulea* var. *kamtschatica* varieties. *L. caerulea* var. *emphylocalyx* fruits exhibited a significantly higher respiration rate, with C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> levels during storage being 25.5% and 10.5% higher, respectively, compared to *L. caerulea* var. *kamtschatica* varieties. The machine learning algorithms tested yielded accurate models for deformation and energy prediction. The mean absolute percentage error (MAPE) of these models was determined to be between 14.87 and 20.65%. Models with significantly lower accuracy were obtained for force prediction, with the MAPE reaching 28.95% for *L. var. kamtschatica* fruit and 42.33% for *L. emphylocalyx* fruit. The cultivation and improvement of *Lonicera caerulea* L. varieties is of great importance for the advancement of mechanized harvesting methods and the development of improved storage technologies for this species. The creation of machine learning methods will facilitate the development of predictive models that can serve as a predictive tool for the relationship between selected mechanical properties

## Introduction

Originating from cold lands of central Asia and Far East, *Lonicera caerulea* L. belongs to the 200 species of Caprifoliaceae family. Most species in this family are ornamental, with only approximately 17 fruit-bearing plants classified as edible (Senica et al., 2018). *Lonicera caerulea* L. includes several botanical varieties originating from different regions, which may differ in terms of chemical composition or mechanical properties of the fruit. There are varieties which come from Russia such as *L. caerulea* var. *kamtschatica*, commonly known in Poland as 'Kamchatka berry', *L. caerulea* var. *altaica*, *L. caerulea* var. *edulis*, and *L. caerulea* var. *boczkarikovae*, and, *L. caerulea* var. *emphylocalyx* originating in Japanese island of Hokkaido which is known in Poland as Japanese haskap (Kula and Krauze-Baranowska, 2016). These varieties are adapted to their climates and represent some of the primary types of *Lonicera caerulea* L. grown for their edible fruits. Additionally, it is cultivated in Poland, Romania, and Estonia. Research is ongoing to explain its biological properties. Blue honeysuckle berries, highly valued in the processing industry for their flavor and rich content of bioactive compounds like anthocyanins, phenolic acids, and vitamin C, are a popular fruit for desserts (Becker and Szakiel, 2019; Gawroński et al., 2014). The cultivation and storage possibilities of *Lonicera caerulea* L. face several challenges due to various influencing factors. Depending on the variety, fruits have a short ripening period, are difficult to detach from the plant during ripening, and their ripening is uneven, which may significantly affect the efficiency and profitability of production (Leisso et al., 2021a; Ren et al., 2023). A key to maintain the quality of blue honeysuckle fruit for consumers is harvesting the berries at the optimal stage of ripeness while avoiding any mechanical damage during the process. *Lonicera caerulea* L. fruit is typically harvested by hand, though mechanical methods can also be used (Yu et al., 2023). Farmers often modify equipment designed for harvesting other soft fruits to handle blue honeysuckle berries. However, these adaptations can result in mechanical damage due to low resistance of berries, which makes them more susceptible to bruising and other forms of physical harm during the harvesting process. This challenge highlights the need to apply specialized machinery, techniques or software to minimize damage and maintain fruit quality. Damage to the fruit increases ethylene production, which subsequently speeds up the aging process and reduces the firmness of the berries, thereby reducing the storage capacity of the fruit (Martinez et al., 2007; Dziejczak et al., 2020; Gorzelany et al., 2022).

Ozone (O<sub>3</sub>) is a powerful oxidizing agent used to disinfect plant materials, thereby extending their freshness. O<sub>3</sub> can be used in either in gaseous or aqueous form, with research showing that the gaseous ozone has better effect on fruit (Zapałowska et al., 2021). Ozonation is a non-thermal food preservation method that improves food safety without compromising quality or causing environmental pollution, and it is particularly favored by the fruit and vegetable industry because it decomposes rapidly into oxygen, leaving no residue. Although O<sub>3</sub> can react with certain organic compounds in food, potentially producing byproducts such as aldehydes, ketones, and carboxylic acids, it remains highly valued for its disinfectant and biocidal properties (Contigiani et al., 2018; Lv et al., 2019). Using a correct dose of ozone can greatly enhance the storage potential of fruit.

The optimisation of storage of agricultural products is significant, given the necessity to minimise food waste. Modern data analysis methods, including machine learning, can be instrumental in achieving effective optimisation. The development of accurate models of the

dependence of selected mechanical features of biological materials on storage-related parameters is essential for optimal planning of postharvest operations. Modern artificial intelligence methods are increasingly being used in this area, as evidenced by the growing number of publications reporting on the use of machine learning for agriculture, including in the food processing industry (Niedbała et al., 2022; Clay et al., 2024). One of the key challenges in the application of machine learning techniques is the selection of an appropriate algorithm for the data to be modelled, followed by optimization of the algorithm's hyperparameters. Some publications deal with the prediction of the parameters of fruit and vegetables important in storage process. Saeidirad et al. (2013) employed an artificial neural network (ANN) to predict the stress relaxation of three cultivars of pomegranate based on relaxation time. They also compared the accuracy of the ANN model with that of the Maxwell model and found that both models have the capacity to produce accurate and reliable predictions for stress. The prediction of apple hardness was conducted by Pan et al. (2015), who developed an ANN model with high accuracy using mechanical properties index test results as input parameters. The machine learning models were developed by Ropelewska (2022) for the purpose of analysis of mechanical properties of red currant fruit under a variety of storage conditions. Support vector machines (SVM) have been demonstrated to be a valuable tool for estimating the texture profile and puncture parameters of blueberries (Hu et al., 2016), the mechanical characteristics of apples (Peipei et al., 2022) and the firmness of kiwifruit (Mohsen et al., 2024).

The aim of this study is to compare the mechanical properties of 3 varieties of *L. var. kamschatica* and 3 varieties of *L. var. emphylocalyx* and the potential application of *L. emphylocalyx* fruit and ozone fumigation in food processing. The fruits of *Lonicera caerulea* L., known for their rich chemical composition, are also known for their limited storage capacity. The O<sub>3</sub> and its use can significantly extend storage time by affecting the mechanical properties of fruit and the number of gases released. Furthermore, three machine learning methods were evaluated in the context of developing predictive models of the relationship between selected mechanical parameters of fruit and storage conditions.

## Materials and Methods

### Material

The study was conducted between 2022 and 2024 on fruits obtained from a nursery crop located in Tyczyn (49° 57' 52'' N 22° 2' 47'' E, Subcarpathian Voivodship, Poland) The study involved *Lonicera caerulea* var. *kamschatica*, hereinafter referred to as LK, varieties 'Vostorg', 'Jugana', 'Aurora', as well as newly created clones 'Lori', '21-17' and '139-24' of *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*, hereinafter referred to as LE (Fig. 1).

The berries were hand-harvested at full maturity, with 1000 g collected from each variety, and the optimal harvest date was determined by the color and drop of the fruit. The harvest date and meteorological conditions prevailing in each experimental year have been previously published (Basara et al., 2024). Both species were grown in pots containing a peat substrate comprising perlite and sand (20:1:1). In 2022, Osmocote Exact 3-4 m (ICL, Sydney, Australia) fertilizer was added at the concentration of 2.0 kg·m<sup>-3</sup> of substrate. In 2023-2024,

Kristalon Blue (Yara, Oslo, Norway) in concentration of  $0.4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  was periodically used to fertilize plants.



Figure 1. The botanical varieties of *Lonicera caerulea* L. used in this study: (A) *L. var. kamtschatica* (LK) and (B) *L. var. emphyllocalyx* (LE).

#### Ozone Treatment of Berries

Before measuring mechanical properties, LK and LE fruits were subjected to the ozonation process. The fruits were randomly divided into four batches, each containing 50 berries. Measurements were taken on the 1st, 3rd, and 5th day of storage each year after the ozonation treatment, where gaseous ozone was applied at the concentration of 5 ppm for durations of 1, 3, and 5 minutes, with a flow rate of  $40 \text{ g O}_3\cdot\text{h}^{-1}$  at  $20^\circ\text{C}$ . Ozone was generated using a KORONA A 40 Standard (Korona, Piotrków Trybunalski, Poland) along with a 106 M UV Ozone Solution detector (Ozone Solution, Hull, MA, USA). During each year of the study, the ozonation treatment was consistently applied at the stage when the fruits reached harvest ripeness.

#### Determination of Morphological Characteristic

The sample size consisted of 10 fruits for each variant. The length and width of individual fruits were measured with an accuracy of 0.01 mm, while mass was measured with an accuracy of 0.001 g. The density ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) of each fruit was calculated as the ratio of its weight to the volume of a sphere with diameter  $d$  (Gorzelany et al., 2022).

#### Water content measurement

Water content in fresh *Lonicera caerulea* berries and those kept in cold storage was determined using the dryer method ( $105^\circ\text{C}$ ), following PN-90/A-75101-03:1990. Ten randomly selected berries were placed in a laboratory moisture analyzer (Radwag, Polska), with measurements performed in three replications.

#### Determination of the Mechanical Properties

The selected mechanical properties of the LK and LE fruits were measured in the compression test using Brookfield CT3-1000 texture analyser (AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, USA), with software assistance - TexturePro CT. Each sample was punctured

using 2 mm diameter steel plunger. The compression velocity was  $0.2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  and initial tension force of the measurement was 0.05 N. The plunger penetration depth after puncture was 1 mm. To determine the mechanical resistance of skin and flesh, peak destructive force (N), degree of deformation and destructive energy (mJ) were recorded after each measurement. Each measurement was performed in ten replications.

### **Statistical Analysis**

The Statistica 13.3 program (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA) was used to perform a statistical evaluation of the results, including analysis of variance (ANOVA) and the significance of the LSD test at a significance level of  $\alpha = 0.05$ .

### **Machine learning methods**

Three machine learning methods were employed to model the relationship between the mechanical parameters of LK and LE berries and storage conditions. These were two types of artificial neural networks, namely the Multilayer Perceptron (MLP) and Radial Basis Function (RBF) and Support Vector Machines (SVM). Neural networks are a tool that has been modelled on the operation of the biological nervous system. The fundamental unit of ANN is the artificial neuron, which calculates the weighted sum of the input signals and then transforms this value using an activation function. ANNs are composed of a layered structure of artificial neurons. ANNs do not require programming; instead, they are trained using a training set. After training, the model is tested on a separate dataset to assess its ability to generalise the information contained in the training set. Prior to training the neural models, it is essential to define their structure, specifically the number of neurons in the hidden layer. The concept of SVM is founded upon the notion of support vectors, which are defined as points within the data set that serve to determine the solution. In the context of a classification problem, the solution is represented by a hyperplane that separates groups of data. In the case of a regression problem, the solution is expressed as a function. Support vectors exert a profound influence on the positioning of the hyperplane or regression function. In this study, an epsilon-insensitive support vector machine ( $\epsilon$ -SVM) regression was employed. The objective of the algorithm is to identify a function, that deviates from the targets by a value no greater than  $\epsilon$  for each point in the training data set. The Gaussian radial basis function (RBF) kernel function was used due to its capacity to effectively model non-linear relationships in the data.

In this study, two distinct models were constructed from datasets pertaining to LK and LE berries, comprising 1081 and 1079 data vectors, respectively (after removal of outliers). The independent variables were: variety, year of harvest, storage time, and time of gaseous ozonation. Separate models were generated for each mechanical parameter, namely force, deformation, and energy. The machine learning environment was the Statistica v. 13 software (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA). For ANNs the dataset was randomly divided into three subsets: training, validation, and test. The ratio of the three subsets was 70:15:15, respectively. For SVM the dataset was randomly divided into a training set and a test set in a ratio of 75:25. An MLP network with a single hidden layer was employed. The number of neurons in the hidden layer of the MLP and RBF networks was varied from 10 to 50. The MLP network employed linear, sigmoid, hyperbolic tangent, or exponential neuron activation functions. A total of 20,000 distinct neural network configurations were evaluated for each

model. These configurations exhibited variability in structure, activation functions, and initial synaptic weight values, which were randomly generated. The testing was conducted using an automated neural network generator within the Statistica environment. The SVM hyperparameters, namely  $C$  (inverse regularisation parameter),  $\varepsilon$  and  $\gamma$  (the width of the RBF kernel), were adjusted by grid search. The ten-fold cross-validation method was used. The accuracy of the models was evaluated using the following metrics:

The root-mean-square error (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_p - Y_t)^2} \quad (1)$$

The mean absolute percentage error (MAPE):

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{Y_t - Y_p}{Y_t} \right| \quad (2)$$

In addition, the generalization ability (GA) was calculated using the following formula:

$$GA = \frac{RMSE_{test}}{RMSE_{train}} \quad (3)$$

where:

- $Y_p$  – is the absolute value predicted by the model,
- $\bar{Y}_p$  – is the mean value predicted by the model,
- $Y_t$  – is the absolute target value,
- $\bar{Y}_t$  – is the mean target value,
- $n$  – is the number of vectors in a data set.

In the recent study, El Bilali et al. (2022) proposed a novel classification system for predictive models based on the GA metric. According to this system, models with a GA value within the range of 0.75–1 or 1–1.35 are considered to exhibit excellent performance.

The ANN models enable the implementation of sensitivity analysis, which in turn allows for determination of the extent to which individual model input parameters exert influence on the output parameter. Many sensitivity analysis methods have been proposed in the literature, including the partial derivatives method and the weights method. In this research, the sensitivity analysis algorithm implemented in Statistica v. 13.3 software was utilised. In this method, a specific independent variable is replaced by its mean value calculated for the training data set. The impact of this variable is assessed by the model error in two cases: with the original value of the variable and after it has been replaced by the mean value.

## Results and Discussion

### Changes in the morphological properties of *Lonicera caerulea* berries

Extended cooling and storage of vegetables and fruits at low temperatures can negatively affect their water content. These conditions may lead to increased transpiration, resulting in greater water loss and a faster decline in turgor during storage (Lufu et al., 2020; Geasa 2022). Refrigeration of *Lonicera caerulea* L. may affect not only the morphological properties of berries but also the moisture content of the fruits, thereby reducing their biological value and

decreasing the value of the raw material., The examined fruits of *Lonicera caerulea* L. varieties from different years of cultivation, subjected to ozonation, differed significantly depending on the day of fruit storage (Tab. 1).

Table 1.

