

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет ТВШТСБ**

**Кафедра біотехнології та біоінженерії**

**Спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»**

**Ступінь вищої освіти «Бакалавр»**

«Допустити до захисту»

«Рекомендувати до захисту»

Декан \_\_\_\_\_ Михайло ГИЛЬ

В.о. зав. кафедри \_\_\_\_\_ Олена КАРАТЄЄВА

“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО  
РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ  
В УМОВАХ ФГ «АГРОЛАЙФ»  
04.02. – КР.67-О.24 0520.018**

**Виконавець:**

здобувачка вищої

освіти IV курсу \_\_\_\_\_ Наталія ІЛЬНИЦЬКА

**Наукові керівники:**

доцентка \_\_\_\_\_ Олена ЮЛЕВИЧ

асистентка \_\_\_\_\_ Ірина ЛЮТА

**Рецензент:**

доцент \_\_\_\_\_ Євген БАРКАРЬ

**Миколаїв – 2024**

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Основні принципи клонального мікророзмноження рослин	7
1.2. Мікроклональне розмноження суниці – перспективний метод сучасного розсадництва	12
1.3. Застосування методів біотехнології для мікророзмноження і отримання оздоровленого посадкового матеріалу суниці	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	
2.1. Місце та об’єкт дослідження	19
2.2. Методика виконання роботи	21
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
3.1. Удосконалення етапів клонального мікророзмноження сортів суниці садової та оцінка їхнього потенціалу розмноження в умовах <i>in vitro</i>	24
3.2. Визначення оптимальної концентрації фітогормону 6-БАП в живильному середовищі для отримання максимальної кількості регенератів та рослин, придатних для укорінення	27
3.3. Вплив регуляторів росту на вусоутворюючу здатність та продуктивність суниці садової	30
3.4. Культивування апексів вусів та фрагментів листка суниці садової в умовах <i>in vitro</i>	34
3.5. Порівняльний аналіз харчової цінності та хімічного складу суниці, вирощеної в умовах мікроклонування та у відкритому ґрунті	39
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	45
ВИСНОВКИ	48
ПРОПОЗИЦІЇ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

## РЕФЕРАТ

Тема випускної кваліфікаційної роботи: «Оптимізація процесу мікроклонального розмноження суниці садової в умовах ФГ «Агролайф». Робота виконувалась в лабораторії на базі підприємства ФГ «Агролайф».

Випускна робота виконана на 56 сторінках друкованого тексту. Вона складається з наступних розділів: переліку умовних позначень, реферат, вступ, огляд літератури, матеріал, умови і методика виконання роботи, розрахункова частина, «Охорона праці», висновки та пропозиції, список використаних джерел. Для написання випускної кваліфікаційної роботи було використано 46 літературних джерел. Робота містить 13 рисунків, 4 таблиці.

Об'єктом досліджень були рослини та ягоди суниці садової сортів Русанівка, Веселка та сорти італійської селекції Альба, Клері, Джолі.

Метою досліджень була оптимізація етапів клонального мікро-розмноження сортів суниці садової в умовах *in vitro* на базі ФГ «Агролайф».

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. визначити оптимальну концентрацію фітогормону 6-БАП в живильному середовищі для отримання максимальної кількості регенератів та рослин, придатних для укорінення;
2. дослідити вплив регуляторів росту на вусоутворюючу здатність та продуктивність суниці садової;
3. вивчити особливості культивування апексів вусів та фрагментів листка суниці садової в умовах *in vitro*;
4. провести порівняльний аналіз харчової цінності та хімічного складу суниці, вирощеної в умовах мікроклонування та у відкритому ґрунті;
5. за результатами, отриманими в ході проведених досліджень, рекомендувати введення експлантів суниці садової в культуру *in vitro* в другій декаді серпня, для покращення росту та розвитку застосовувати стимулятори росту 6-БАП (0,75 мг/мл) та Циркон (30 мкл/л).

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

**ІМК** – індолілмасляна кислота

**ІОК** – індолілоцтова кислота

**ФГ** – фермерське господарство

**МС** – середовище Мурасіге-Скуга

**6-БАП** – 6-бензиламінопурин

**БА** – 6-бензиладенін

**ІМК** – індоліл-3-масляна кислота

**in vitro** – техніка виконання експерименту у пробірці, поза живим організмом

**ex vitro** – нестерильні умови

## ВСТУП

Суниця садова (*Fragaria ananassa* Duch.) є однією з найпопулярніших ягідних культур, що пояснюється корисними властивостями ягід, високими смаковими якостями, швидким початком плодоношення та віддачею врожаю, високою пристосовуваністю до різних умов вирощування [8].

Високі смакові якості, аромат, антиоксидантна здатність, обумовлена високим рівнем антоціанів, високий вміст вітамінів та інших харчових властивостей у суниці садової зробили її найбільш споживаною ягідною культурою [10]. Область вирощування суниці значно розширилася, і ця ягода стала однією з найбільш культивованих культур у всьому світі. Площа культури, що розширюються вимагають великої кількості посадкового матеріалу суниці високої якості [14].

З кожним роком зростає попит, тому необхідна велика кількість посадкового матеріалу, водночас промислове вирощування суниці садової пов'язане з низкою труднощів в основному пов'язаних з високим рівнем схильності до грибних, вірусних і мікоплазмових захворювань [21]. В даний час одним з основних методів отримання великої кількості здорового генетично однорідного матеріалу є мікроклональне розмноження, до переваг якого відносяться: можливість отримання безвірусного посадкового матеріалу, тривале (протягом 1-3 років) збереження рослин за умов *in vitro*, а також висока економічна ефективність методу [27, 29].

Обов'язковою умовою клонального мікророзмноження є використання матеріалу, що повністю зберігає генетичну стабільність на всіх етапах процесу, від експланту до рослин у полі. Ці вимоги забезпечують апекси та пазушні бруньки органів стеблового походження, тобто меристематичні тканини. Однак морфогенетичний потенціал культивованих тканин багато в чому залежить від генотипу та умов культивування. Тому, розробка ефективної та відтворюваної системи регенерації рослин в умовах *in vitro* для клонального мікророзмноження сортів суниці садової, адаптованих до

біотичних та абіотичних факторів середовища, є актуальним напрямом [33].

Застосування методу клонального мікророзмноження *in vitro* разом із методами оздоровлення рослин забезпечує альтернативну можливість збільшення виробництва посадкового матеріалу суниці, вільного від шкідливих організмів [3, 39].

В основі мікроклонального розмноження рослин лежить здатність до відновлення окремих органів, частин і навіть окремих клітин. Активно діляться клітини розташовані в недиференційованій тканині апікальних меристем, меристем пазушних бруньок стебла та ін. Утворення тканин меристеми можна індукувати в умовах *in vitro* [20].