*The morphological characteristics and water content of LK and LE are influenced by factors such as variety, harvest year, storage duration, and ozone exposure time*

Variable	Length (mm)	Width (mm)	Mass (g)	Density (g·cm <sup>-3</sup> )	Sphericity coefficient (%)	Moisture content (%)	
<i>L. caerulea</i> var. <i>kamtschatica</i>							
Variety	Vostorg	19.49c±2.80	9.57a±1.58	1.46a±0.49	0.66b±0.14	62.50a±7.02	87.49d±2.18
	Jugana	16.82a±1.99	10.32bc±1.60	1.52b±0.45	0.63a±0.11	72.41c±8.08	86.54c±3.02
	Aurora	20.29c±2.67	10.46c±1.68	1.68de±0.54	0.71d±0.15	64.53b±7.34	78.65b±4.96
<i>L. caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i>							
Variety	Lori	17.24b±2.11	11.16d±1.59	1.71e±0.48	0.67bc±0.12	75.06d±7.66	77.91a±3.83
	21-17	20.63d±2.73	10.25b±1.56	1.63c±0.48	0.72d±0.16	62.91a±6.15	87.95d±2.66
	139-24	17.59b±2.15	10.98d±1.54	1.65cd±0.43	0.69c±0.13	73.21c±6.53	88.78e±3.15
SL		***	***	***	***	***	***
Year of harvest	2022	18.44a±2.99	10.99b±1.56	1.69ab±0.48	0.71b±0.15	71.47c±8.79	84.77a±5.69
	2023	18.84b±2.79	9.57a±1.50	1.45a±0.44	0.64a±0.14	64.09a±7.64	84.63a±5.65
	2024	18.78b±2.80	10.81b±1.60	1.69ab±0.51	0.70b±0.14	69.75b±8.36	84.92a±5.31
SL		*	*	*	*	**	ns
Storage time (days)	1	18.84b±3.00	10.46a±1.66	1.64b±0.49	1.12a±0.41	68.17a±9.19	83.84a±5.61
	3	18.63a±2.86	10.47a±1.55	1.60a±0.45	1.10a±0.39	68.70a±8.83	85.25b±5.37
	5	18.57a±2.72	10.45a±1.81	1.59a±0.51	1.11a±0.46	68.46a±8.53	84.24b±5.54
SL		*	ns	*	ns	ns	*
Time of gaseous ozonation (min)	0	18.58b±2.86	10.52b±1.82	1.13b±0.48	0.69a±0.15	68.72b±8.16	83.40a±5.87
	1	19.10c±3.14	10.44ab±1.63	1.13b±0.42	0.69a±0.14	67.55a±9.34	86.59d±5.11
	3	18.76b±2.77	10.55b±1.56	1.13b±0.39	0.68a±0.15	68.67b±8.78	84.15b±1.33
5	18.28a±2.62	10.33a±1.67	1.06a±0.40	0.68a±0.14	68.82b±9.05	84.97c±9.55	
SL		***	*	*	ns	*	**

All analyzed data are expressed as mean values (n = 3) with different letters as significantly different (p < 0.05) ± SD; SD: standard deviation. SL- level of significance: ns - not significant, \*\*\*: p < 0.001, \*\*: p < 0.01, \*: p < 0.05

The fruit dimensions - length of 18.7–23.7 mm and width of 8.7–12.3 mm are comparable to those obtained in the study of Ochmian et al. (2012), in which the fruit *L. kamtschatica*, depended on cultivar and harvest time, . In the study of Česonienė et al. (2021), fruits of different *Lonicera caerulea* L. varieties had dimensions ranging from 8.3 to 10.8 mm in width and 13.1–26.3 mm. The fruit weight was found to be comparable to the results obtained in the study conducted by Božek (2012), where the fruit weight was within the range of 0.31–1.42 g, depending on the variety, year of harvest and pollination type. The water content was comparable to the findings of the study conducted by Auzanneau (2018), where it was in the range of 76%–85%, depending on the variety and year of cultivation. In our study, in the LK and LE cultivars, the differences between the berries were characterized at the significance level of - \*\*\* (p < 0.001), for all tested variables. The fruits of LE were found to be significantly shorter and of greater width and mass than those of the tested LK varieties. In comparison to the other tested varieties, the fruits of clone '21-17' were observed to be significantly longer, measuring 20.63 mm on average. Additionally, among the tested

varieties, clone 21 was found to have a significantly higher density, at  $0.72 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . The 'Lori' variety exhibited significantly wider and heavier fruits, with mean diameters of 11.16 mm and 1.71 g, respectively. These berries were distinguished by a markedly higher sphericity coefficient, reaching 75.06%. The highest average moisture content was found in the fruits of clone '139-24' – 88.78%. Depending on the harvest year, the differences between the berries were characterized at the significance level of - \* ( $p < 0.05$ ), except for sphericity - \*\* ( $p < 0.01$ ) and moisture content – ns (not significant). Compared to the other years of cultivation, in 2023, the fruits of the tested *L. caerulea* varieties were characterized by a significantly smaller width – 9.57 mm, weight – 1.45, density – 0.64, sphericity – 64.09% and moisture content – 84.63%. The differences between the berries were characterized at the significance level of - \* ( $p < 0.05$ ) depending on the duration of storage. In the case of length, mass and moisture content, the rest of the variables were characterized at the significance level of – ns (not significant). The fruits stored for five days exhibited a significantly reduced length (18.57 mm) and weight (1.59 g) in comparison to the fruits stored for one day. Additionally, the moisture content of the five-day stored fruits was significantly higher (84.24%) than that of the one-day stored fruits. The extent of the differences between the berries varies depending on the length of ozonation time, except for density, where no significant differences were observed. Among the factors studied and the influence of ozonation, the most important is the influence on the moisture content of the fruit. The higher average moisture content in fruits of LE varieties contributes to their increased firmness which reduces the mechanical damage during handling and transportation. Greater firmness enhances the fruit's structural integrity, making it more resistant to deformation and bruising under pressure (Satitmunnaithum et al., 2022). The lower sphericity coefficient observed in LK fruit varieties could have a notable influence on their storage properties. Increased adhesion elevates the risk of mechanical damage, due to the compression forces during the storage or transit (Aliasgarian et al., 2015; Elibox et al., 2017). An important factor that may determine the storage process may be the geometrical features of the fruit. Fruits with a higher sphericity coefficient often have a smaller surface-area-to-volume ratio in certain orientations, which can create uneven airflow during cooling or storage, leading to hotspots where decay is more likely (Ngcobo et al., 2012). This highlights the importance of considering both firmness and shape when evaluating fruit varieties for their mechanical properties, post-harvest handling and storage characteristics.

#### **Changes in the mechanical properties of *Lonicera caerulea* berries**

Extended periods of low temperature storage lead to water loss of fruits, which may change mechanical properties, thereby increasing risk of mechanical damage. Due to long refrigeration, biological value of *Lonicera caerulea* L. berries may change (Duarte-Molina et al., 2016, Moggia et al., 2017). The fruits of the two tested botanical varieties of *Lonicera caerulea* L. differ depending on the variety, year of production, storage time and ozonation treatment (Tab. 2).

Table 2.  
*Mechanical features and apparent modulus of elasticity of L. kamschatica and L. emphyllocalyx depending on the variety, year of harvest, duration of storage and ozone exposure time*

Variable		Force (N)	Deformation (mm)	Energy (mJ)
<i>L. caerulea</i> var. <i>kamschatica</i>				
Variety	Vostorg	0.70b±0.23	3.86c±0.92	1.88ab±0.24
	Jugana	0.54a±0.15	3.71b±0.84	1.84a±0.24
	Aurora	1.02d±1.45	3.68b±0.77	2.39d±0.89
<i>L. caerulea</i> var. <i>emphyllocalyx</i>				
	Lori	0.93d±0.45	3.52a±0.65	2.22c±0.68
	21-17	1.02d±1.47	3.66b±0.79	2.43d±0.89
	139-24	0.77c±0.38	3.84c±0.80	1.95b±0.52
	SL	***	***	***
Year of harvest	2022	0.84b±0.43	3.46a±0.66	2.21b±0.77
	2023	0.83ab±0.38	4.17b±0.86	2.10a±0.64
	2024	0.81a±0.41	3.51a±0.68	2.06a±0.62
	SL	*	*	*
Storage time (days)	1	0.78a±0.38	3.74ab±0.79	2.08a±0.65
	3	0.87b±0.42	3.65a±0.77	2.14ab±0.68
	5	0.84b±0.44	3.77b±0.86	2.16b±0.73
	SL	*	*	*
Ozone exposure time (min)	0	0.82ab±0.36	3.68ab±0.80	2.07a±0.54
	1	0.84b±0.45	3.67a±0.74	2.17b±0.73
	3	0.85b±0.44	3.76b±0.83	2.20b±0.86
	5	0.79ab±0.38	3.73ab±0.85	2.07a±0.55
	SL	*	**	**

All analyzed data are expressed as mean values (n = 3) with different letters as significantly different (p < 0.05) ± SD; SD: standard deviation. SL- level of significance: ns - not significant, \*\*\*: p < 0.001, \*\*: p < 0.01, \*: p < 0.05

In the study conducted by Leisso et al. (2021b), the flesh firmness of *Lonicera caerulea* L. varieties, was tested using a 2 mm tip, with results ranging from 0.11 to 0.35 N. In the study by Zhu et al. (2022), the flesh firmness of two varieties of *Lonicera caerulea* L., ranged from 1.38 to 2.78 N. In our study, in the LK and LE cultivars, the differences between the berries of the LK and LE cultivars were characterized at the significance level of -\*\*\* (p<0.001) for all tested variables. The force required to puncture was ranging from 0.54 to 1.02 N depending on the botanical variety and cultivar. The mean force necessary to puncture the fruits of LE varieties is 16.91% greater than that required for the tested LK varieties. A similar relationship can be observed for Energy, LE varieties were characterized by an average higher energy requirement by 7.42%. LK fruits exhibited a markedly elevated incidence of fruit deformation, with an average degree of deformation that was 2.04% lower in LE fruits. The observed differences between the harvest year reached a level of statistical significance - \* (p<0.05), for all tested variables. In 2023, the fruit was characterized by significantly greater force – 0.84 N, and energy – 2.21 mJ, required for fruit deformation, compared to the rest of the years of the study. The highest degree of deformation was recorded in 2023, with an average increase of 16.5% in comparison to other years. In case of the storage time, differences were characterized at the significance level of - \* (p<0.05). The storage of the fruit for a period of five days resulted in a significantly greater force (0.84 N) and energy

(3.77 mJ) being required for puncture, as well as a greater degree of deformation (3.51 mm) in comparison to the storage of berries for the period of one day only. The differences between the ozone exposure time were characterized at the significance level of - \* ( $p < 0.05$ ), for Force (N), and level of - \*\* ( $p < 0.005$ ), for Deformation (mm) and Energy (mJ). Fruits subjected to the ozonation process were characterized by significantly higher values of the tested parameters. The application of ozonation for a period of three minutes was found to result in the greatest force (0.85 N) and energy (2.20 mJ) required for deformation. The shelf life and quality of fresh-cut products are significantly shortened by various decay processes initiated by physical damage, such as moisture loss (Tappi et al., 2017). The soft fruits of *Lonicera caerulea* L. poses a major limitation for adopting mechanical harvesting methods, as these fruits are highly susceptible to damage during handling. LE fruits demonstrate significantly greater resistance compared to LK varieties, making them more suitable for mechanical harvesting and storage. The development and use of LE varieties, with their enhanced firmness, could play a critical role in advancing mechanized harvesting technologies for this species. Increased water content contributes to the structural integrity of the fruit, making it less prone to damage due to compression or impact forces (Zhu et al., 2023). This mechanical resistance of LE varieties aligns well with the mechanical requirements of automated harvesting systems, where fruit durability is essential for minimizing losses and maintaining quality. As such, selecting and cultivating appropriate LE varieties could significantly enhance both the efficiency and economic viability of mechanized harvesting in *Lonicera caerulea* L. production. The observed difference in mechanical properties of berries is also influenced by exposure to ozone (Kuźniar et al., 2022). These findings indicate that the ozone treatment enhances the fruits resistance to deformation, making skin and flesh more durable during handling and storage. This could be connected to changes in cell wall composition or other physicochemical alterations induced by ozonation. Oxidative stress caused by ozone exposure could activate enzymatic processes that modify the mechanical properties of the cell walls (Miller et al., 2013). Enzymes like peroxidases or polyphenol oxidases might catalyze the formation of lignin-like compounds, further enhancing the cell wall (Ranieri et al., 2000). However, the use of gaseous ozone can pose some challenges due to its high cost of implementation and short-term effect. The use of gaseous ozone on such fruits can pose problems due to the aggressive reaction of ozone with cell walls, it requires the use of appropriate concentration for the conditions of cultivation and storage.

### Machine learning models

In the case of models based on neural networks, 2,000 independent models were generated for each output parameter. This was achieved by varying the number of neurons in the hidden layer, the neuron activation functions (in the case of MLP) and the values of the initial weights. In the case of SVM models, a ten-fold cross-validation method was used to adjust the values of hyperparameters. The details and error metrics for the best models are presented in Tables 3 and 4.

In the case of the dataset pertaining to the LK berries, the most optimal force prediction was achieved through utilisation of a MLP network comprising 48 neurons in the hidden layer. The model yielded a mean absolute percentage error (MAPE) of 28.95% for the test data set. The application of an RBF network and SVM algorithm yielded models with slightly

reduced accuracy. Regarding the deformation, the SVM algorithm generated the optimal model, with a MAPE error for the test data set of less than 15%. The most accurate energy prediction was achieved using an MLP network with 17 neurons in the hidden layer, with a MAPE error for the test data set of less than 15%. All models can be classified as excellent in terms of their generalisation ability.

Table 3.  
*Structures and error metrics of best MLP, RBF and SVM models for LK fruits*

Model	Model structure or hyperparameters	Train		Validation		Test		GA
		RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	
Force								
MLP	4-48-1	0.28	29.90	0.32	35.72	0.25	28.95	0.88
RBF	4-50-1	0.29	32.06	0.32	37.06	0.27	33.40	0.93
SVM	$C=4, \varepsilon=0.1, \gamma=0.25$	0.29	30.73	-	-	0.31	31.61	1.05
Deformation								
MLP	4-39-1	0.66	14.35	0.69	14.86	0.70	15.71	1.07
RBF	4-29-1	0.69	15.21	0.67	14.45	0.77	17.16	1.11
SVM	$C=8, \varepsilon=0.3, \gamma=0.25$	0.69	15.70	-	-	0.70	14.87	1.01
Energy								
MLP	4-17-1	0.50	15.24	0.57	15.77	0.54	14.88	1.07
RBF	4-40-1	0.60	17.47	0.64	17.39	0.65	18.18	1.08
SVM	$C=9, \varepsilon=0.2, \gamma=0.25$	0.54	16.87	-	-	0.55	17.12	1.02

The structure of MLP and RBF models means: the number of input nodes-the number of neurons in hidden layer-the number of neurons in output layer

The models generated from the dataset for the LE exhibited a lower error rate for deformation compared to the dataset for the berries LK. The optimal model was identified as an MLP network comprising 18 neurons in the hidden layer. The mean absolute percentage error (MAPE) for this model was 16.49% for the test data set. In terms of force prediction, the optimal model was identified as the SVM algorithm. However, the accuracy of this model is limited, as evidenced by a MAPE error exceeding 40% for the test data set. The most precise model for energy prediction was developed using an MLP network with 29 neurons in the hidden layer, exhibiting a MAPE error of 20.65%. Additionally, all generated models demonstrated excellent generalisation ability for this dataset.

A sensitivity analysis enables evaluation of the degree of influence exerted by explanatory variables on the dependent variables. In this study, a sensitivity analysis was conducted on MLP models. For LK fruits, the analysis was performed on all mechanical parameters. For LE fruits, however, the analysis was limited to deformation and energy, as the MLP model for force exhibited low accuracy (MAPE = 47.52), rendering the analysis results for this model unreliable. The results of the sensitivity analysis are presented in Figures 2 and 3.

Table 4. Structures and error metrics of best MLP, RBF and SVM models for LE fruits

Model	Model structure or hyperparameters	Train		Validation		Test		GA
		RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	
Force								
MLP	4-48-1	0.28	29.90	0.32	35.72	0.25	28.95	0.88
RBF	4-50-1	0.29	32.06	0.32	37.06	0.27	33.40	0.93
SVM	$C=4, \epsilon=0.1, \gamma=0.25$	0.29	30.73	-	-	0.31	31.61	1.05
Deformation								
MLP	4-39-1	0.66	14.35	0.69	14.86	0.70	15.71	1.07
RBF	4-29-1	0.69	15.21	0.67	14.45	0.77	17.16	1.11
SVM	$C=8, \epsilon=0.3, \gamma=0.25$	0.69	15.70	-	-	0.70	14.87	1.01
Energy								
MLP	4-17-1	0.50	15.24	0.57	15.77	0.54	14.88	1.07
RBF	4-40-1	0.60	17.47	0.64	17.39	0.65	18.18	1.08
SVM	$C=9, \epsilon=0.2, \gamma=0.25$	0.54	16.87	-	-	0.55	17.12	1.02

The structure of MLP and RBF models means: the number of input nodes-the number of neurons in the hidden layer-the number of neurons in the output layer

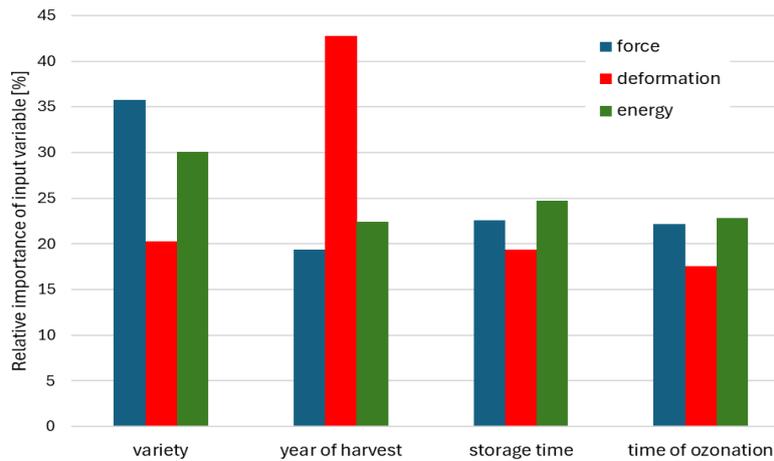


Figure 2. Relative importance of input variables of MLP model on mechanical parameters of LK fruits

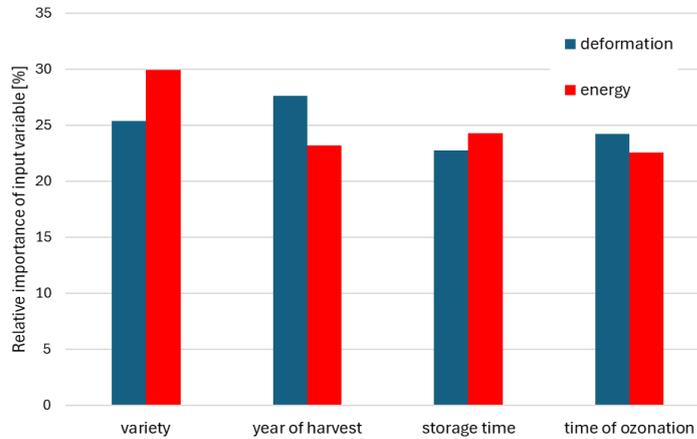


Figure 3. Relative importance of input variables of MLP model on mechanical parameters of LE fruits

In the case of LK fruit, the greatest influence on force and energy is attributed to the variety (35.8% and 30.1%, respectively). The other parameters comparably influence the mechanical parameters, with the maximum impact of 25%. Conversely, the year of harvest exerts the greatest influence on deformation (42.8%). The other parameters in the model affect deformation to a similar degree, with an impact of approximately 20%. For LE fruits, all the independent variables exert a comparable influence on deformation and energy (22-30%).

The application of machine learning is becoming increasingly important in the construction of predictive models that are useful in agriculture. A plethora of algorithms are available for the generation of these models. The optimal modelling method for a given data set is contingent upon the specific relationship between the input and output parameters of the model. Consequently, it is often necessary to employ a combination of methods and conduct a comparative analysis of the resulting data. The methods employed in this research, namely MLP and RBF neural networks and support vector machines, are among the most prevalent algorithms utilized for agricultural data. Hosseini Monjezi et al. (2023), developed RBF and SVM models for the purpose of predicting greenhouse indoor air temperature. The RBF method demonstrated superior accuracy compared to the SVM model, with a lower MAPE error of 1.3% for the test data set compared to 3.7% for the SVM. Bolandnazar et al. (2019) compared the performance of MLP, RBF and SVM models for the prediction of energy consumption in potato production. The RBF model demonstrated superior performance compared to the MLP and SVM models, with a MAPE error of less than 1% on the test data set. Nawaz and Babar (2024) employed the MLP, RBF and SVM methodologies to develop predictive models for the purpose of forecasting reference evapotranspiration to meet crop water requirements in the context of smart agriculture. The study demonstrated that MLP and SVM models exhibited superior predictive capabilities, whereas the RBF model demonstrated significantly lower accuracy. Son et al. (2022) conducted a comparative analysis of ANN and SVM models for rice crop yield prediction based on image composites from Sentinel-2. The findings revealed that the accuracy of SVM models was marginally higher than that of ANN models.

The application of machine learning methodologies is facilitating the development of models with the potential for real-world applications in the optimisation of fruit and vegetable storage procedures. Huang et al. (2023) conducted a comparative analysis of MLP, RBF and SVM models for the prediction of blueberry fruit freshness based on multi-sensing data. The SVM model demonstrated the highest level of efficiency, with the accuracy rate of 94.01%. Hu et al. (2016) employed least squares support vector machines (LS-SVM) to forecast texture profile analysis and puncture analysis parameters of blueberry fruit based on hyperspectral interactance spectra coupled with the Monte Carlo uninformative variable elimination. The SVM algorithm yielded models of high accuracy for most parameters under study, with correlation coefficients  $R$  between target and predicted values of 0.91 for cohesiveness, 0.84 for springiness, 0.86 for resilience, 0.65 for maximal force strain, 0.62 for final force, 0.77 for hardness, and 0.71 for maximal force. A variety of neural network configurations were tested to identify optimal models of the pear fruit rupture energy (Cevher et al., 2022), as well as the surface area and volume of the Golden Delicious apples (Ziaratban et al., 2016). The optimal model of pear fruit rupture energy was developed based on mass, water-soluble dry matter, and Magness-Taylor force. An ANN with one hidden layer with five neurons was employed, resulting in the coefficient of determination of  $R^2 = 0.94$ . The most precise model of the surface area and volume of the Golden Delicious apples, based on the major and minor diameters determined using a computer vision system, was generated using an ANN with one hidden layer containing 15 neurons. The high quality of the model is evidenced by the value of the coefficient of determination  $R^2 = 0.99$ . The value of the force of the skin puncture and flesh of the analyzed fruits was most influenced by the variety in the case of LK, and the year of harvest in the case of LE. Depending on the selected variable factors, significantly smaller fluctuations of the tested values (deformation, energy) were noted for LE fruits. The analyzed varieties had the greatest influence on the value of the energy needed to pierce the skin and flesh of the fruits.

## Conclusions

This study identified differences in fruit morphology, mechanical properties, and gas exchange between *L. caerulea* var. *kamtschatica* and *L. caerulea* var. *emphylocalyx*. The mean force required to puncture the fruits of LE varieties is 16.91% higher than that of the tested LK varieties. A comparable pattern is evident in the energy data, with LE varieties necessitating, on average, 7.42% more energy. The gaseous zone exerted a notable influence on the evaluated characteristics of stored fruit. Ozonation of LK and LE fruits for 3 minutes reduced the ethylene content by 10.8%, while ozonation for 1 minute decreased the carbon dioxide content by 10.9%. During storage, different reactions were observed depending on the length of storage. The ethylene content increased over the course of storage, while the CO<sub>2</sub> content decreased on the fifth day compared to the first day of storage. Due to the large area of cultivation and the significant extension of the process, the use of ozonation may be difficult. The use of ozonation in field production and in the conditions of storage of large quantities of raw material requires the use of appropriate equipment.

The results of the machine learning modelling demonstrate that all three modelling methods, namely MLP, RBF and SVM, yielded models with comparable accuracy. The accuracy of the models derived from the LK fruits dataset is deemed satisfactory for agricultural data,

particularly in the case of deformation and energy, where a mean absolute percentage error (MAPE) of several percent was obtained. The LM fruits set yielded models with lower accuracy overall, with the model for force prediction exhibiting insufficient accuracy for practical application. MLP models facilitated the determination of the degree of influence exerted by individual model input parameters on mechanical parameters. The models obtained can be utilized in real-life applications to design the storage processes for *L. caerulea* var. *kamtschatica* and *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* fruit using ozonation treatment.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.B. and J.G.; methodology, O.B and K.P.; software, O.B and K.P.; validation, O.B and K.P.; formal analysis, K.P.; investigation, O.B.; resources, J.G.; data curation, O.B.; writing-original draft, O.B and J.G.; preparation, O.B and J.G.; writing-review and editing, O.B and K.P.; visualization, O.B and K.P.; supervision, J.G.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest

**Funding:** The APC is co-financed by the University of Rzeszow.

## References

- Aliasgarian, S., Ghassemzadeh, H.R., Moghaddam, M., & Ghaffari, H. (2015). Mechanical damage of strawberry during harvest and postharvest operations. *Acta Technologica Agriculturae*, *18*, 1-5. <https://doi.org/10.1515/ata-2015-0001>
- Auzanneau, N., Weber, P., Kosińska-Cagnazzo, A., & Andlauer, W. (2018). Bioactive compounds and antioxidant capacity of *Lonicera caerulea* berries: Comparison of seven cultivars over three harvesting years. *Journal of Food Composition and Analysis*, *66*, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.006>
- Basara, O., & Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. *Molecules*, *29*, 3616. <https://doi.org/10.3390/molecules29153616>
- Becker, R., & Szakiel, A. (2019). Phytochemical characteristics and potential therapeutic properties of blue honeysuckle *Lonicera caerulea* L. (*Caprifoliaceae*). *Journal of Herbal Medicine*, *16*, 100237.
- Bolandnazar, E., Rohani, A., & Taki, M. (2019). Energy consumption forecasting in agriculture by artificial intelligence and mathematical models. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *42*(13), 1618–1632. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1604872>
- Božek, M. (2012). The Effect of Pollinating Insects on Fruiting of Two Cultivars of *Lonicera caerulea* L. *Journal of Apicultural Science*, *56*(2), 5-11. <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0018-6>
- Česonienė, L., Labokas, J., Jasutienė, I., Šarkinas, A., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Kazernavičiūtė, R., Pažereckaitė, A., & Daubaras, R. (2021). Bioactive Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Properties of *Lonicera caerulea* Berries: Evaluation of 11 Cultivars. *Plants*, *10*, 624. <https://doi.org/10.3390/plants10040624>
- Cevher, E.Y., & Yildirim, D. (2022). Using Artificial Neural Network Application in Modeling the Mechanical Properties of Loading Position and Storage Duration of Pear Fruit. *Processes*, *10*, 2245.
- Clay, D. E., Brugler, S., & Joshi, B. (2024). Will artificial intelligence and machine learning change agriculture: A special issue. *Agronomy Journal*, *116*, 791–794. <https://doi.org/10.1002/agj2.21555>
- Contigiani, E. V., Jaramillo-Sánchez, G., Castro, M. A., Gomez, P. L., & Alzamora, S. M. (2018). Postharvest quality of strawberry fruit (*Fragaria x Ananassa* Duch cv. Albion) as affected by ozone washing: Fungal spoilage, mechanical properties, and structure. *Food and Bioprocess Technology*, *11*, 1639-1650.

- Duarte-Molina, F., Gómez, P.L., Castro, M.A., & Alzamora, S.M. (2016). Storage quality of strawberry fruit treated by pulsed light: Fungal decay, water loss and mechanical properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.019>.
- Dziedzic, E., Błaszczyk, J., Bieniasz, M., Dziadek, K., & Kopeć, A. (2020). Effect of modified (MAP) and controlled atmosphere (CA) storage on the quality and bioactive compounds of blue honeysuckle fruits (*Lonicera caerulea* L.). *Scientia Horticulturae*, 265, p.109226. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109226>.
- El Bilali, A., Moukhliiss, M., Taleb, A., Nafii, A., Alabjah, B., Brouziyne, Y., Mazigh, N., Tezmine, K., & Mhamed, M. (2022). Predicting daily pore water pressure in embankment dam: Empowering Machine Learning-based modeling. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 47382–47398. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18559-7>.
- Elibox, W., Meynard, C., & Umaharan, P. (2017). Fruit volume and width at harvest can be used to predict shelf life in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Tropical Agriculture*, 94(2), 122-131. <https://doi.org/0041-3216/2017/020122-10>.
- Gawroński, J., Hortynski, J., Kaczmarska, E., Dyduch-Sieminska, M., Marecki, W., & Witorozec, A. (2014). Evaluation of phenotypic and genotypic diversity of some Polish and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and clones. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 13, 157-169.
- Geasa, M. M. M. (2022). Effect of mechanical damage on tomato fruits under storage conditions. *Journal of Soil Sciences and Agricultural Engineering*, 13(3), 93-98. <https://doi.org/10.21608/jssae.2022.124035.1053>.
- Gorzelany, J., Belcar, J., Kuźniar, P., Niedbała G., & Pentoś K. (2022). Modelling of Mechanical Properties of Fresh and Stored Fruit of Large Cranberry Using Multiple Linear Regression and Machine Learning. *Agriculture*, 12, 200. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020200>.
- Hosseini Monjezi, P., Taki, M., Abdanan Mehdizadeh, S., Rohani, A., & Ahamed, M.S. (2023). Prediction of Greenhouse Indoor Air Temperature Using Artificial Intelligence (AI) Combined with Sensitivity Analysis. *Horticulturae*, 9, 853. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080853>.
- Hu, M., Dong, Q., Liu, B., & Opara, U.L. (2016). Prediction of mechanical properties of blueberry using hyperspectral interactance imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.021>.
- Huang, W., Wang, X., Zhang, J., Xia, J., & Zhang, X. (2023). Improvement of blueberry freshness prediction based on machine learning and multi-source sensing in the cold chain logistics. *Food Control*, 145, 109496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109496>.
- Kula, M., & Krauze-Baranowska, M. (2016). Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)-The current state of phytochemical research and biological activity. *Post Fitoter*, 17, 111-118.
- Kuźniar, P., Belcar, J., Zardzewiały, M., Basara, O., & Gorzelany, J. (2022). Effect of Ozonation on the Mechanical, Chemical, and Microbiological Properties of Organically Grown Red Currant (*Ribes rubrum* L.) Fruit. *Molecules*, 27, 8231. <https://doi.org/10.3390/molecules27238231>.
- Leisso, R., Jarrett, B., & Miller, Z. (2021b). Haskap Preharvest Fruit Drop and Stop-drop Treatment Testing. *HortTechnology*, 31(6), 820-827. <https://doi.org/10.1139/cjps-2021-0138>.
- Leisso, R., Jarrett, B., Richter, R., & Miller, Z. (2021a). Fresh haskap berry postharvest quality characteristics and storage life. *Canadian Journal of Plant Science*, 101(6), 1051-63.
- Lufu, R., Ambaw, A., & Opara, U. L. (2020). Water loss of fresh fruit: Influencing pre-harvest, harvest and postharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 272, 109519. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109519>.
- Lv, Y., Tahir, I.I., & Olsson, M.E. (2019). Effect of ozone application on bioactive compounds of apple fruit during short-term cold storage. *Scientia Horticulturae*, 253, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.021>.
- Martinez Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillen, F., Valverde, J.M., Zapata, P., Castillo, S., & Valero, D. (2007). Tool to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition

- of ethylene action: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47 (6), 543-560. <https://doi.org/10.1080/10408390600846390>.
- Miller, F.A., Silva, C.L., & Brandao, T.R. (2013). A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77-106.
- Moggia, C., Beaudry, R.M., Retamales, J.B., & Lobos, G.A. (2017). Variation in the impact of stem scar and cuticle on water loss in highbush blueberry fruit argue for the use of water permeance as a selection criterion in breeding. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.05.019>.
- Mohsen, A., Shabankareh, S.H., Kiapey, A., Rezaeiasl, A., Mahmoodi, M.J., & Torshizi, M.V. (2024). Assessing kiwifruit quality in storage through machine learning. *Journal of Food Process Engineering*, 47. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14681>.
- Nawaz, M., & Babar, M.I.K. (2024). IoT and AI: a panacea for climate change-resilient smart agriculture. *Discover Applied Sciences*, 6, 517. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06228-y>.
- Ngcobo, M.E., Delele, M.A., Opara, U.L., Zietsman, C.J., & Meyer C.J. (2012). Resistance to airflow and cooling patterns through multi-scale packaging of table grapes. *International Journal of Refrigeration*, 35(2), 445-452. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2011.11.008>.
- Niedbała, G., Kurek, J., Świdorski, B., Wojciechowski, T., Antoniuk, I., & Bobran K. (2022). Prediction of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Yield Based on Artificial Intelligence Methods. *Agriculture*, 12, 2089. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122089>.
- Ochmian, I., Skupien, K., Grajkowski, J., Smolik, M., & Ostrowska, K. (2012). Chemical composition and physical characteristics of fruits of two cultivars of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in relation to their degree of maturity and harvest date. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40, 155-162. <https://doi.org/10.15835/nbha4017314>.
- Pan, H., Yang, J., Shi, Y., & Li, T. (2015). BP neural network application model of predicting the apple hardness. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 12(9), 2802–2807. <https://doi.org/10.1166/jctn.2015.4180>.
- Peipei, Z., Bingbing, S., Hongwei, Ji., Wang, H., Yuexuan, L., Zhang, X., & Chunhua, R. (2022). Non-destructive Prediction of Mechanical Parameters to Apple Using Hyperspectral Imaging by Support Vector Machine. *Food Analytical Methods*, 1, 1397-1406.
- PN-90/A-75101-03:1990. Fruit and vegetable preserves. Preparation of samples for physicochemical tests. Determination of dry matter content by the gravimetric method. Polski Komitet Normalizacyjny.
- Ranieri, A., Petacco, F., Castagna, A., & Soldatini, G.F. (2000). Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone. *Plant Science*, 159(1), 159-167.
- Ren, B., Zhang, L., Chen, J., Wang, H., Bian, C., Shi, Y., Qin, D., Huo, J., & Gang, H. (2023). Response of Abscission Zone of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) Fruit to GA<sub>3</sub> and 2,4-D Spray Application. *Agronomy*, 13, 2937. <https://doi.org/10.3390/agronomy13122937>.
- Ropelewska, E. (2022). Assessment of the Influence of Storage Conditions and Time on Red Currants (*Ribes rubrum* L.) Using Image Processing and Traditional Machine Learning. *Agriculture*, 12, 1730. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101730>.
- Saeidirad, M. H., Rohani, A., & Zarifneshat, S. (2013). Predictions of viscoelastic behavior of pomegranate using artificial neural network and Maxwell model. *Computers and Electronics in Agriculture*, 98, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.07.009>
- Satitmunnaithum, J., Kitazawa, H., Arofatullah, N.A., Widiastuti, A., Kharisma, A.D., Yamane, K., Tanabata, S., & Sato, T. (2022). Microbial population size and strawberry fruit firmness after drop shock-induced mechanical damage. *Postharvest Biology and Technology*, 192, p.112008. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112008>
- Senica, M., Stampar, F., & Mikulic-Petkovsek, M. (2018). Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subs. *edulis*) berry; a rich source of some nutrients and their differences among four different cultivars. *Scientia Horticulturae*, 238, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.056>

- Son, N., Chen, C., Cheng, Y., Toscano, P., Chen, C., Chen, S., Tseng, K., Syu, C., Guo, H., & Zhang, Y. (2022). Field-scale rice yield prediction from Sentinel-2 monthly image composites using machine learning algorithms. *Ecological Informatics*, 69, 101618. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2022.101618>.
- Tappi, S., Ragni, L., Tylewicz, U., Romani, S. Ramazzina, I., & Rocculi, P. (2017). Browning response of fresh-cut apples of different cultivars to cold gas plasma treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 53, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.005>.
- Yu M., Li S., Zhan Y., Huang Z., Lv J., Liu Y., Quan X., Xiong J., Qin D., & Huo J. (2023). Evaluation of the Harvest Dates for Three Major Cultivars of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in China. *Plants*, 12, 3758. <https://doi.org/10.3390/plants12213758>.
- Zapałowska, A., Matłok, N., Zardzewiały, M. Piechowiak, T., & Balawejder, M. (2021). Effect of Ozone Treatment on the Quality of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Plants*, 10, 847. <https://doi.org/10.3390/plants10050847>.
- Zhu, C., Zhang, L., Gao, Y., Qin, D., & Huo, J. (2022). Two novel blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars: Lanjingling and Wulan. *HortScience*, 57(9), 1145-1147. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16674-22>.
- Zhu, S., Liu, J., Yang, Q., Jin, Y., Zhao, S., Tan, Z., ... & Zhang, H. (2023). The impact of mechanical compression on the postharvest quality of 'Shine Muscat' grapes during short-term storage. *Agro-nomy*, 13(11), 2836.
- Ziaratban, A., Azadbakht, M., Ghasemnezhad, A. (2016). Modeling of volume and surface area of apple from their geometric characteristics and artificial neural network. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 762–768. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1180533>

## **BADANIE WPŁYWU OZONOWANIA NA PARAMETRY MECHANICZNE OWOCÓW *LONICERA CAERULEA* L. ZA POMOCĄ UCZENIA MASZYNOWEGO**

**Streszczenie.** *Lonicera caerulea* L. – dobrze znana w Polsce pod nazwą jagody kamczackiej w ostatnich latach stała się popularna. Badania przeprowadzone na niedawno wyhodowanych japońskich klonach haskap miały wykazać, że owoce nadają się do mechanicznego zbioru i przechowywania. Niniejsza praca ma na celu ocenę właściwości mechanicznych i trzech odrębnych metod uczenia maszynowego, aby stworzyć modele predykcyjne, które wyjaśniają związek między kluczowymi atrybutami mechanicznymi owoców i warunkami przechowywania *L. caerulea*. Średnia siła potrzebna do przekłucia skóry i miąższu owoca *L. caerulea* var. *emphylocalyx* wynosi o 16,91% więcej niż ta wymagana dla badanych odmian *L. caerulea* var. *kamtschatica*. Owoce *L. caerulea* odmiany *emphylocalyx* wykazały istotnie wyższy poziom tempa oddychania, przy poziomach C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> i CO<sub>2</sub> podczas przechowywania na poziomie 25,5% i 10,5% odpowiednio wyższym, w porównaniu do odmian *L. caerulea* var. *kamtschatica*. Algorytm uczenia maszynowego zbadał wygenerowane dokładne modele do przewidywania deformacji i energii. Średni bezwzględny błąd procentowy (MAPE) badanych modeli wynosił pomiędzy 14,87 a 20,65%. Modele o dużo niższej dokładności uzyskano do przewidywania siły przy średnim bezwzględnym błędzie procentowym wynoszącym 28,95% dla owoców *L. caerulea* var. *kamtschatica* oraz 42,33% dla owoców *L. emphylocalyx*. Uprawa i ulepszenie odmian *Lonicera caerulea* L. ma wielkie znaczenie dla rozwoju zmechanizowanych metod uprawy i rozwoju ulepszonych technologii przechowywania tego gatunku. Stworzenie metod uczenia maszynowego poprawi rozwój modeli predykcyjnych, które mogą służyć jako narzędzie predykcyjne dla zależności wybranych cech mechanicznych.

**Słowa kluczowe:** *Lonicera caerulea* L., cechy morfologiczne, wymiana gazowa, uczenie maszynowe

## Article

# Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.)

Oskar Basara <sup>1,2,\*</sup>, Wojciech Litwińczuk <sup>3</sup>  and Józef Gorzelany <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Food and Agriculture Production Engineering, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza Street, 35-601 Rzeszow, Poland; jgorzelany@ur.edu.pl

<sup>2</sup> Doctoral School, University of Rzeszow, St Rejtana 16C, 35-959 Rzeszow, Poland

<sup>3</sup> Department of Plant Physiology and Biotechnology, Institute of Agricultural Sciences, Land Management and Environmental Protection, University of Rzeszow, Cwiklinskiej 2nd St., 35-601 Rzeszow, Poland; wlitwinczuk@ur.edu.pl

\* Correspondence: oskarb@dokt.ur.edu.pl

**Abstract:** In recent years, interest in *Lonicera caerulea* production has grown significantly because of its nutritional and pharmaceutical benefits, leading to rapid expansion in its cultivation. *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* is a lesser-known botanical variety. Due to differences between plants of the *Lonicera* genus and the lack of scientific reports on micropropagation, it is necessary to determine the possibilities of in vitro propagation. The aim of this study was to elaborate a micropropagation protocol of two new breeding clones of *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*: ‘21–17’ and ‘139–24’. The experiments were carried out on in vitro cultures grown on MS medium supplemented with 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA or 1 mg·dm<sup>-3</sup> mT. Two types of explants were used during the experiment: nodal fragments (NFs) and shoot-tips (STs). Before acclimatisation, some rooted microshoots were subjected to cooling at 4 °C for 4 weeks. Significantly more ST explants than NF explants started to grow at the proliferation stage. The application of BA resulted in much better proliferation and health of cultures. Cold storage of micropropagated ‘139–24’ plantlets significantly increased their survival in acclimatisation in contrast to ‘21–17’ plantlets but weakened further growth of the plants. In future in vitro studies on *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, BA can be used as the primary growth regulator due to its effectiveness and low cost. Nodal fragments should be considered as the main propagation material since they promote better growth rates. Additionally, further research is required to explore the effects of low-temperature storage on the growth and physiology of these plants. The results obtained in this research may contribute to the development of micropropagation technology in the future for *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*.

**Keywords:** in vitro; *Lonicera*; meta-topolin; explant type; cold storage



**Citation:** Basara, O.; Litwińczuk, W.; Gorzelany, J. Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.). *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 9452. <https://doi.org/10.3390/app14209452>

Academic Editor: Roger Narayan

Received: 5 September 2024

Revised: 8 October 2024

Accepted: 10 October 2024

Published: 16 October 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The *Lonicera* genus is part of the *Caprifoliaceae* family, which comprises over 200 species. Among these, *Lonicera caerulea* (blue honeysuckle) stands out as an important species originating from East and Central Asia. It has various botanical varieties, including *L. caerulea* var. *edulis*, *kamtschatica*, *altaica*, *boczarnikowae* and *emphyllocalyx*, coming from countries like Russia and Japan. These shrubs can grow between 0.8 and 3.0 m tall and have a lifespan of around 25 to 30 years. They require external pollination to bear fruit and typically yield about 500 g of berries per shrub after three years. The cylindrical dark blue or purple berries vary in size between 1.5 and 3.0 cm [1,2]. *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* Nakai, commonly known as the hascap berry, is a botanical variety of *L. caerulea*, native to Japan. It is primarily found in the cold intermountain areas from the central to northern regions, especially in Hokkaido. Its fruit flavour profile ranges from sour to sweet and the fruit contains a wide range of bioactive compounds such as anthocyanins, minerals and vitamins. Berries are known as functional food, and are used for products like jams,

juices, wines and tinctures. *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* is closely related to *Lonicera caerulea* var. *edulis* and it is difficult to distinguish the cultivars of the two varieties [3]. Important features of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* are the later ripening of its fruits, which reduces the risk of frost damage to flowers, and its reduced fruit fall compared to other botanical varieties of *Lonicera* [4]. Due to its nutritional and pharmaceutical value, interest in its production has increased, and the production of blue honeysuckle is expanding rapidly. Plants from the *Lonicera* genus grow very well in Polish weather conditions; hence, among other things, great interest among customers in new cultivars has appeared.

The traditional methods of propagation of honeysuckle cultivars include dividing mother plants or usage of semi-hardwood or hardwood cuttings [5,6]. However, hardwood cuttings occasionally root at a lower rate, around 40%. Using softwood cuttings can yield more satisfactory results in propagation. Generative reproduction does not ensure consistency in the offspring's cultivar traits [7]. Traditional methods for propagating berries are ineffective because they rely on cuttings, making the process slow and labour-intensive. The use of semi-hardwood or hardwood cuttings increases the risk of microbiological infections [8]. Therefore, in vitro tissue cultures can be used for rapid clonal propagation. In vitro shoot cultures provide an alternative means of plant propagation that is not reliant on the growing season. This method features a high multiplication rate and yields micropropagated plants with enhanced health status. It provides additional advantages over sexual propagation [9,10].

Microclonal propagation represents a promising technique which allows propagation of large quantities of high-quality planting material of many fruits and ornamental plants within short time frames in a limited space, without the strong influence of external conditions. The process of in vitro propagation for any plant culture generally consists of four main stages: introducing the initial form into a sterile culture, the propagation phase, rooting the microshoots and finally adapting them to soil-based growth. Genotype-specific characteristics of the explant, its structure, its origin, the composition of the culture medium and the physical conditions play crucial roles at all stages of micropropagation [9]. The composition of the growth medium, growing parameters, various manipulations with explants, and the duration of the subculture all contribute to ensuring optimal propagation. One of the key aspects of micropropagation is selecting the appropriate amount of the growth substance. The use of cytokinins is particularly common, the selection of which is one of the most critical factors in the development of protocols for the in vitro culture of plants. 6-benzyl adenine (BA) is one of the most frequently used cytokinins due to its efficiency and cheap cost [11–14]. Meta-topolin (mT) is a potent aromatic cytokinin that can be utilised in micropropagation; it has immense potential in shoot proliferation, preventing shoot-tip necrosis in *Ginkgo biloba* L., evading the effects of hyperhydricity in *Corylus colurna* L., increasing the shoot length of *Ribes grossularia* and achieving efficient acclimatisation and rooting of apple varieties [15–18]. In order to minimise the time and costs of plant production, it is necessary to develop a technology for clonal reproduction of plants at all four stages of the process.