У процесі клонального мікророзмноження рослин використовують ряд регуляторів росту [15], які можуть бути як природного, так і штучного походження. Одним з широко застосовуваних регуляторів росту є 6-БАП (6-бензиламінопурин). Він виявляє високу активність у підтримці росту рослин та індукування органогенезу [6].

Загалом методика клонального мікророзмноження суниці садової *in vitro* досить відпрацьована і використовується вже багато років [6-13]. Незважаючи на це, потрібне постійне вдосконалення технології, пов'язане з змінним сортиментом суниці садової, генотипічні особливості яких при вирощуванні в умовах *in vitro* ще відомі. Крім того, змінюється, склад мікробних груп, кліматичні умови [2].

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Основні принципи клонального мікророзмноження рослин

Існує два способи розмноження рослин: статевий (насі́нневий) та вегетативний. Ці способи мають свої переваги та недоліки. До недоліків насінневого розмноження слід віднести генетичну різноманітність одержуваного посадкового матеріалу та тривалість ювенільного періоду. При вегетативному розмноженні зберігається генотип материнської рослини та скорочується тривалість ювенільного періоду [9].

Досягнення в галузі культури клітин та тканин призвели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження – клонального мікророзмноження.

Клональне мікророзмноження – безстатеве вегетативне розмноження рослин у культурі клітин та тканин *in vitro*, при якому виникли форми рослин генетично ідентичні вихідному екземпляру [11].

Методи клонального мікророзмноження засновані на унікальній властивості рослинних клітин: здібності під впливом екзогенних факторів давати початок новій рослині. Така властивість обумовлена тотипотентністю рослинних клітин [13].

Тотипотентність – це властивість клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання та розвиток до цілого організму. Тотипотентність рослинних клітин дає гнучкість при реалізації онтогенетичної програми, тому соматичні рослинні клітини здатні змінювати свій статус за умов *in vitro*. Під впливом різних екзогенних факторів такі клітини можуть реалізовувати різні онтогенетичні програми: органогенез, калусогенез або соматичний ембріогенез [16].

Останнім часом клітини рослин, здатні до морфогенетичних змін, називають стовбуровими клітинами за аналогією з клітинами тварин. Так,

поряд із поняттям тотипотентності вводиться поняття про плюри- та мультипотентності стовбурових клітин. Відповідно до цієї концепції в результаті поділу мультипотентних клітин формуються клітини одного чи кількох типів. Мультипотентність мають регіональні стовбурові клітини. Плюрипотентні клітини знаходяться в апікальних меристемах пагону та кореня, їх меристематична активність обмежується здатністю давати початок лише клітинам тканин кореня або пагону, причому плюрипотентні клітини не здатні утворювати соматичні ембріоїди [18].

Соматичні клітини ізольовані з інтактною рослини, під впливом індукційних сигналів стають тотипотентними і набувають здатності формувати ембріогенний калюс або безпосередньо соматичні ембріоїди. Таким чином, тотипотентні клітини – це поодинокі клітини, що реалізують шлях соматичного ембріогенезу, а плюрипотентні – шляхом органогенезу [17].

Клональне мікророзмноження рослин має такі переваги перед традиційними способами розмноження:

- генетична однорідність одержуваного посадкового матеріалу;
- оздоровлення рослин;
- високий коефіцієнт розмноження;
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- розмноження рослин, що важко розмножуються;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- можливість роботи в лабораторних умовах цілий рік та планування випуску рослин до певного терміну [22].

У розмноження рослин, одержаних розмноженням *in vitro*, існують і недоліки. Найбільш поширені з них – це слабка приживенність експлантів на етапі введення біоматеріалу в культуру *in vitro* та труднощі адаптації таких рослин до нестерильних умов (*ex vitro*) [30].

Клональне мікророзмноження суниці можна розділити на чотири основні етапи:



- Введення в культуру *in vitro* (вибір вихідних рослин; ізолювання та стерилізація експлантів; висадка на живильне середовище). Важливим моментом цього етапу є отримання стерильної культури, здатної до успішної регенерації на живильному середовищі. Ефективність етапу залежить від типу стерилізуючого агента, генотипу рослини, сезону ізоляції та фізіологічного стану експланта.

- Власне мікророзмноження шляхом стимуляції розвитку пазушних бруньок експланта. На даному етапі важливу роль відіграють генотип рослини, що розмножується, склад поживного середовища, фізичні умови культивування.

- Укорінення мікропагонів. Успішність етапу визначається сортовими особливостями, складом поживного середовища і типом ауксину.

- Адаптація мікророслин до умов *ex vitro* (перенесення рослин у субстрат в умовах вологої камери) [21, 31].

Для культивування тканин кожному з чотирьох етапів потрібно застосування певного складу живильного середовища [16].

На першому етапі необхідно домогтися отримання добре зростаючої стерильної культури. Для цього експланти піддають поверхневій стерилізації. Найчастіше як стерилізуючі агенти використовують сполуки хлору, срібла та ртуті, оскільки вони ефективно звільняють поверхню вихідного матеріалу від бактеріальної та грибною контамінації. Асептичні експланти поміщають на живильні середовища для індукції процесів регенерації [19].

Успішне введення в культуру залежить від термінів ізоляції, віку, розміру та типу експлантів, а також інтенсивності окислення поліфенолів при інокуляції на живильні середовища. Пошкодження під час поранення тканин первинних експлантів сприяє викиду поліфенолів та стимулює активність поліфенолоксидази. Внаслідок фенольного окислення утворюються токсичні речовини – хінони. Поживне середовище та тканини експланта чорніють, зрештою, це може стати причиною загибелі експлантів. Вирішити проблему фенольного окиснення дозволяє попереднє культивування експлантів у рідких

середовищах з додаванням антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота, діетилдітіокарбамат або полівінілпіролідон, а також зниження інтенсивності освітлення чи культивування у темряві. Тому необхідно враховувати сезонну динаміку накопичення фенольних з'єднань визначення термінів ізоляції експлантів [24].

На етапі масового розмноження рослин необхідно досягти отримання максимальної кількості мікроклонів, на даному етапі необхідне використання різних екзогенних регуляторів росту та розвитку (фітогормонів), враховуючи при цьому, що зі збільшенням субкультивувань збільшується кількість рослин-регенерантів зі зміненою морфологією і можна спостерігати утворення рослин мутантів [37].