The use of in vitro cultures may be applicable to the propagation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*. As this variety is only gaining popularity, there are no clear scientific reports regarding its micropropagation. The reaction of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* may be different compared to that of other plants of the genus. Several *Lonicera* spp. are propagated in vitro, in most cases using calluses (*Lonicera nitida* [19,20]), axillary and apex shoots (*Lonicera caerulea* [21] and *Lonicera edulis* [8,17]), and leaves (*Lonicera japonica* [22]). These methods are not widely adopted because the effectiveness of micropropagation varies significantly depending on the genotype, and it sometimes yields unsatisfactory results. Micropropagation methods for other botanical species of *Lonicera* may not work for *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*. The use of different plant parts as explants and growth substances may have different effects in the case of micropropagation [23]. The micropropagation protocol of *Lonicera caerulea*, mainly *L. caerulea* var. *kamtschatica*, involves the use of BA as the main growth substance [24,25]. Typically, cultures are carried out at temperature; however, in

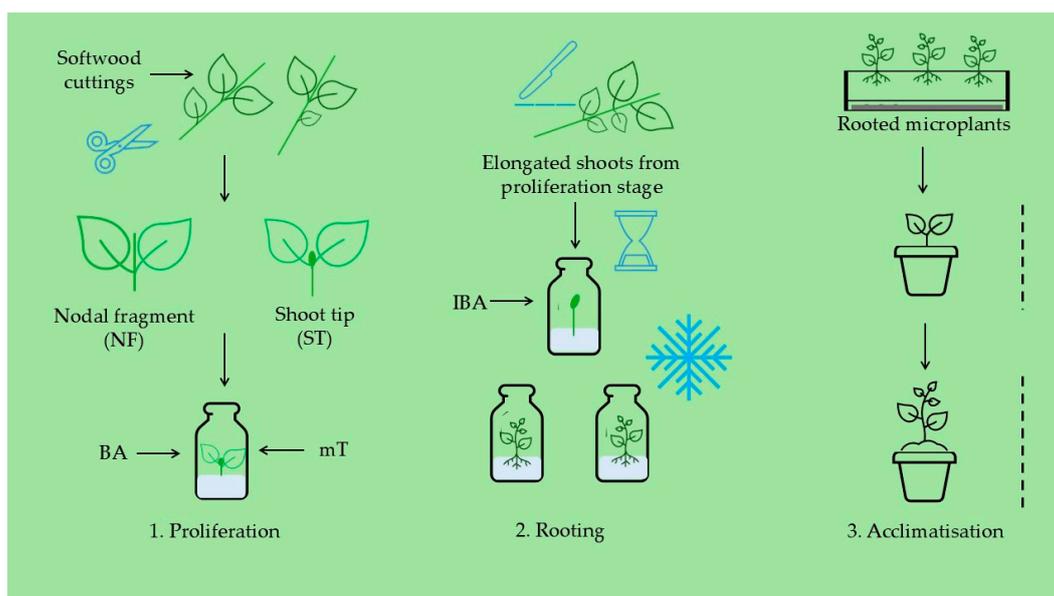
the case of some species, cooling of the cultures is practiced. The use of low-temperature (0–10 °C) storage of in vitro cultures is a complementary conservation method of such genetic resources. Additionally, this increases the proliferation of rootstocks in vitro [26,27]. The significant differences between micropropagation of the botanical varieties of *Lonicera* make it necessary to determine the appropriate growing conditions for *L. var. emphyllocalyx* before any attempt at commercial in vitro cultivation is made.

The aim of this experiment was to improve the protocol of micropropagation of Japanese hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) and to draw attention to the in vitro propagation of newly created breeding clones and the use of plantlets in commercial plantations. Different reactions of many species and even cultivars require the optimisation of a micropropagation method for each clone. It should have a beneficial effect on the growth and physiological conditions of microplants. To our best knowledge, such experiments have not yet been conducted in the case of hascap; despite the increasing popularity of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, there are very few scientific reports on this botanical variety and its in vitro propagation. For this reason, the development of a Japanese hascap micropropagation method was the focus of this study. Selected clones from in vitro micropropagation may be useful for mechanical harvesting due to their bush structure and low fruit drop rate. Future research should focus on mechanical harvesting. Advancing micropropagation technology will enhance breeding and cultivation by enabling rapid plant multiplication.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

Explants used for initiation of cultures were prepared from softwood cuttings. Plant material was collected in the year 2022 from 2-year-old plants propagated in containers, grown in a plant nursery located in Tyczyn (49°57'52" N 22°2'47" E, Subcarpathian Voivodship, Poland). The two new studied breeding clones, '21–17', referred to as 'J21', and '139–24', referred to as 'J13', were kindly provided by the 'Korfanty' plant nursery (49°41'41" N 22°5'3" E, Grabownica Starzeńska, Subcarpathian Voivodship, Poland). Donor plants were not previously propagated in vitro. The micropropagation process of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* included three stages: proliferation, rooting and acclimatisation (Figure 1).



**Figure 1.** Micropropagation stages of *L. var. emphyllocalyx*; BA—6-benzyl adenine, mT—meta-topolin, IBA—(1*H*-indol-3-yl)butanoic acid.

## 2.2. Initiation of In Vitro Cultures

Before the surface disinfection of the Japanese hascap was carried out, the plants were housed in a greenhouse under high air relative humidity (95% RH) at 22–25 °C for 3 weeks. Parental plants were sprayed with a solution of Amistar 250 SC (1 g·dm<sup>-3</sup>) and Previcur Energy 840SL (1 g·dm<sup>-3</sup>). Fragments of shoots 10 cm long were washed in a 70% ethanol solution and soaked in a 1% solution of sodium hypochlorite (NaOCl) for 10 min, then rinsed in sterile deionised water and then in a solution of ascorbic and citric acid (200 mg·dm<sup>-3</sup> for both). The medium composition was developed based on the results of preliminary experiments, which are not presented in this study. For each stage of the experiment, different variants of Murashige and Skoog media (MS) were used (Table 1).

**Table 1.** Composition of media used for micropropagation of Japanese hascap.

Stages	Initiation	Proliferation	Rooting
Macronutrients	100% MS <sup>1</sup>	100% MS	50% MS
Micronutrients	100% MS	100% MS	50% MS
Additional micronutrients	Fe(III)EDDHA (10 mg·dm <sup>-3</sup> )	Fe(III)EDDHA (10 mg·dm <sup>-3</sup> )	Fe(III)EDDHA (5 mg·dm <sup>-3</sup> )
Vitamins	100% MS, 100% WPM <sup>2</sup>	100% MS, 100% WPM	200% WPM
Additional vitamins	folic acid (0.5 mg·dm <sup>-3</sup> )	folic acid (0.5 mg·dm <sup>-3</sup> ), pantothenic acid (1 mg·dm <sup>-3</sup> )	folic acid (0.5 mg·dm <sup>-3</sup> )
Myo-inositol	100 mg·dm <sup>-3</sup>	100 mg·dm <sup>-3</sup>	100 mg·dm <sup>-3</sup>
Sucrose	20 g·dm <sup>-3</sup>	20 g·dm <sup>-3</sup>	15 g·dm <sup>-3</sup>
Growth regulators	1 mg·dm <sup>-3</sup> BA	1 mg·dm <sup>-3</sup> BA or 1 mg·dm <sup>-3</sup> mT	2 mg·dm <sup>-3</sup> IBA
pH	5.7	5.7	5.7
Agar	8 g·dm <sup>-3</sup>	8 g·dm <sup>-3</sup>	8 g·dm <sup>-3</sup>

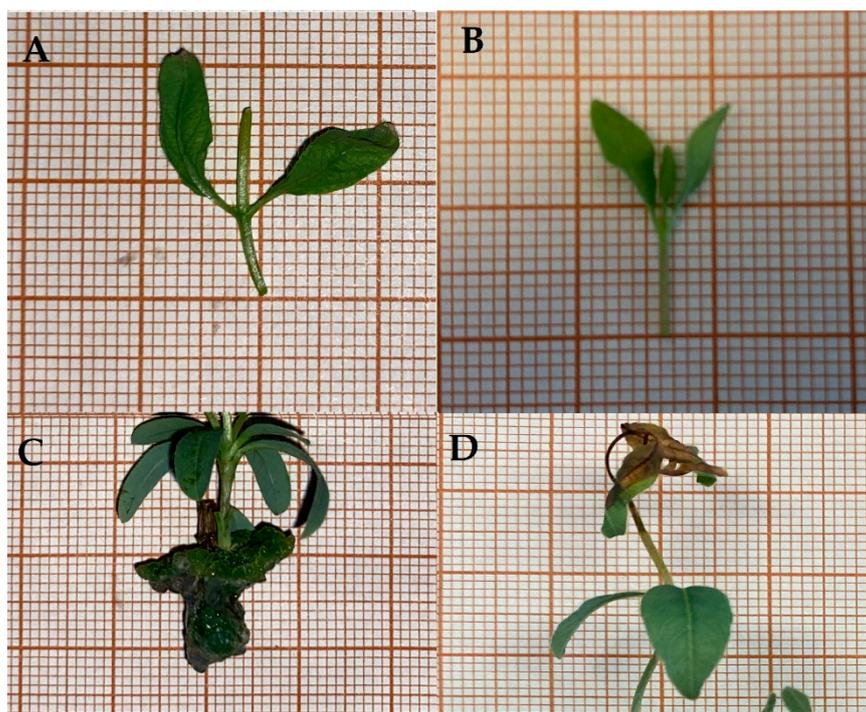
<sup>1</sup> MS—Murashige and Skoog [28]. <sup>2</sup> WPM—McCown et al. [29].

The medium composition included 100% MS macronutrients—1.65 g·dm<sup>-3</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 440 mg·dm<sup>-3</sup> CaCl<sub>2</sub>, 180.7 mg·dm<sup>-3</sup> MgSO<sub>4</sub>, 170 mg·dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1.90 g·dm<sup>-3</sup> KNO<sub>3</sub>—and 100% MS micronutrients—6.2 mg·dm<sup>-3</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.02 mg·dm<sup>-3</sup> CoCl<sub>2</sub>, 27.8 mg·dm<sup>-3</sup> FeSO<sub>4</sub>, 22.3 mg·dm<sup>-3</sup> MnSO<sub>4</sub>, 0.83 mg·dm<sup>-3</sup> KI, 0.25 mg·dm<sup>-3</sup> ZnSO<sub>4</sub> and 0.02 CuSO<sub>4</sub>. The medium contained 100% MS vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine—and 100% WPM vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine.

## 2.3. Proliferation

For proliferation, explants were placed in a medium containing either N-(Phenylmethyl)-7H-purin-6-amine (6-benzyl adenine (BA, 1.0 mg·dm<sup>-3</sup>) or 6-(3-Hydroxybenzylamino)purine (meta-topolin (mT, 1.0 mg·dm<sup>-3</sup>). The medium composition included 100% MS macronutrients—1.65 g·dm<sup>-3</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 440 mg·dm<sup>-3</sup> CaCl<sub>2</sub>, 180.7 mg·dm<sup>-3</sup> MgSO<sub>4</sub>, 170 mg·dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1.90 g·dm<sup>-3</sup> KNO<sub>3</sub>—and 100% MS micronutrients—6.2 mg·dm<sup>-3</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.02 mg·dm<sup>-3</sup> CoCl<sub>2</sub>, 27.8 mg·dm<sup>-3</sup> FeSO<sub>4</sub>, 22.3 mg·dm<sup>-3</sup> MnSO<sub>4</sub>, 0.83 mg·dm<sup>-3</sup> KI, 0.25 mg·dm<sup>-3</sup> ZnSO<sub>4</sub> and 0.02 CuSO<sub>4</sub>. The medium contained 100% MS vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine—and 100% WPM vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine. The medium contained 100% MS vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine—and 100% WPM vitamins—2 mg·dm<sup>-3</sup> glycine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> pyridoxine, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> niacin and 1 mg·dm<sup>-3</sup> thiamine. The growth hormone concentration was determined based on scientific reports of micropropagation of *L. caerulea* var. *kamtschatica*

and results of preliminary experiments [8,30]. Each treatment was represented by at least 6 jars ( $\times 8$  explants). During proliferation at the end of passage, the numbers of short (3–9 mm) and long ( $>10$  mm) shoots and the total number of and length of shoots were measured. In addition, the number of cultures that were dead or had apical necrosis was counted as well as the number of healthy shoots and the size of calluses in the cultures. Cultures were grown in 300–500 mL glass jars, filled with 50 mL of medium, closed with autoclavable, transparent lids. They were grown on shelves in a culture room with the temperature ranging from 26 °C during the day to 24 °C at night. The photoperiod was 16 h/8 h (day/night), with light of  $26 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD provided by Gro-lux fluorescent tubes. The experiment was carried out on 1-year-old cultures which were previously propagated through six subsequent 6–7-week-long subcultures. The cultures were established from 2 types of explants, i.e., nodal fragments (NFs) consisting of 2 nodes, and shoot-tips (STs) (Figure 2A,B).



**Figure 2.** Types of explants used during proliferation of Japanese hascap clones. (A) Nodal fragment explants (NFs), (B) shoot-tip explants (STs); (C) microshoots with callus at the base apical, (D) necrosis at microshoots.

#### 2.4. Rooting Stage

For rooting, explants were placed in a medium containing 4-(1*H*-indol-3-yl)butanoic acid (IBA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). The medium composition included 50% MS macronutrients— $1.65 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $440 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $180.7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $170 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $1.90 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$ —and 100% MS micronutrients— $6.2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.02 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{CoCl}_2$ ,  $27.8 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{FeSO}_4$ ,  $22.3 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{MnSO}_4$ ,  $0.83 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{KI}$ ,  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{ZnSO}_4$  and  $0.02 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{CuSO}_4$ . The medium contained 100% MS vitamins— $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  glycine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  pyridoxine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  niacin and  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  thiamine—and 100% WPM vitamins— $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  glycine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  pyridoxine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  niacin and  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  thiamine. The medium contained 200% WPM vitamins:  $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  glycine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  pyridoxine,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  niacin and  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  thiamine. The IBA concentration was determined based on preliminary experiments on *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* micropropagation. Each treatment was represented by at least 6 jars ( $\times 8$  explants). During rooting at the end of passage, the numbers of short (3–9 mm) and long ( $>10$  mm) shoots and the total number of and length of shoots were measured. In addition, the number of cultures that rooted or had apical necrosis was counted as well as the length of roots in

the cultures. Cultures were grown in 300–500 mL glass jars, filled with 50 mL of medium, closed with autoclavable, transparent lids. They were grown on shelves in a culture room with the temperature ranging from 26 °C during the day to 24 °C at night. The photoperiod was 16 h/8 h (day/night), with light of 26  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD provided by GroLux fluorescent tubes.

### 2.5. Acclimatisation of Regenerated Plants to Ex Vitro Conditions

Healthy-looking plantlets (rooted in vitro microshoots), about 2 cm long, were acclimated. Some of them had been stored in jars filled with medium at a temperature of 4 °C for 4 weeks before acclimatisation. Microplants were planted at 3 cm  $\times$  3 cm spacing into plastic containers filled with a substrate consisting of universal peat substrate (Hartmann, Poland) and sand (3:1) with a pH value of 5.5. All containers were covered with milky lids and provided with light of 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD on a 16 h/8 h cycle (day/night). Rooted shoots were transplanted to 5  $\text{dm}^{-3}$  trays and grown in a greenhouse under a controlled atmosphere for 2 weeks. Then, the pre-acclimatised plantlets were placed separately into 1  $\text{dm}^{-3}$  pots, numbered and grown outdoors in shady conditions in the nursery. Both species were grown in pots containing peat substrate, sand and perlite in a ratio of 20:1:1, with the addition of the fertiliser Osmocote Exact 3–4 m (ICL, Sydney, Australia) at a concentration of 2.0 kg for 1  $\text{m}^3$  of substrate. After two and four weeks, each plant's height was measured.

### 2.6. Statistical Analysis

Collected data were subjected to an ANOVA and an  $\text{LSD}_{0.05}$  mean separation test. Data presented as percentages (i.e., number of dead cultures, number of cultures with shoot-tip necrosis, number of explants which started to grow) were subjected to testing on the difference between two proportions. The differences were considered as significant at  $\alpha = 0.05$ . Statistica 13.3 computer software was used. F test values for the measured parameters during micropropagation are located in Appendix A (Tables A1–A3).

## 3. Results

### 3.1. Proliferation of Japanese Hascap Clones

Not all explants placed onto the medium started to grow; in some cases, death of entire cultures or apical necrosis or callusing at the explant base were observed (Table 2, Figure 2C,D).

**Table 2.** Physiological condition of Japanese hascap in vitro cultures established from different explants on media supplemented with mT or BA.

Clone	Explant Type	Cytokinin	Number of Explants Which Started to Grow [%]	Number of Cultures with Apical Necrosis [%]
J21	NF	BA	79.1 abc <sup>1</sup>	8.8 ab
		mT	42.9 de	0.0 ab
	ST	BA	82.6 ab	0.0 a
		mT	60.6 bcd	0.0 ab
J13	NF	BA	83.0 a	5.1 ab
		mT	28.9 e	0.0 ab
	ST	BA	92.6 a	12.0 a
		mT	41.2 efg	0 abc
J21	-	-	68.6 a	2.9 a
J13	-	-	69.3 b	7.5 b
-	NF	-	61.5 a	5.2 a

Table 2. Cont.

Clone	Explant Type	Cytokinin	Number of Explants Which Started to Grow [%]	Number of Cultures with Apical Necrosis [%]
-	ST	-	76.7 b	5.2 a
-	-	BA	84.7 b	6.8 b
-	-	mT	43.1 a	0.0 a

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . Data expressed in % were subjected to testing on difference between two proportions.

Cultures of both clones showed similar development (Table 2), though significantly more ST than NF explants resumed growth. The effect of cytokinins was prominent, with almost twice as many cultures growing on BA-supplemented media compared to mT. No clone-specific reaction to cytokinin type or explant was noted. More cultures grew on BA than mT, with the explant type being less important. Apical necrosis occurred only in cultures grown on BA, not mT (Table 2). No significant differences were found between J21 and J13 clones in shoot proliferation (Table 3), although J21 showed stronger shoot elongation than J13.

Table 3. Development of Japanese hascap clone in vitro cultures established from explants on media supplemented with mT or BA.

Clone	Explant Type	Cytokinin	Number of Short Shoots (3–9 Mm) [Psc]	Number of Long Shoots (>10 mm) [Pcs]	Total Number of Shoots [Pcs]	Length of the Longest Shoot [Cm]	Total Length of Shoots [Cm]	Callus Size [Cm]
J21	NF	BA	0.3 a	1.7 c <sup>1</sup>	1.9 bc	5.2 a	7.4 d	0 a
		mT	0.0 a	1.0 ab	1.0 a	3.9 ab	4.2 ab	0 a
	ST	BA	0.4 a	1.3 b	1.7 b	4.6 a	5.8 bc	1.6 a
		mT	0.1 a	1.1 ab	1.2 a	2.9 b	2.9 a	0 a
J13	NF	BA	0.3 a	1.8 c	2.1 c	4.5 a	6.9 cd	0 a
		mT	0.0 a	1.0 ab	1.0 a	4.3 ab	4.3 ab	0 a
	ST	BA	0.2 a	1.1 a	1.2 a	3.1 b	3.4 a	0 a
		mT	0.1 a	1.1 ab	1.1 ab	3.6 ab	4.1 ab	0 a
SL <sup>2</sup>			ns	***	***	***	***	ns
SL <sub>int</sub> <sup>3</sup>			ns	ns	ns	*	*	ns
J21	-	-	0.2 a	1.4 a	1.6 a	4.4 b	5.6 b	0.6 a
J13	-	-	0.2 a	1.3 a	1.6 a	3.8 a	4.8 a	0 a
SL			ns	ns	ns	*	ns	ns
-	NF	-	0.2 a	1.6 b	1.8 b	4.7 b	6.5 b	0 a
-	ST	-	0.2 a	1.2 a	1.4 a	3.6 a	4.1 a	0.5 b
SL			ns	***	**	***	***	**
-	-	BA	0.3 b	1.4 b	1.7 b	4.2 b	5.7 b	0.4 b
-	-	mT	0.1 a	0.0 a	1.1 a	3.5 a	3.7 a	0.0 a
SL			***	***	***	*	***	***

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . <sup>2</sup> SL—level of significance of differences among variables: ns—not significant, \*\*\*— $p < 0.001$ , \*\*— $p < 0.01$ , \*— $p < 0.05$ . <sup>3</sup> SL<sub>int</sub>—level of significance for interaction: clone x treatments (type of expl x cytokinin).

The differences between clones in terms of explant calluses were not statistically proven (Table 3). It was found that cultures established from NF explants grew much stronger as compared to STs. The NF cultures produced more long shoots and did not callus at the base, unlike the ST cultures. Cultures growing in the presence of BA were

characterised by significantly more intense proliferation and elongation of shoots. The mT cultures stimulated proliferation and callus growth much less compared to BA (Table 3). There was no clone-specific reaction to the analysed factors (type of cytokinin and explant) when proliferation of shoots and calluses were considered ( $SL_{int-ns}$ ). However, a reaction was found in the case of shoot elongation. ST explants of clone J13 produced new shoots of similar length, while in the case of clone J21, cytokinin BA significantly stimulated shoot elongation as compared to mT (Table 3). Cultures established from the NF cultures of both clones responded in a similar way to cytokinins and produced significantly stronger new shoots in the presence of BA.

### 3.2. Rooting of Japanese Hascap Explants

Not all explants of studied clones rooted or developed new shoots (Table 4). It was found that significantly more cultures of clone J21 started to grow in comparison with clone J13 (Figure 3, Table 4). The susceptibility of the tested clones to apical necrosis was similar.

**Table 4.** Rooting and growth of Japanese hascap clones in rooting stage of in vitro experiment.

Clone	Explant Type	Number of Rooted Explants [%]	Average Length of Roots [cm]	Number of Explants with Elongated Shoots [%]	Number of Cultures with Apical Necrosis [%]
J21	NF	97.2 b <sup>1</sup>	0.8 b	72.9 a	0.0 a
	ST	80.0 a	0.5 a	43.8 abc	0.0 a
J13	NF	82.9 a	1.3 b	62.5 ab	0.0 a
	ST	93.3 b	0.9 a	31.3 c	6.3 a
SL <sup>2</sup>		nc <sup>4</sup>	*	nc	nc
$SL_{int}$ <sup>3</sup>		nc	ns	nc	nc
J21	-	92.4 b	0.8 a	65.6 b	3.1 a
J13	-	90.4 a	1.0 b	41.6 a	0.0 a
SL		nc	ns	nc	nc
-	NF	93.4 b	1.2 b	71.4 b	4.2 a
-	ST	87.8 a	0.7 a	37.5 a	0.0 a
SL		nc	*	nc	nc

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . <sup>2</sup> SL—level of significance of differences among variables: ns—not significant, \*— $p < 0.05$ . <sup>3</sup>  $SL_{int}$ —level of significance for interaction: clone x type of explant. <sup>4</sup> nc (not calculated)—the test on the difference between two proportions (used in the case of data presented as percentages) does not enable calculation of SL and F values.



**Figure 3.** Rooted microshoots of Japanese hascap.

However, significant differences between the tested clones were observed in terms of the rooting efficiency. The effect of the explant used was more noticeable; almost twice as many growing cultures were observed in the case of the usage of NF explants. Compared to STs, the use of the NF explant allowed for significantly greater rooting and significantly influenced the root length. No differences in apical necrosis frequency were proved (Table 4).

NF explants rooted much better compared to the ST explants (Table 4). However, in the case of the J21 clone, the number of rooted NF explants was higher than for STs, in contrast to clone J13. NF explants of both clones developed longer shoots than the ST ones (Table 4). Differences between clones in the proliferation and elongation of new shoots were not found. Similarly, there was no significant relationship between the kind of explant and the development of both clones during the rooting stage (Table 5).

**Table 5.** Development of Japanese hascap clones in rooting stage of in vitro cultures established from different explants.

Clone	Explant Type	Number of Short Shoots (3–9 mm) [psc]	Number of Long Shoots (>10 mm) [psc]	Total Number of Shoots [psc]	Length of the Longest Shoot [cm]
J21	NF	0.1 a <sup>1</sup>	1.2 a	1.2 a	6.3 a
	ST	0.0 a	1.0 a	1.0 a	6.9 a
J13	NF	0.0 a	1.0 a	1.0 a	7.0 a
	ST	0.0 a	1.0 a	1.0 a	6.5 a
SL <sup>2</sup>		ns	ns	ns	ns
$SL_{int}$ <sup>3</sup>		ns	ns	ns	ns
J21	-	0.0 a	1.1 a	1.1 a	6.5 a
J13	-	0.0 a	1.0 a	1.0 a	6.6 a
SL		ns	ns	ns	ns
-	NF	0.1 a	1.1 a	1.2 a	6.4 a
-	ST	0.0 a	1.0 a	1.0 a	6.7 a
SL		ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . <sup>2</sup> SL—level of significance of differences among variables: ns—not significant. <sup>3</sup>  $SL_{int}$ —level of significance for interaction: clone x type of explant.

### 3.3. Acclimatisation of Japanese Hascap Clones to Ex Vitro Conditions

During the acclimatisation stage, not all microplants resumed growth, and complete necrosis of plantlets was observed in many cases (Table 6, Figure 4A).

There were significantly more dying plantlets, mostly in the J21 clone. Both clones formed calluses of similar size, but J21 developed roots twice as long as those of J13. Microplants from NF explants had larger calluses and shorter roots compared to those from ST explants. The explant type did not affect the number of dead plantlets (Table 6, Figure 4B). Cold treatment led to more plantlet necrosis and death but did not influence callus formation or root elongation. Chilled ST plantlets of both clones died more frequently. More cooled NF plantlets started growing compared to STs (Table 6, Figure 4C). Chilled J21 plantlets formed smaller calluses, while J13 plantlets from STs did not produce calluses, unlike NF plantlets. J21 roots were larger after cooling, but J13 NF plantlets developed weaker roots, regardless of chilling.

Significant differences in growth, rooting and acclimatisation of plantlets of both clones subjected to cooling were found (Table 7). The elongation of shoots of clone J21 was more intense compared to that of clone J13. The development of new shoots was similar regardless of the clone. Microplants derived from NFs and STs produced shoots in the same number and of similar length. Only in the first measurement was a significantly more intense elongation of shoots of plants originating from an ST explant observed.

This phenomenon disappeared in later stages. A great influence of plant cooling was observed; plantlets not subjected to cooling were characterised by significantly better growth compared to cooled plantlets (Table 7).

**Table 6.** Acclimatisation of Japanese hascap microplants obtained from different explants and growth conditions.

Clone	Explant Type	Treatment	Number of Dead Plantlets [%]	Callus Size [cm]	Length of the Roots [cm]
J21	NF	Chilled	27.3 bcd <sup>1</sup>	0.3 ab	1.0 ab
		Not chilled	60.8 a	0.6 cd	0.8 b
	ST	Chilled	33.3 bc	0.3 a	1.0 a
		Not chilled	18.9 bd	0.4 ac	0.9 ab
J13	NF	Chilled	6.3 b	0.8 c	0.0 bc
		Not chilled	35.7 acd	0.8 c	0.0 bc
	ST	Chilled	29.2 bc	0.0 b	1.0 a
		Not chilled	27.3 bcd	0.0 b	1.0 a
SL <sup>2</sup>			nc	***	***
$SL_{int}$ <sup>3</sup>			nc <sup>4</sup>	***	***
J21	-	-	36.5 b	0.4 a	1.0 b
J13	-	-	21.7 a	0.4 a	0.5 a
SL			nc	ns	***
-	NF	-	35.5 b	0.6 b	0.6 a
-	ST	-	28.0 a	0.2 a	1.1 b
SL			nc	***	***
-	-	Chilled	25.6 a	0.4 a	0.8 a
-	-	Not chilled	39.5 b	0.4 a	0.8 a
SL			nc	ns	ns

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . <sup>2</sup> SL—level of significance of differences among variables: ns—not significant, \*\*\*— $p < 0.001$ . <sup>3</sup>  $SL_{int}$ —level of significance for interaction: clone x type of expl. <sup>4</sup> nc (not calculated)—the test on the difference between two proportions (used in the case of data presented as percentages) does not enable calculation of SL and F values.



**Figure 4.** Acclimatization of Japanese hascap clones in controlled environment (A), initially acclimatized plantlets grown in shade in pots (B), fully acclimatized micropropagated plants in nursery (C).

**Table 7.** Subsequent effect of the type of explant used during rooting and cooling on the growth of acclimated plantlets of Japanese hascap.

Clone	Plantlet Type	Treatment	23 May 2023			6 June 2023			22 June 2023		
			Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots	Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots	Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots
J21	NF	Chilled	4.8 a <sup>1</sup>	5.3 a	1.1 c	13.5 bc	14.2 b	1.1 ab	21.2 ac	22.2 bc	1.1 ab
		Not chilled	8.9 cd	10.4 c	1.3 b	15.5 cd	17.9 c	1.3 c	23.1 cd	26.7 d	1.3 c
	ST	Chilled	5.6 ab	5.6 a	1.0 a	13.0 b	13.0 ab	1.0 a	19.4 ab	19.4 ab	1.0 a
		Not chilled	9.6 d	9.9 c	1.0 ac	16.5 d	16.9 c	1.0 ab	25.6 d	26.2 d	1.0 ab
J13	NF	Chilled	4.5 a	4.7 a	1.1 ac	11.9 ab	12.7 ab	1.1 ab	19.6 abc	20.8 abc	1.1 ab
		Not chilled	7.2 cd	7.9 b	1.2 bc	13.4 bc	15.4 bc	1.2 bc	21.3 ac	24.4 cd	1.2 bc
	ST	Chilled	4.9 a	5.0 a	1.0 ac	11.1 a	11.5 a	1.0 ab	17.3 b	18.0 a	1.0 bc
		Not chilled	4.0 a	5.0 a	1.0 ac	11.1 a	11.7 ab	1.0 ab	18.3 ab	18.4 ab	1.0 bc
SL <sup>2</sup>		***	***	***	***	***	***	***	***	***	
SL <sub>int</sub> <sup>3</sup>		**	**	**	ns	ns	**	ns	ns	*	
J21	-	-	6.9 b	7.4 b	1.1 a	14.4 b	15.1 b	1.1 a	22.0 b	23.0 b	1.1 a
J13	-	-	5.2 a	5.5 a	1.1 a	11.9 a	12.7 a	1.1 a	18.9 a	20.1 a	1.1 a
SL			***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns
-	NF	-	5.6 a	6.2 a	1.1 a	13.0 a	13.9 a	1.1 a	20.1 a	21.4 a	1.1 a
-	ST	-	6.8 b	7.0 a	1.0 a	13.9 a	14.5 a	1.0 a	21.5 a	22.4 a	1.0 a
SL			**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
-	-	Chilled	5.1 a	5.3 a	1.0 b	12.5 a	12.9 a	1.0 a	19.4 a	20.0 a	1.0 a
-	-	Not chilled	8.2 b	8.9 b	1.1 a	15.0 b	16.2 b	1.1 b	23.1 b	25.0 b	1.1 b
SL			***	***	**	***	***	**	***	***	**

<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences among means at  $\alpha < 0.05$ . <sup>2</sup> SL—level of significance: ns—not significant, \*\*\*— $p < 0.001$ , \*\*— $p < 0.01$ , \*— $p < 0.05$ . <sup>3</sup> SL<sub>int</sub>—level of significance for interaction: clone x (type of expl x treatment).