Реалізація того чи іншого шляху морфогенезу у системах *in vitro* визначається співвідношенням концентрацій екзогенних регуляторів росту в живильному середовищі. Так, наприклад, відомо, що переважання цитокінінів у середовищі для регенерації сприяє прямій регенерації пагонів, а ауксинів – утворення коренів або калюсу. Додаючи цитокініни в поживні середовища, проліферація пагонів досягається або за рахунок зняття апікального домінування та розвитку пазушних бруньок, або за допомогою дедиференціації клітин експланту та формування адвентивних пагонів [9].

Дія цитокінінів лежить в основі клонального мікророзмноження рослин, оскільки вони визначають рівень розмноження, висоту пагонів, а також частоту виникнення генетичних варіацій. Крім того, успішність та ефективність проходження стадії власне мікророзмноження залежить від особливостей генотипу вихідної рослини, мінерального складу поживних середовищ, а також від впливу фізичних факторів при культивуванні (світло, температура, вологість) [22].

При визначенні оптимальних комбінацій та концентрацій екзогенних цитокінінів та ауксинів необхідно враховувати рівень біосинтезу регуляторів росту в тканинах експланту. Оскільки ендогенні ауксини та цитокініни синтезуються, відповідно, у тканинах листових примордій і верхівці кореня,

то вплив екзогенних регуляторів росту залежить від типу використовуваних експлантів. Так, для стимуляції пагоноутворення в експлантів, що не містять меристем, необхідні і ауксини, і цитокініни, тоді як проліферація верхівок мікропагонів може відбуватися без присутності екзогенних ауксинів у середовищі [28].

Мікроклони, отримані на стадії власне мікророзмноження, укорінюють у різний спосіб. В основі цих методів лежить обробка ауксинами, при чому тип та концентрація ауксину для кожного виду визначається експериментально [6].

Різогенез найчастіше стимулюють за умов *in vitro*. Регенеранти укорінюють або безпосередньо на живильному середовищі, що містить ауксини, або при культивуванні на безгормональному середовищі, після попереднього короткочасного замочування у водному розчині ауксинів. Тривалий вплив ауксинами часто викликає проліферацію калюса на базальному кінці пагону, з клітин якого згодом диференціюються коріння. Провідна система такого коріння не пов'язана з провідною системою пагону, що призводить до загибелі рослин при подальшій адаптації. При короткочасних обробках регенерантів у розчині ауксинів, виключається утворення калюсу, але коренева система, сформована в умовах *in vitro*, не функціональна, оскільки не має корневих волосків. Ця особливість може спричинити загибель рослин при переносі в умови *ex vitro* субстрат для адаптації. Імпульсна обробка ауксинами з подальшим укоріненням *ex vitro* безпосередньо у ґрунтовому субстраті або суміші торфу та піску, вирішує проблеми, пов'язані з укоріненням *in vitro* та підвищує вихід якісного посадкового матеріалу [32].

Адаптація мікроклонів до умов *ex vitro* є найбільш відповідальним етапом мікророзмноження, оскільки саме на цій стадії висока ймовірність втрати великої кількості регенерантів. Розвиток мікроклонів у культурі *in vitro* сприяє появі ряду морфологічних, анатомічних та фізіологічних аномалій, які ускладнюють переведення рослини в умови *ex vitro*. Рослинам, вирощеним в

умовах *in vitro*, властиві гетеротрофний тип харчування, низька фотосинтетична активність, обмежена здатність регулювати транспірацію, редукція кутикулярного воску, слабе диференціювання мезофілу та недостатній розвиток провідної системи [2, 45].

Таким чином, перенесення регенерантів в умови *ex vitro* пов'язане з серйозними перебудовами в морфо-анатомічній будові та фізіологічних процесах. Для успішної адаптації *ex vitro* та подолання зазначених вище обмежень, рослини переносять у ґрунт, зберігаючи температурний режим, вологість та освітлення на колишньому рівні. Потім поступово знижують вологість та одночасно підвищують інтенсивність освітлення. У деяких випадках збагачують атмосферу, в якій адаптуються рослини, вуглекислим газом, що сприяє підвищенню адаптивної здатності мікроклонів за рахунок закриття продихів і зниження випаровування води рослинами [3].

## **1.2. Мікроклональне розмноження суниці – перспективний метод сучасного розсадництва**

Сучасні технології виробництва плодів і ягід неможливі без розвитку розсадництва, що забезпечує стабільність і конкурентоспроможність галузі садівництва в цілому. Інтенсифікація садівництва передбачає розробку нових ефективних технологій і включення їх у систему виробництва оздоровленого посадкового матеріалу [44].

Метод клонального мікророзмноження найбільш повно реалізує потенціал рослинного організму до розмноження. Зростання мікроклонів у штучних контрольованих умовах дає можливість елімінувати віруси та хвороби й отримувати оздоровлений посадковий матеріал. Високий коефіцієнт розмноження регенерантів у культурі *in vitro* також є суттєвим позитивним моментом. Однак, на практиці, відтворюваність результатів низька. Сильніше, ніж при традиційних способах розмноження, проявляється реакція генотипів, суттєвіший вплив фізіологічних, гормональних і фізичних

факторів, які необхідно враховувати для успішного розмноження [42].

Основи методу розмноження суниці в культурі тканин були розроблені в 1974 році (Voxus). В даний час цей прийом включено в систему виробництва оздоровленого садівного матеріалу суниці. У світовій практиці клональне мікророзмноження суниці садової застосовується для швидкого й ефективного розмноження окремих форм і сортів із невеликої кількості вихідного матеріалу, відбору *in vitro* на ранніх стадіях розвитку, обміну рослинним матеріалом без ризику перенесення карантинних об'єктів і для оздоровлення від вірусів [8].

Первинна культура *in vitro* визначає весь подальший технологічний цикл клонального мікророзмноження рослин. Швидкість ініціації меристематичних тканин, що призводять до утворення з них цілих рослин, залежить від темпів її диференціації. У різних генотипів вона різна і визначається здатністю експлантів утворювати пазушні бруньки і бути готовими до клонування [13].

Як первинний експлант при клональному мікророзмноженні суниці використовують апікальні меристеми, які ізолюють і поміщають на поживні середовища з цитокінінами. Для стерилізації рослинного матеріалу використовують 0,1% і 0,01% розчини мертіоляту, 0,1% розчин сулеми, 12% і 30% розчини перекису водню, гіпохлорит натрію, етиловий спирт. Здатність експлантів до регенерації визначається станом материнської рослини в період ізолювання [16].

Для суниці найкращим періодом введення в культуру *in vitro* є фаза виходу рослин зі стану спокою або початок активної вегетації, коли меристема має найбільшу здатність до регенерації. У дослідженнях найбільшу життєздатність показали експланти, введені в культуру в пізньозимовий період (лютий). Висока приживлюваність меристем була зумовлена активізацією ростових процесів у розеток суниці, що вийшли зі стану спокою, після зимового зберігання. Отримано в середньому по сортах 76,5% стерильних життєздатних експлантів, придатних для подальшого клонування [9].

Ефективність клонального мікророзмноження значною мірою визначається складом поживного середовища. Для введення суниці найчастіше використовується поживне середовище Мурасіге – Скуга (Murashige-Skoog, 1962), доповнене 0,5 мг/л 6-БАП (6-бензиламінопурин). Найвищий коефіцієнт розмноження забезпечують середовища з мінеральною основою за рецептами Андерсона, Лі де Фоссарда і Мурасіге-Скуга. Чергування поживних середовищ із мінеральною основою за Бокксом і Мурасіге-Скугом дає змогу збільшити вихід укорінених рослин на першому етапі на 25% і підвищити частку адаптованих до нестерильних умов на 5% [13]. Для широкомасштабного виробництва посадкового матеріалу суниці в системі розмноження придатне живильне середовище Мурасіге-Скуга, яке вирізняється великим вмістом неорганічного азоту, що стимулює процеси органогенезу [6].

Реалізація морфо-генетичного потенціалу рослин значною мірою визначається регуляторами росту, насамперед цитокінінами. Для мікророзмноження суниці частіше використовується 6-БАП, що виявляє вищу активність у підтримці росту тканин та індукції органогенезу [15].

У суниці садової спостерігається висока сортова специфічність по відношенню до концентрації регулятора росту 6-БАП у живильному середовищі, що є відображенням ендогенного вмісту ростових речовин. Діапазон концентрацій, рекомендованих для сортів суниці, перебуває в межах 0,2...1,5 і залежить від генотипу, цілей і стадії розмноження. Використовувана концентрація 6-БАП повинна забезпечувати високий коефіцієнт розмноження, але не викликати соматичних мутацій [46].

На етапі ризогенезу суниці найбільш часто застосовуваними ауксинами є ІМК (індоліл-масляна кислота) в концентрації 0,5...1,0 мг/л і ІОК (індоліл-оцтова кислота) в концентрації 0,5...1,0 мг/л. Для укорінення використовують розбавлене вдвічі середовище Мурасіге-Скуга з повним вмістом хелату заліза і вітамінів. Зменшення вдвічі концентрації мінеральних солей у живильному середовищі знижує осмотичний тиск, що є важливим фактором для коріння,

яке росте [43].

Низка вчених вважає [16, 18, 41], що короткочасний вплив ауксину на мікропагони чинить більший стимулюючий вплив, ніж постійна його присутність у живильному середовищі.

При проведенні адаптації враховуються основні анатомічні та фізіологічні фактори, що відрізняють рослини *in vitro* від *in vivo*: слабкий розвиток провідних судин ксилеми, відсутність кутикулярного шару воску, нефункціонуючий продиховий апарат [34].

Вирощування сертифікованого посадкового матеріалу за технологією *in vitro* виробничих умов економічно вигідно. Рентабельність розсади суниці досягає 115%, що підтверджує перспективність цих прийомів для виробництва [6]. Однак, перехід до масштабної технології виробництва посадкового матеріалу суниці *in vitro* потребує вирішення низки проблем: низька регенераційна активність окремих генотипів; вітрифікація тканин; зараження бактеріями, що паразитують у рослинних тканинах; суттєві втрати на всіх етапах клонування; проблеми адаптації до умов *ex vitro*; висока собівартість оздоровлення рослин *in vitro* [36].

### **1.3. Застосування методів біотехнології для мікророзмноження та отримання оздоровленого посадкового матеріалу суниці великоплідний**

У зв'язку з розширенням виробництва плодів суниці зростає потреба у високоякісному посадковому матеріалі, вільному від вірусів, фітоплазмових патогенів та прирівнюваних до них шкідливих організмів, що значно знижують урожайність [35].

Система виробництва оздоровленого посадкового матеріалу включає наступні основні способи оздоровлення:

- термотерапія;
- хемотерапія;

- культура апікальних меристем у поєднанні з методами клонального мікророзмноження [33].

Поєднання перерахованих методів суттєво підвищує ефективність оздоровлення.

Термотерапія є одним із основних способів оздоровлення, але має деякі недоліки. Методи термотерапії не забезпечують оздоровлення рослин від термостабільних вірусів [38].

Інший спосіб оздоровлення – хіміотерапія. Для хіміотерапії використовують спеціальні речовини-інгібітори вірусів: ферменти, що впливають на нуклеїнові кислоти (РНК-ази). РНК-аза стимулює ріст та розвиток рослин з апексів та інгібує розвиток вірусів. В результаті застосування такої технології вирощування на 10-35% підвищується приживаність меристем на живильних середовищах, на 30-40% більше утворюється рослин-регенерантів [7].

Метод ізольованих апексів дозволяє звільнити культивований матеріал від термостабільних вірусів та вірусів, що знаходяться в латентному стані. Він дає можливість комплексного оздоровлення, оскільки дозволяє звільнитися з певною ймовірністю від грибних хвороб та інших патогенів [38, 40].

Встановлено високу ефективність культури апікальних меристем як методу оздоровлення рослин суниці від стеблової нематоди, суничного кліща та збудника фітофторозу. Успіх отримання здорових рослин залежить від величини ізольованого експланту та ступеня зараження вихідного матеріалу. При цьому наголошується закономірність: чим більше листових зачатків і тканин, тим легше йдуть процеси морфогенезу, які закінчуються утворенням цілої рослини. Разом з тим, при такому розвитку конусу наростання збільшується ризик швидкого транспортування вірусу провідною системою [2].

Встановлено, що при використанні експлантів розміром 200-500 мкМ оздоровлення складає 95-100%, а виживаємість 10-50%. При збільшенні розміру експланту до 1 мм приживлення збільшується до 70%, але вихід



оздоровленого матеріалу становить лише 50%. Поєднання методу ізольованих апексів з термотерапією або хемотерапією є найбільш ефективним, оскільки дозволяє збільшити вихід безвірусного матеріалу за рахунок збільшення розміру ініціального експланту за збереження високого відсотку оздоровлення [8].

Щодо термостабільних та важко елімінованих вірусів більш ефективним є поєднання культури ізольованих апексів і хемотерапії. Ефект оздоровлення досягається шляхом введення в живильну середовище різних антивірусних препаратів, які інгібують синтез вірусних частинок у клітинах рослини [11]. Найчастіше використовують препарати, синтезовані в Німеччині, а саме, (аналоги нуклеїнових та піримідинових основ), що є інгібіторами фітовірусів: L-333 (феніл-аліл-тіосечовина), ДГТ (2, 4-діоксогексагідро-1, 3, 5-тріазин), нео - ДГТ (хімічний аналог ДГТ), ААТ (аніліно-адамантил-тіадіазол) [17].