A clone-specific reaction of previously used explants (NFs or STs) to cold storage was found in the case of plantlet growth (SL<sub>int</sub>—\*\*), especially in the first weeks of acclimatisation. Microplants of clones J21 and J13 derived from NFs grew significantly better if they were not subjected to cooling. Plants of both clones originating from NFs responded to cooling by weakened shoot elongation in the first week of acclimation. The effect of cooling on shoot proliferation was not significant after the first week, except for plants of the J21 clone obtained from NFs. In this case, cooling weakened the development of side shoots during acclimation until the end of this study (Table 7).

#### 4. Discussion

As there is no information about the micropropagation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, one should rely on information on the reproduction of other species from the *Lonicera* group. Some researchers have emphasised that the plant genotype, the type of explant, the composition of the nutrient medium and the conditions of the culture play crucial roles in the development of in vitro cultures and in optimisation of plant micropropagation techniques [31–33]. According to scientific reports [20,24,30,34,35] about in vitro propagation of species from the *Lonicera* genus, the main medium used for propagation is MS medium, sometimes diluted to 75%. In our study, distinct differences in growth and development of studied clones of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* during the proliferation and rooting stages were found (Tables 2–5). The differences between clones were more distinctive in the acclimatisation stage. Acclimatised plantlets of the J21 clone grew more intensely than the J13 ones (with better elongation of shoots and roots) (Table 6). However, significantly more J21 plants than J13 plants did not withstand the acclimatisation and died. A similar reaction was observed in the study of Dzedzic 2008, in which the *L. caerulea* var.

*kamtschatica* cultivar ‘Czelabinka’ developed longer shoots and rooting in comparison to the ‘Duet’ cultivar.

The choice of explant may influence the growth of the micropropagated plant. Litwińczuk et al. [36], observed that proliferation and rooting of shoots was better when single-node explants instead of several-node explants and ST explants were used during micropropagation on *Morus bombycis*. Since there is no available information on the micropropagation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, it is advisable to refer to information regarding the reproduction methods of other species within the *Lonicera* group. In the study of Fira et al. 2014 in micropropagation of *L. caerulea* var. *kamtschatica*, the use of different types of explants had different effects on growth and proliferation; the use of explants with 3–5 nodes gave the best results. A similar effect was observed in the study of Karhu 1997, in which shoot proliferation of *L. caerulea* and *L. var. edulis* was different depending on the type of explant. Krupa-Mańkiewicz et al. 2017 found that the use of four-node explants increased the length and number of roots at the acclimatisation stage. The type of explant used influenced the growth and development of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* cultures in the proliferation and rooting stages as well as the subsequent growth of obtained plantlets during acclimatisation (Tables 2–7). NF cultures of both clones showed better physiological conditions and growth during the proliferation and rooting stages compared to ST cultures. The differences may result from anatomical and morphological differences, and may also be related to the topophysis phenomenon. For Japanese hascap micropropagation, NF explants are recommended due to their longer shoots and improved rooting.

Cytokinins are the most important growth regulators during the culture proliferation stage. The most commonly used cytokinin is 6-benzaminpurine (BA) due to its relatively low price and effectiveness. The most frequently used cytokinin for micropropagation of *Lonicera* species is BA, but BA is also used in combination with kinetin, or auxins such as IBA, IAA or 2,4-D [25,37–40]. According to Islam et al. [41] and Roy [42], there are significant differences in the growth and number of shoots depending on the BA concentration and explant used. The emergence of new cytokinins on the market, such as meta-topolin (mT) [43–45], may open up new possibilities for micropropagation. Scientific reports [46–48] have indicated a beneficial effect of mT, as the use of this growth regulator increased the rate of shoot multiplication of *Dioscorea pentaphylla*, allowed better rooting of *Cryptomeria japonica* and *Paphiopedilum villosum* shoots and reduced apical necrosis of *Harapagophytum procumbens*. Various responses to mT within the same species and cultivar can be observed in the case of micropropagation of *Pelargonium × hortum*, *Pelargonium × hederifolium* and *Pyrus communis* [49,50]. According to Clapa et al. [51]), the use of mT allowed them to obtain longer shoots of *Humulus lupulus* L, but the multiplication rate was higher when using BA. The use of mT allowed for obtaining a larger number of microplants of *Juglans regia* compared to BA [52]. The use of 1 mg·dm<sup>-3</sup> mT during micropropagation of *L. caerulea* var. *kamtschatica* resulted in a lower proliferation rate compared to 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA [24]. The reaction to the BA or mT may vary depending on the plant species and its clone, as the reactions of species to different kinds of cytokines are different; this is a well-known phenomenon [49]. In our study, the use of BA allowed us to obtain a larger number of microplants of improved health and quality compared with application of mT (Tables 2 and 3). The use of mT, compared to BA, significantly reduced the proliferation efficiency, which had a negative impact on the number of shoots during rooting and acclimatisation. The tested clones responded differently to mT; a larger number of growing cultures could be observed in clone J21 in comparison to J13. This indicates differences in the number of growing shoots on the mT medium between different clones. Taking into account the much weaker growth and survival of cultures of clones J21 and J13 when using mT, it is recommended to use BA as the main growth substance during proliferation of Japanese hascap. The significant differences between the growth substances, in the forms of more growing explants, reduced apical necrosis and more shoots, indicate that the use of BA in the tested concentration will significantly affect future commercial propagation protocols.

The use of cold storage usually has a positive effect on the proliferation, rooting and acclimatisation of microshoots of cherry; it can increase their vitality and the proliferation rate of cultures, and prevent them from entering secondary rest [53–55]. However, the survival rate and number of shoots of cold stored plantlets of *Viburnum dentatum* and *Tetraclinis articulata* were lower in comparison to uncooled plants [56]. Cooling of in vitro cultures can be used to deliberately shorten absolute and secondary dormancy [Litwińczuk, personal inf.]. To our best knowledge, there are no scientific reports on the effect of cooling on the growth and acclimatisation of *Lonicera* micropropagated plants. In the present study, the cold storage of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* plantlets during the rooting stage for 4 weeks resulted in different effects on the two clones during acclimatisation of plantlets (Tables 6 and 7). The use of cooling increased the number of dead plantlets derived from ST explants compared to NF explants. The survival rate of cooled plantlets of the J13 clone, was much higher than that of J21 (Table 7). This confirms the assumption that the use of cooling may vary depending on the plant species or variety. However, cooled microplants of both clones were significantly reduced in length compared to uncooled plantlets. Smaller shoot sizes may make them easier to grow, pack and transport. Given that cooling did not reduce the root length, it can be successfully used to increase the survival rate and reduce the length of the J21 and J13 clones. Different reactions may result from different temperature needs of different genotypes. The use of cooling in acclimatisation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* clones could be applicable when the height of plantlets is not important but obtaining a larger number of growing plantlets is a priority.

In the present study, for each clone, the physiological responses were different depending on the type of explant used, the cytokinin and the use of cooling. During the proliferation stage, the use of  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  of BA, unlike mT, allowed for a much greater number and length of explants. As in the case of other plants of the *Lonicera* genus, the use of BA allows for satisfactory growth and development of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* clones. Significantly more J21 cultures on mT medium began to grow compared to the J13 clone on a medium supplemented with the same cytokinin. At the rooting stage, clone J13 rooted significantly better from ST-derived plantlets; the opposite reaction can be observed for the J21 clone, which rooted significantly better with NF-derived plantlets. The use of cooling significantly increased the number of dead rooted shoots of J21 compared to J13 during acclimatisation. Chilling the plantlets of J13 proved advantageous for their survival rate when compared to those left uncooled, thereby enhancing the overall process of acclimatisation.

## 5. Conclusions

The results obtained in this experiment clearly indicate the direct influence of the type of explant and cytokinin on three stages of reproduction of Japanese hascap. It is recommended to use NF explants in micropropagation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* due to the favourable reaction at all stages of the experiment. If it is crucial for the acclimatised plants to have longer roots, using ST explants for propagation can be advantageous. The use of BA cytokinin will allow for a larger number of growing cultures. The lack of apical necrosis at the proliferation stage using mT indicates the possibility of using it to reduce this phenomenon in *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* propagation. For micropropagation of Japanese hascap, it is not recommended to use mT cytokinin due to the significant reduction in the number of growing explants and their shorter length at the proliferation stage, which had a negative impact on the rooting and acclimatisation stage. Cold storage of rooted microshoots may be used before the acclimatisation stage due to improved survival of plants and reduced length of shoots. Overall, for micropropagation of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, similarly to the micropropagation of other plants from *Lonicera*, it is recommended to use NF explants and BA cytokinins. During proliferation, cytokinin mT and ST explants were more beneficial for J21. A much more beneficial effect of cooling on the survival of plantlets of J13 was observed. In future studies on in vitro cultures of *L. caerulea* var. *emphyllocalyx*, BA can be used as the main growth substance and NFs as the main

propagation material. Further studies should be conducted on the effect of low-temperature storage on the growth and physiology of the studied plants. Selected clones evaluated in vitro micropropagation may find application in terms of mechanical harvesting due to the structure of the bushes and low fruit drop rate of the plant. Future studies should be directed toward mechanical harvesting. The development of micropropagation technology should improve breeding work and implementation in cultivation thanks to the rapid multiplication of planting material.

**Author Contributions:** Conceptualisation, O.B. and W.L.; methodology, O.B., J.G. and W.L.; software, O.B. and W.L.; validation, O.B., J.G. and W.L.; formal analysis, O.B. and W.L.; investigation, O.B., J.G. and W.L.; data curation, O.B. and W.L.; writing—original draft preparation, O.B., J.G. and W.L.; writing—review and editing, O.B., J.G. and W.L.; funding acquisition, O.B. and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A

**Table A1.** F test values for the measured parameters during the proliferation stage.

	Number of Short Shoots (3–9 mm) [psc]	Number of Long Shoots (>10 mm) [pcs]	Total Number of Shoots [pcs]	Length of the Longest Shoot [cm]	Total Length of Shoots [cm]	Callus Size [cm]	Number of Explants Which Started to Grow [%]	Number of Cultures with Apical Necrosis [%]
F	1.69	10.18	5.87	5.17	8.54	2.04	12.39	1.50

**Table A2.** F test values for the measured parameters during the rooting stage.

	Number of Short Shoots (3–9 mm) [psc]	Number of Long Shoots (>10 mm) [pcs]	Total Number of Shoots [pcs]	Length of the Longest Shoot [cm]	Number of Rooted Explants [%]	Average Length of Roots [cm]	Number of Cultures with Apical Necrosis [%]
F	0.56	0.57	0.57	0.57	3.80	0.27	1.52

**Table A3.** F test values for the measured parameters during the acclimatisation stage.

	23 May 2023			6 June 2023			22 June 2023			Callus Size [cm]	Length of the Roots [cm]	
	Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots	Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots	Length of the First Shoot	Total Length of Shoots	Number of Developed Shoots			
F	13.50	12.07	3.49	6.16	5.66	3.49	6.33	5.98	3.49	5.20	10.25	10.59

## References

- Gawroński, J.; Hortyński, J.; Kaczmarska, E.; Dyduch-Siemieńska, M.; Marecki, W.; Witorożec, A. Evaluation of phenotypic and genotypic diversity of some Polish and Russian blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars and clones. *Acta Sci. Pol.* **2014**, *13*, 157–169.
- Kula, M.; Krauze-Baranowska, M. Jagoda kamczacka (*Lonicera caerulea* L.): Aktualny stan badań fitochemicznych i aktywności biologicznej. *Post Fitoter* **2016**, *17*, 111–118.