Сучасна технологія клонального мікророзмноження суниці заснована на культивуванні апікальних меристем. Меристематичні верхівки ізолюють із молодих, вільних від вірусних хвороб рослин і вирощують на живильних середовищах, що містять 6-бензиламінопурин концентрації 0,1-0,5 мг/л [16].

Регенерація пагонів з різних експлантів включає три стадії:

- 1) утворення життєздатних адвентивних бруньок на експланті;
- 2) формування пагонів із бруньок;
- 3) укорінення пагонів.

На ці процеси впливають фактори, такі як: генотип, поживний склад середовища, особливо тип фітогормонів та їх комбінація, умови вирощування та тип експланту [18].

Значний інтерес як експланти для введення в культуру *in vitro* суниці садової представляють флоральні експланти (пелюстки, пильовики та ін.), оскільки знаходяться в закритих бутонах і не піддаються зовнішнім впливам та забрудненням з боку довкілля. Вихідний матеріал зручно стерилізувати, оскільки експланти залишаються ізольованими [13].

Незважаючи на безперечну перспективність клітинних технологій, головна проблема, що виникає при практичному використанні культури ізолюваних тканин і органів у селекційному процесі, полягає в розробці ефективних прийомів надійного отримання рослин-регенерантів з експлантів різного походження. Вивченню цього питання присвячено низку робіт вітчизняних та зарубіжних авторів, що свідчить про велике значення проблеми регенерації для всієї методології культури тканини, без вирішення якої стають марними дослідження з культивування тканин та органів *in vitro* для цілей селекції [44].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

#### 2.1. Місце та об'єкт дослідження

Дослідження було проведено в умовах фермерського господарства «Агролайф». Дане господарство розташоване у Вітовському районі Миколаївської області. На базі господарства функціонує лабораторія мікроклонального розмноження рослин.

Розташування об'єкта визначалося з урахуванням міркувань, що стосуються шкідливих організмів та хвороб рослин:

- розміщення об'єкта в зоні, вільній від хвороб/шкідників, або в зоні, вільній або достатньо ізольованій від джерел певних хвороб/шкідників;
- створення навколо об'єкта буферної зони щодо специфікованих хвороб/шкідників;
- розміщення об'єкта в регіоні з низьким рівнем розповсюдження захворювань/шкідників та низьким поширенням переносників;
- виробництво здійснюється в період низької захворюваності/поширення шкідників та переносників там, де це можливо.

У господарстві реалізовані заходи для забезпечення того, щоб при виробництві мікроклонів діяли адекватні фізичні та експлуатаційні заходи захисту, що запобігають інтродукції специфічних захворювань шкідників.

У ФГ «Агролайф» особливу увагу приділяють приміщенням. При мікроклональному розмноженні дуже важливою є стерильність. Ідеальний варіант – повне оздоблення приміщення кахлем, наявність водопроводу, електрики, каналізації, опалення та вентиляції.

Одночасно в культурі в лабораторії може бути і 20, і 50 і навіть більше сортів та видів рослин. Контейнери із рослинами займають багато місця, тому всі контейнери з живильним середовищем розміщуються на стелажах з фітосвітлом.

Фітоосвітлення вимагає істотних витрат, тому включення та вимкнення освітлення в лабораторії здійснюється автоматично. Деякі клони вимагають різних циклів освітлення на різних стадіях розвитку.

Найбільша витрата електроенергії при мікроклональному розмноженні припадає на автоклавування та стерилізацію. Лабораторія оснащена автоклавом, ламінарними боксами, дистильатором.

Автоклав використовується для стерилізації живильних середовищ, на яких відбувається культивування клонів. Без стерилізації на цьому живильному середовищі з великим задоволенням проростатимуть спори грибів та бактерії, які вражатимуть і рослини.

Ламінарний бокс потрібен для створення стерильного від спор грибів та бактерій середовища, в якому проводять маніпуляції і з рослинним матеріалом, і з живильними середовищами.

Води при мікроклональному розмноженні потрібно багато, і вода повинна відповідати певним вимогам. Для приготування живильних середовищ використовують дистильовану воду. Її отримують самостійно. Для самостійної дистиляції краще використовувати воду, що пройшла очищення зворотним осмосом.

Дистилятор потрібен для виробництва дистильованої води та спирту. Спиртом обробляються всі поверхні та інструменти, з якими контактує біотехнолог.

Лабораторія також оснащена лабораторною мішалкою з підігрівом на великий обсяг для приготування живильних середовищ.

Лабораторний посуд представлений колбами, мірними склянками, мензурками, пробірками, чашками Петрі.

Не обійтися при вирощуванні рослин методом мікроклонального розмноження без точних лабораторних терезів, вони потрібні для зважування компонентів при приготуванні живильних середовищ.

Для визначення кислотності поживних середовищ в лабораторії є рН-метр.

Лабораторію клонального мікророзмноження рослин ФГ «Агролайф» забезпечено витратними матеріалами. Сюди віднесемо контейнери для живильного середовища та рослин, халати, рукавички, шапочки, бахіли, одяг та взуття для персоналу, засоби для дезінфекції.

Об'єктом досліджень були рослини та ягоди суниці садової сортів Русанівка, Веселка та сорти італійської селекції Альба, Клері, Джолі.

Предметом дослідження були етапи клонального мікророзмноження сортів суниці садової та склад живильного середовища для отримання максимальної кількості регенератів та рослин.

## **2.2. Методика виконання роботи**

Загалом методика клонального мікророзмноження суниці садової *in vitro* досить відпрацьована і використовується вже багато років [6-13]. Незважаючи на це, потрібно постійно вдосконалювати технологію, яка пов'язана зі змінним асортиментом суниці садової, генотипічні особливості якого при вирощуванні в умовах *in vitro* ще не відомі. Крім того, змінюється, склад мікроорганізмів, кліматичні умови.

У зв'язку з цим метою наших досліджень була оптимізація етапів клонального мікророзмноження сортів суниці садової в умовах *in vitro* на базі ФГ «Агролайф».

Дослідження проводились у лабораторії ФГ «Агролайф». Об'єктом досліджень була суниця садова сортів Русанівка, Веселка та сорти італійської селекції Альба, Клері, Джолі. У дослідженні було використано загальноприйнятту методику розмноження рослин суниці *in vitro* [24].

В якості вихідного матеріалу були використані експланти зі зростаючих розеток суниці, апекси вусів та фрагменти листка суниці.

Стерилізацію рослинного матеріалу проводили за схемою: попередня підготовка та основна обробка. Підготовлені сегменти промивали під водопровідною проточною водою протягом 30 хвилин. Основна обробка

експлантів проводилася розчином NaOCl в концентрації 1,5% протягом 5 хв., з подальшим 3-кратним промиванням бідистильованою водою по 5 хв.

Експланти готували в асептичних умовах у ламінарних боксах та висаджували у пробірки з живильним середовищем. Введення в культуру проводили у три терміни: друга декада червня, липня та серпня.

Як основу для живильного середовища використовували середовище Мурасіге-Скуга (МС). На етапі введення: безгормональне середовище МС, на етапі проліферації з додаванням 6-БАП, на етапі укорінення середовище  $\frac{1}{2}$  МС з додаванням сахарози 20 г/л, без ауксинів. Після введення в культуру експланти поміщали у темряву на 3-5 діб. Культивували рослини при 16-годинному фотоперіоді (світло/темрява 16/8 год) при температурі  $25 \pm 2$  °C та освітленості 2500-3000 люкс.

Укорінені рослини адаптували до умов *ex vitro* після 4-6 тижнів укорінення. Рослини висаджували в мініпарники, що містять стерилізовану ґрунтово-торф'яну суміш, перліт і вермикуліт (3:1:1), проливали  $\frac{1}{2}$  розчином макросолів МС і утримували в фітотроні 16-годинному фотоперіоді, температурі  $22 \pm 2$  °C при освітленості 6000 люкс. Відсоток адаптованих рослин реєстрували через 20 днів після пересадки.

Під час проведених досліджень визначали оптимальну концентрацію фітогормону 6-БАП в живильному середовищі для отримання максимальної кількості регенератів та рослин, придатних для укорінення. Стерилізацію вихідного матеріалу проводили у два етапи:

1. Молоді розетки суниці садової очищали від залишків землі та листків, що криють, і промивали з милом у теплій проточній воді 10 хвилин, потім 60 хвилин у проточній воді і обполіскували дистильованою водою.

2. Далі робота проводилася у ламінарному боксі. Підготовлені експланти поміщали у 70% спирт на 5 хвилин, потім переносили в 50% перекис водню на 10 хвилин, після цього вихідний матеріал промивали стерильною дистильованою водою 3 рази по 10 хвилин.

Для культивування використовували агаризоване живильне середовище

Мурасіге-Скуга. Як регулятор росту був використаний 6-БАП (6-бензил-амінопурин) в концентраціях: 0,25 мг/л, 0,5 мг/л, 0,75 мг/л, 1 мг/л.

На кожний варіант середовища різної концентрації висаджували по 20 експлантів суниці сорту Веселка. Показники проліферативної активності (коефіцієнт розмноження та висота рослин) оцінювались по 4 пасалям кожної концентрації 6-БАП.

Під час проведених досліджень було вивчено вплив обробок регуляторами росту Цирконом та цитокином 6-БАП на інтенсивність вусоутворення сортів суниці садової.

Обробка рослин суниці садової проводилася регуляторами росту Цирконом (30 мкл/л, доза 0,9 мкл/м<sup>2</sup>) та цитокином 6-БАП (1 мг/л, доза 0,03 мг/м<sup>2</sup>), які призначені для посилення ростових та формоутворюючих процесів, збільшення врожайності, а також покращення товарного вигляду та підвищення якості садової продукції. Обробку проводили чотири рази зранку з інтервалом у 10 діб, починаючи з фази бутонізації.

Рослини росли по однорядковій схемі посадки, відстань між рядками – 50 см, відстань між рослинами в одному рядку – 50 см. Технологія вирощування є загальноприйнятою. Полив здійснювався дощуванням.

Облік проводили за такими ознаками: число вусів (шт./рослину) та число дочірніх розеток (шт./рослину), відповідно до програми та методики сортовивчення плодових, ягідних та горіхоплідних культур. Контролем були рослини тих самих сортів, оброблені водою.

Культивування апексів вусів та фрагментів листка суниці садової проводили в умовах *in vitro* за загальноприйнятою методикою.

Визначення харчової цінності та хімічного складу суниці, вирощеної в умовах мікроклонування та у відкритому ґрунті здійснювали згідно методик, наведених в ДСТУ 7653:2014 «Суниця свіжа. Технічні умови».

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Удосконалення етапів клонального мікророзмноження сортів суниці садової та оцінка їхнього потенціалу розмноження в умовах *in vitro*

Застосування методу клонального мікророзмноження *in vitro* разом із методами оздоровлення рослин забезпечує альтернативну можливість збільшення виробництва посадкового матеріалу суниці, вільного від шкідливих організмів [8].

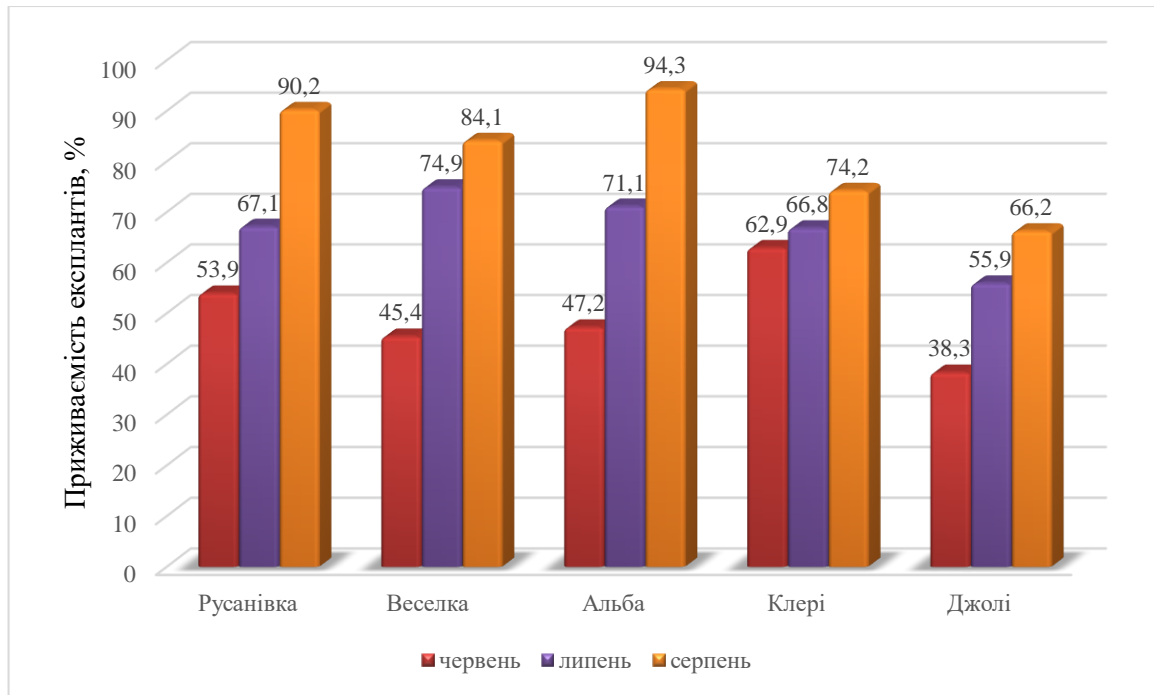
Мікроклональне розмноження суниці садової – розмноження рослин вегетативним способом в умовах стерильності. В результаті мікроклонування рослин створюються генетично ідентичні форми, при цьому посадковий матеріал однорідний, рослини швидко розмножуються, що дає можливість отримувати велику кількість високопродуктивних рослин, які важко розмножуються [27].