3. Phartyal, S.S.; Kondo, T.; Hoshino, Y.; Baskin, C.C.; Baskin, J.M. Morphological dormancy in seeds of the autumn-germinating shrub *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* (Caprifoliaceae). *Plant Species Biol.* **2009**, *24*, 20–26. [[CrossRef](#)]
4. Thompson, M.M.; Barney, D.L. Evaluation and breeding of haskap in North America. *J. Am. Pomol. Soc.* **2007**, *1*, 25.
5. Pooja, H.M.; Vasundhara, M.; Diwakar, Y.; Sreeramu, B.S.; Harisha, H.; Rajshekar, R. Standardization of length of cuttings for vegetative propagation of Japanese honeysuckle (*Lonicera japonica*). *Asian J. Hortic.* **2013**, *8*, 21–23.
6. Wang, H.; Yang, Y.; Sun, Y.; Wang, L.; Deng, Q. Study on the Cutting Propagation of *Lonicera cuminata* and *Lonicera macranthoides*. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *237*, 052038. [[CrossRef](#)]
7. Hui, J.X.; Wen, S.C.; Hua, Z.Y.; Ming, L.X. Comparative study on different methods for *Lonicera japonica* Thunb. micropropagation and acclimatization. *J. Med. Plant Res.* **2012**, *6*, 4389–4393.
8. Sedlac, J.; Paprstein, F. In Vitro propagation of blue honeysuckle. *Hortic. Sci.* **2007**, *34*, 746–750.
9. Kumar, N.; Reddy, M.P. In Vitro plant propagation: A review. *J. For. Sci.* **2011**, *27*, 61–72.
10. Zapolsky, Y.S.; Medvedeva, T.V.; Natalchuk, T.A.; Bublyk, M.O. Propagation of edible honeysuckle (*Lonicera edulis* Turcz) in in vitro conditions. *Agric. Sci. Pract.* **2018**, *5*, 18–26. [[CrossRef](#)]
11. Kim, S.H.; Zebro, M.; Jang, D.C.; Sim, J.E.; Park, H.K.; Kim, K.Y.; Bae, H.M.; Tilahun, S.; Park, S.M. Optimization of Plant Growth Regulators for In Vitro Mass Propagation of a Disease-Free ‘Shine Muscat’ Grapevine Cultivar. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 7721–7733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hazra, S.; Kulkarni, A.V.; Nalawade, S.M.; Banerjee, A.K.; Agrawal, D.C.; Krishnamurthy, K.V. Influence of Explants, Genotypes and Culture Vessels on Sprouting and Proliferation of Pre-Existing Meristems of Cotton (*Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium arboreum* L.). *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* **2000**, *36*, 505–510. [[CrossRef](#)]
13. Monticelli, S.; Gentile, A.; Frattarelli, A.; Caboni, E. Effects of the natural cytokinin meta-Topolin on in vitro shoot proliferation and acclimatization of *Prunus* spp. *Acta Hortic.* **2017**, *11*, 375–380. [[CrossRef](#)]
14. Hakim, J.L.; Salimunthe, A. Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: A comprehensive review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2022**, *1115*, 012051.
15. Podwyszynska, M.; Cieślińska, M. Rooting shoots of apple varieties and their tetraploids obtained by the in vitro technique. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2018**, *17*, 49–62. [[CrossRef](#)]
16. Gentile, A.; Frattarelli, A.; Nota, P.; Condello, E.; Caboni, E. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* **2017**, *128*, 693–703. [[CrossRef](#)]
17. Kucharska, D.; Orlikowska, T.; Maciorowski, M.; Kunka, M.; Wójcik, D.; Pluta, S. Application of meta-Topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109529. [[CrossRef](#)]
18. Nacheva, L.; Gercheva, P.; Ivanova, V.; Ibrahim, O. Meta-topolin improves lateral bud proliferation in micropropagation of *Ginkgo biloba* L. *Acta Hortic.* **2017**, *1155*, 355–360. [[CrossRef](#)]
19. Cambecèdes, J.; Duron, M.; Decourtye, L. Adventitious bud regeneration from leaf explants of the shrubby ornamental honeysuckle, *Lonicera nitida* Wils cv. Maigrün: Effects of thidiazuron and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Rep.* **1991**, *10*, 471–474. [[CrossRef](#)]
20. Ochatt, S.J. Requirements for plant regeneration from protoplasts of the shrubby ornamental honeysuckle, *Lonicera nitida* cv. Maigrün. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1991**, *25*, 161–167. [[CrossRef](#)]
21. Karhu, S.T. Axillary shoot proliferation of blue honeysuckle. *Plant Cell Tiss. Org.* **1997**, *48*, 195–201. [[CrossRef](#)]
22. Georges, D.; Chenieux, J.C.; Ochatt, S.J. Plant regeneration from aged-callus of the woody ornamental species *Lonicera japonica* cv. Hall’s Prolific. *Plant Cell Rep.* **1993**, *13*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Purohit, S.D.; Teixeira da Silva, J.A.; Habibi, N. Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies. *Int. J. Plant Dev. Biol.* **2011**, *5*, 1–36.
24. Fira, A.I.; Clapa, D.; Cristea, V.; Plopa, C. In Vitro propagation of *Lonicera kamtschatica*. *Agric. Sci. Pract.* **2014**, *1–2*, 89–90.
25. Kadhim, Z.K.; Al-Shareefi, M.J.; Lateef, S.M. Effect of growth regulators on in vitro micropropagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Res. Crops* **2019**, *20*, 635–641.
26. Janeiro, L.V.; Vieitez, A.M.; Ballester, A. Cold storage of in vitro cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Ann. Des. Sci. For.* **1995**, *52*, 287–293. [[CrossRef](#)]
27. Orlikowska, T. Effect of in vitro storage at 4 °C on surviving and proliferation of apple rootstocks. *Acta Hortic.* **1991**, *289*, 251–254. [[CrossRef](#)]
28. Murashige, T.; Skoog, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
29. McCown, B.H.; Sellmer, J.C. General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. In *Cell and Tissue Culture in Forestry: General Principles and Biotechnology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1987; pp. 4–16.
30. Dzedzic, E. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Pojark.) in in vitro culture. *J. Fruit. Ornament. Plant Res.* **2008**, *16*, 93–100.
31. Vysotskiy, V.A. Biotechnological techniques in modern gardening. *Hortic. Vitic.* **2006**, *2*, 2–3.
32. Svarcova, I.; Heinrich, J.; Valentova, K. Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea*. *Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc* **2007**, *151*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Skoog, F.; Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. *Biol. Action Growth Subst. Symp. Soc. Exp. Biol.* **1957**, *11*, 118–131.

34. Krupa-Malkiewicz, M.; Ochmian, I.; Smoli, M.; Ostrowska, K.M. Comparison of propagation method in in vitro and in vivo condition of *Lonicera caerulea* L. *Folia Pomeranae Univ. Technol. Stetinensis. Agric. Aliment. Piscaria Zootech.* **2017**, *42*, 334. [[CrossRef](#)]
35. Krupa-Malkiewicz, M.; Ochmian, I. Propagation of Blue Honeysuckles (*Lonicera caerulea* L.) in in vitro culture. *J. Basic Appl. Sci.* **2014**, *10*, 164. [[CrossRef](#)]
36. Litwińczuk, W.; Jacek, B. Micropropagation of mountain mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) ‘kenmochi’ on cytokinin-free medium. *Plants* **2020**, *9*, 1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, Q.; Liang, Q.; Xia, X.; Yin, W. In vitro culture and plant regeneration from sprouting buds of *Lonicera edulis*. *J. Beijing For. Univ.* **2010**, *32*, 126–130.
38. Mihaljević, I.; Tomaš, V.; Vuković, D.; Dugalić, K. Propagation of three Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) cultivars in in vitro culture. *Pomol. Croat. Glas. Hrvat. Agron. Druš.* **2019**, *23*, 41–48. [[CrossRef](#)]
39. Liu, Y.; Zhan, Y.; Fu, Q.; Li, S.; Sun, X.; Wang, Y.; Yu, M.; Qin, D.; Huo, J.; Zhu, C. Plant regeneration via somatic embryogenesis and indirect organogenesis in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Horticulturae* **2023**, *9*, 996. [[CrossRef](#)]
40. Góraj-Koniarska, J.; Gabryszewska, E. *Effect of Tissue Culture Conditions on the Growth of Lonicera caerulea L. var. kamtschatica*; Research Institute of Horticulture: Skierniewice, Poland, 2018.
41. Islam, A.T.; Islam, M.M.; Alam, M.F. Rapid in vitro clonal propagation of herbal spice, *Mentha piperita* L. using shoot tip and nodal explants. *Res. Plant Sci.* **2017**, *5*, 43–50.
42. Roy, P.K. Rapid multiplication of *Boerhaavia diffusa* L. through in vitro culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* **2008**, *18*, 49–56. [[CrossRef](#)]
43. Gentile, A.; Gutiérrez, J.M.; Martínez, J.; Frattarelli, A.; Nota, P.; Caboni, E. Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in Prunus rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2014**, *118*, 373–381. [[CrossRef](#)]
44. Rathore, J.S.; Rathore, V.; Shekhawat, N.S.; Singh, R.P.; Liler, G.; Phulwaria, M.; Dagla, H.R. Micropropagation of woody plants. In *Plant Biotechnology and Molecular Markers*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2004; pp. 195–205.
45. Manokari, M.; Mahesh, K.B.; Cokulraj, M.; Dulam, S.; Abhijit, D.; Vijay, K.; Mohammad, F.; Abdulrahman, A.; Alatar, R.; Kumar, S.; et al. Validation of meta-Topolin in organogenesis, improved morpho-physio-chemical responses, and clonal fidelity analysis in *Dioscorea pentaphylla* L.—An underutilized yam species. *S. Afr. J. Bot.* **2022**, *145*, 284–292.
46. Rojas-Vargas, A.; Itziar, A.M.; Paloma, M. Adult Trees *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D. Don Micropropagation: Factors Involved in the Success of the Process. *Forests* **2023**, *14*, 743. [[CrossRef](#)]
47. Reem, V.D.; Meera, C.D.; Alvareen, M.; Suman, K. Efficient utilization of phytohormones for the in vitro proliferation of *Paphiopedilum villosum* Lindl. Stein—A Lady’s Slipper orchid. *S. Afr. J. Bot.* **2023**, *154*, 387–393.
48. Bairu, M.W.; Jain, N.; Stirk, W.A.; Doležal, K.; Van Staden, J. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *S. Afr. J. Bot.* **2009**, *7*, 122–127. [[CrossRef](#)]
49. Wojtania, A. Effect of meta-topolin in vitro propagation of *Pelargonium × hortorum* and *Pelargonium × hederifolium* cultivars. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2010**, *79*, 101–106. [[CrossRef](#)]
50. Lotfi, M.; Bayoudh, C.; Werbrouck, S.; Mars, M. Effects of meta-topolin derivatives and temporary immersion on hyperhydricity and in vitro shoot proliferation in *Pyrus communis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2020**, *143*, 499–505. [[CrossRef](#)]
51. Clapa, D.; Hârța, M. Establishment of an Efficient Micropropagation System for *Humulus lupulus* L. cv. Cascade and Confirmation of Genetic Uniformity of the Regenerated Plants through DNA Markers. *Agronomy* **2021**, *11*, 2268. [[CrossRef](#)]
52. Nacheva, L.; Gandev, S.I. Could meta-Topoline improve the multiplication and rooting of micropropagated walnut plants?—A case study with ‘Lara’ (*Juglans regia* L.). *Acta Hort.* **2023**, *1359*, 87–94. [[CrossRef](#)]
53. Osburn, L.D.; Yang, X.; Li, Y.; Cheng, Z.M. Micropropagation of Japanese honeysuckle (*Lonicera japonica*) and Amur honeysuckle (*L. maackii*) by shoot tip culture. *J. Environ. Hort.* **2009**, *27*, 195–199.
54. Bite, A.; Petrevice, L. The Influence of Short-Term Cold Storage on the Cherry Microshoot Proliferation. *Inl Int. Symp. Acclim. Establ. Micropropagated Plants* **2001**, *616*, 327–330.
55. Szczerba, J.; Gorzelany, J.; Litwinczuk, W. Badania zmienności cech użytkowych wisni rozmnażanych metoda in vitro rosnących w sadzie w Albigowej. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. W Krakowie. Ses. Nauk.* **1997**, *50*, 429–432.
56. Hatzilazarou, S.; Kostas, S.; Joachim, M.; Economou, A. Regeneration of *Viburnum dentatum* L. from alginate-encapsulated shoot explants after short-term cold storage and assessment of genetic stability using ISSR analysis. *Agronomy* **2020**, *10*, 1660. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

Oskar Basara  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.2025  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Gorzelany, J. (2025). Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. *Sustainability*, 17, 2820 (*autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony*) mój udział polegał na konceptualizacji, określeniu metodologii, obsłudze programów niezbędnych do uzyskania wyników, analizie wyników, przeglądzie literatury, zarządzaniu danymi, pisaniu oryginalnej wersji manuskryptu, recenzji oraz edycji manuskryptu, a także administracji projektu (*opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.*)

  
.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

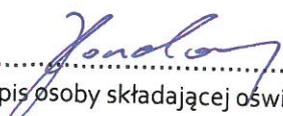
**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

Prof. dr hab. inż. Józef Gorzelany  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.2025  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Gorzelany, J. (2025). Impact of Ozone Exposure on Chlorophyll Fluorescence, Pigment Content and Leaf Gas Exchange on *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* and *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. *Sustainability*, 17, 2820 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na konceptualizacji, określeniu metodologii, udostępnieniu aparatów pomiarowych niezbędnych do uzyskania wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu, administracji projektu, a także pozyskiwaniu środków (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

  
.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Oskar Basara  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.2025  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. *Molecules*, 29, 3616. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na konceptualizacji, ustalaniu metodologii, formalnej analizie, pisaniu, edycji oraz recenzji manuskryptu, wizualizacji i administracji projektu (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

*Oskar Basara*

.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

Prof. dr hab. inż. Józef Gorzelany  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.25  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Selected Chemical and Morphological Properties of *Lonicera* var. *kamtschatica* and *Lonicera* var. *emphyllocalyx* Treated with Gaseous Ozone. *Molecules*, 29, 3616. (*autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony*) mój udział polegał na administracji, konceptualizacji, określaniu metodologii, recenzji oraz edycji manuskryptu, a także pozyskiwanie funduszy (*opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.*)

.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

Oskar Basara  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.2025  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam że w pracy Basara, O., Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of *Lonicera caerulea* L. Fruits Using Machine Learning. *Agricultural Engineering*, 29, 97-114 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na konceptualizacji, ustalaniu metodologii, obsłudze programów do obróbki pozyskanych danych, zarządzaniu danymi, pisaniu oryginalnej wersji, edycja oraz recenzja manuskryptu, wizualizacja oraz administracja projektu (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)



.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

dr hab. inż. Katarzyna Pentoś  
(Imię i nazwisko autora)

.....Wrocław 20.10.2025.....  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of Lonicera caerulea L. Fruits Using Machine Learning. Agricultural Engineering, 29, 97-114 (*autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony*) mój udział polegał na opracowaniu modeli uczenia maszynowego, ocenie ich jakości oraz częściowym przygotowaniu manuskryptu w zakresie dotyczącym uczenia maszynowego (*opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.*)



.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

Prof. dr hab. inż. Józef Gorzelany  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 06.11.2025  
(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**  
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam że w pracy Basara, O., Pentoś, K., Gorzelany, J. (2025). Investigating the Effect of Ozonation on the Mechanical Parameters of *Lonicera caerulea* L. Fruits Using Machine Learning. Agricultural Engineering, 29, 97-114 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na konceptualizacji, administracji projektu, pisaniu oryginalnej wersji manuskryptu oraz pozyskiwaniu funduszy (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

  
.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

**Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.**

**Oskar Basara**

(Imię i nazwisko autora)

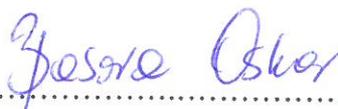
Rzeszów, 06.11.2025

(miejsowość i data)

**OŚWIADCZENIE**

o merytorycznym wkładzie współautora

W pracy Basara, O., Litwińczuk. W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.) Appl. Sci.14, 9452. *autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony*) mój udział polegał na konceptualizacji, przeglądzie literatury, pracy laboratoryjnej podczas każdego etapu mikrorozmnażania, konceptualizacji, ustalaniu metodologii, formalnej analizie, zarządzaniu danymi, pisaniu, edycji oraz recenzji manuskryptu (*opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.*)



.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

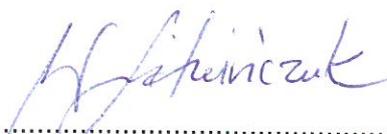
dr hab. inż., prof UR Wojciech Litwińczuk  
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 22 października 2025 r.  
(miejsowość i data)

### OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Basara, O., Litwińczuk. W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.) Appl. Sci.14, 9452. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na **udostępnienie laboratorium kultur *in vitro*, pomoc w sformułowaniu koncepcji doświadczenia i założeń metodycznych oraz w analizach statystycznych, sformułowanie uwag do końcowej wersji manuskryptu** (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)



.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

**Prof. dr hab. inż. Józef Gorzelany**

(Imię i nazwisko autora)

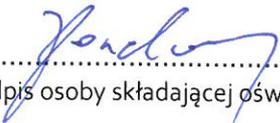
Rzeszów, 06.11.25

(miejsowość i data)

### OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

W pracy Basara, O., Litwińczuk. W., Gorzelany, J. (2024). Assessment of Micropropagation Possibilities for Japanese Hascap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* L.) Appl. Sci.14, 9452. *autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony*) mój udział polegał na ustalaniu metodologii, walidacji, pisaniu, edycji oraz recenzji manuskryptu oraz pozyskiwaniu środków(*opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.*)

  
.....  
(podpis osoby składającej oświadczenie)