Технологія мікроклонування рослин дозволяє скоротити у 2-3 рази селекційний процес створення та вирощування посадкового матеріалу. У лабораторії мікроклонування рослин створюються стерильні умови, що дозволяє отримувати та вирощувати рослину без появи різних захворювань, спричинених негативним впливом зовнішнього середовища та вірусних захворювань [29].

Успішність розмноження культури в умовах *in vitro*, визначається багатьма факторами: культура, тип експланту, період ізоляції, культури, ступінь контамінації та виділення фенолів і т.д. [14].

В ході проведеного дослідження вивчалися особливості розмноження п'яти сортів суниці (Русанівка, Веселка Альба, Клері, Джолі). Ізоляцію експлантів суниці в культуру *in vitro*, проводили у три терміни: червень, липень та серпень (рис. 1).





**Рис. 1. Ефективність введення експлантів суниці in vitro в залежності від строків ініціації**

За результатами дослідження найкращим терміном для введення в культуру сортів in vitro суниці є пізньорічний період. Найвища приживаємість експлантів in vitro у сортів суниці відзначена при введенні в другій декаді серпня. Максимальний вихід експлантів, що регенерували, склав у сорту Альба – 94,3%, Русанівка – 90,2%, Веселка – 84,1%, Клері – 74,2%, Джолі – 66,2%. При відборі експлантів на початку періоду вусоутворення приживаємість експлантів нижча і варіює в межах 38,3-62,9%.

Крім концентрації цитокініну та кількості субкультивувань на рівень проліферації пагонів в умовах in vitro впливають і сортові особливості суниці. За результатами дослідників [42-44] в умовах in vitro високий рівень пагоноутворення мають сорти суниці (12,8-13,2 шт./експлант), Ельсанта (9,3-11,8 шт./експлант), Камароса (7,2-9,6 шт./експлант) [43].

За даними авторів сортів, що вивчаються [6, 9, 14], сорт Русанівка в умовах маточника має високу вусоутворюючу здатність (понад 50 розеток з маточного куща), сорт Веселка – середню (не більше 30 розеток).

Послідовне субкультивування суниці протягом трьох пасажів показали, що сорт Русанівка в умовах *in vitro* має високе пагоноутворення до 12,6 пагонів з одного експланта. У сортів Альба, Джолі, Клері та Веселка утворюється від 9,2 до 10,6 пагонів на експлант.

Коренеутворення у мікророслин суниці проводили в середовищі Мурасиге-Скуга. Використання ауксинів на етапі ризогенезу не знадобилося. На етапі перед укоріненням у мікророслин суниці почалося мимовільне коренеутворення. Формування коріння почалося через 8-10 днів і через 3-4 тижні на такому безгормональному середовищі рослини були готові до пересадки в нестерильні умови.

У сорту Русанівка відсоток коренеутворення становив 94,8%, у сорту Веселка – 97,7%. У сорту Альба, Клері та Джолі – 83,6-93,4% (рис. 2).



**Рис.2. Результати коренеутворення мікророслин суниці на поживному середовищі Мурасиге-Скуга, %**

Переведення рослин з умов *in vitro* у нестерильні умови є одним із відповідальних етапів у процесі клонального мікророзмноження. Суниця є однією з тих культур, яка має високу адаптивність і стресостійкість при переведенні з умов *in vitro* до умов *ex vitro*. У середньому кількість адаптованих рослин становила 80-95%.

Через 1-1,5 місяці адаптовані рослини пересаджували в ємності об'ємом 150-200 мл. Ще через 2 місяці дорощування у теплиці у рослин суниці починавться процес вусоутворення.

Узагальнюючи отримані результати досліджень можна зробити висновок, що введення експлантів суниці садової сортів Альба, Джолі, Веселка, Клері та Русанівка в культуру *in vitro* більш ефективно проводити в пізніолітній період, у другій декаді серпня. Тоді приживання експлантів складає у сортів Веселка, Русанівка та Альба 84,1-94,3%, у сортів Джолі та Клері – 66,2-74,2%.

На етапі ризогенезу у рослин-регенерантів формування коренів проходить на половинному середовищі Мурасиге-Скуга без додавання ауксинів. Коріння утворюється у 95-98% рослин. Укоренені рослини адаптувати в субстраті, що складається з ґрунтового-торф'яної суміші, перліту та вермікуліту у співвідношенні 3:1:1.

### **3.2. Визначення оптимальної концентрації фітогормону 6-БАП в живильному середовищі для отримання максимальної кількості регенератів та рослин, придатних для укорінення**

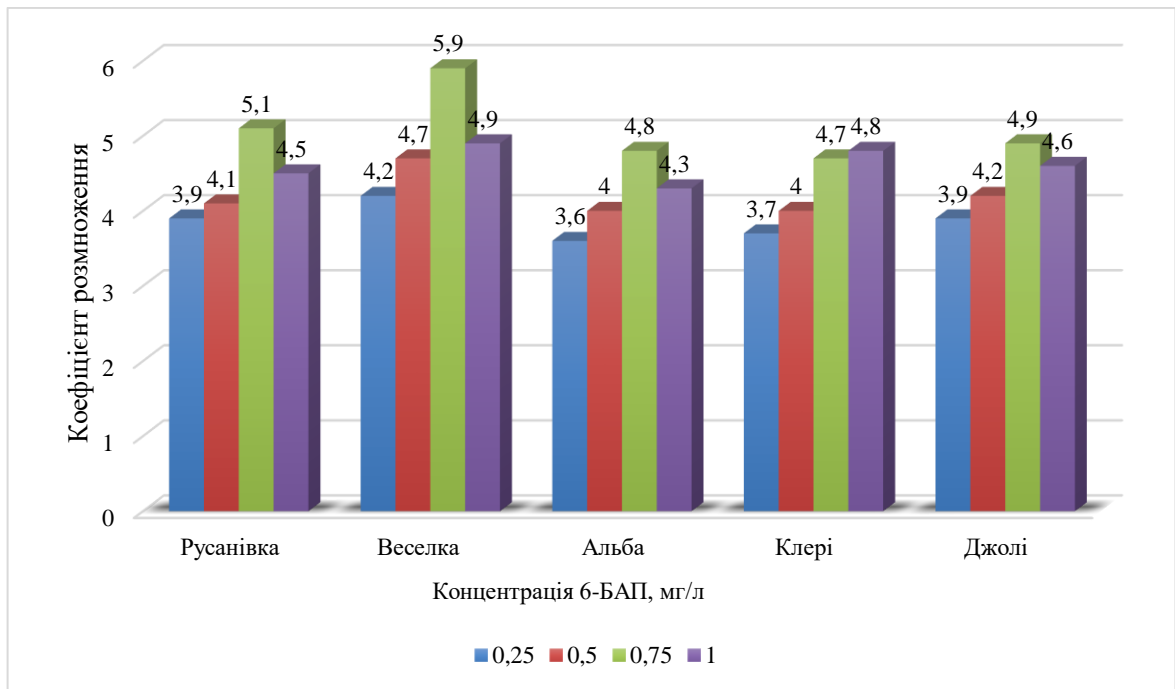
У процесі клонального мікророзмноження рослин використовують ряд регуляторів росту [3], які можуть бути як природного, так і штучного походження.

Одним з широко застосовуваних регуляторів росту є 6-БАП (6-бензил-амінопурин). Він виявляє високу активність у підтримці росту рослин та індукування органогенезу. Це синтетична сполука, головна функція якої полягає у стимуляції поділу клітин та прискоренні росту рослин [6].

Для визначення оптимальної концентрації 6-БАП для розмноження п'ять сортів суниці садової було оцінено такі показники проліферативної активності як коефіцієнт розмноження та висота рослин для чотирьох концентрацій 6-БАП – 0,25 мг/л, 0,5 мг/л, 0,75 мг/л, 1 мг/л.

Залежність коефіцієнтів розмноження різних сортів суниці садової від

концентрації 6-БАП представлено на рисунку 3.

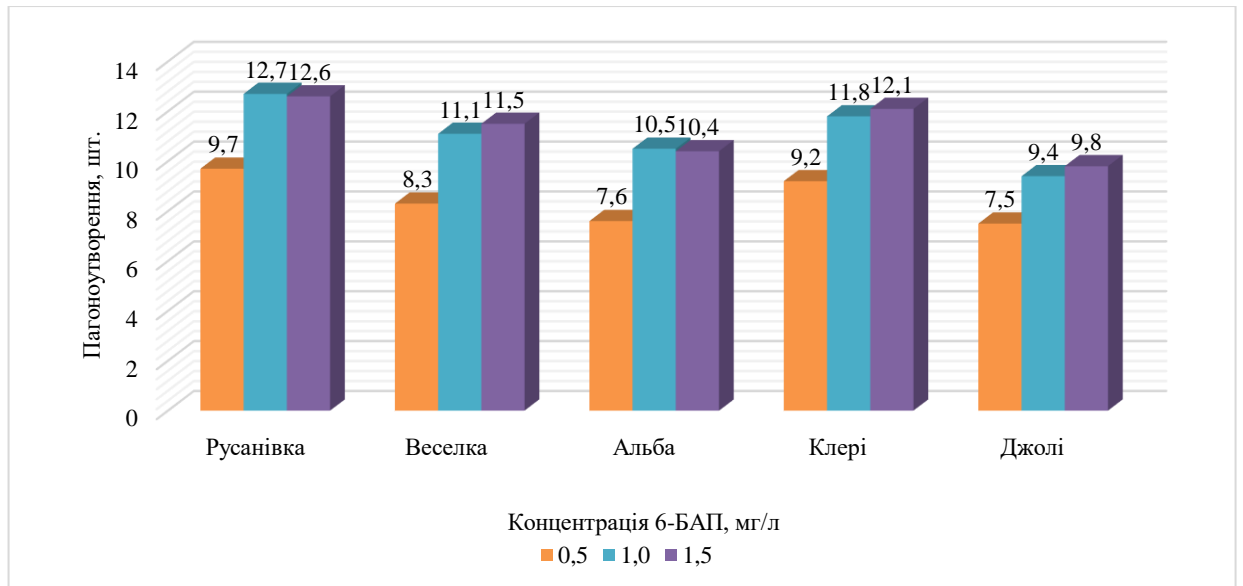


**Рис. 3. Залежність коефіцієнта розмноження суниці садової від концентрації 6-БАП**

Найбільші значення коефіцієнта розмноження серед усіх сортів суниці садової було зареєстровано для концентрації 6-бензиламінопурину 0,75 мг/л: для сорту Веселка –  $5,9 \pm 0,5$ , Русанівка –  $5,1 \pm 0,3$ , Джолі –  $4,9 \pm 0,4$ , Альба –  $4,8 \pm 0,2$ , Клері –  $4,7 \pm 0,4$ .

При концентрації 0,25 мг/л коефіцієнт розмноження був нижчим і становив  $4,2 \pm 0,6$ ,  $3,9 \pm 0,4$ ,  $3,9 \pm 0,4$ ,  $3,6 \pm 0,2$ ,  $3,75,9 \pm 0,3$  відповідно; при концентрації 0,5 мг/л –  $4,7 \pm 0,2$ ,  $4,1 \pm 0,2$ ,  $4,2 \pm 0,4$ ,  $4,0 \pm 0,4$ ,  $4,0 \pm 0,3$ ; при концентрації 1 мг/л –  $4,9 \pm 0,5$ ,  $4,5 \pm 0,3$ ,  $4,6 \pm 0,4$ ,  $4,3 \pm 0,1$ ,  $4,8 \pm 0,3$ . Причому статистично достовірних відмінностей між цими концентраціями не виявлено.

Для підвищення пагоноутворення суниці на етапі мультиплікації в живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) вводили 6-БАП. З метою визначення оптимальної кількості цитокініну для якісного пагоноутворення різних сортів суниці садової, 6-БАП додавали в декількох варіантах (рис. 4).



**Рис. 4. Результати пагоноутворення суниці в залежності від вмісту 6-БАП в живильному середовищі**

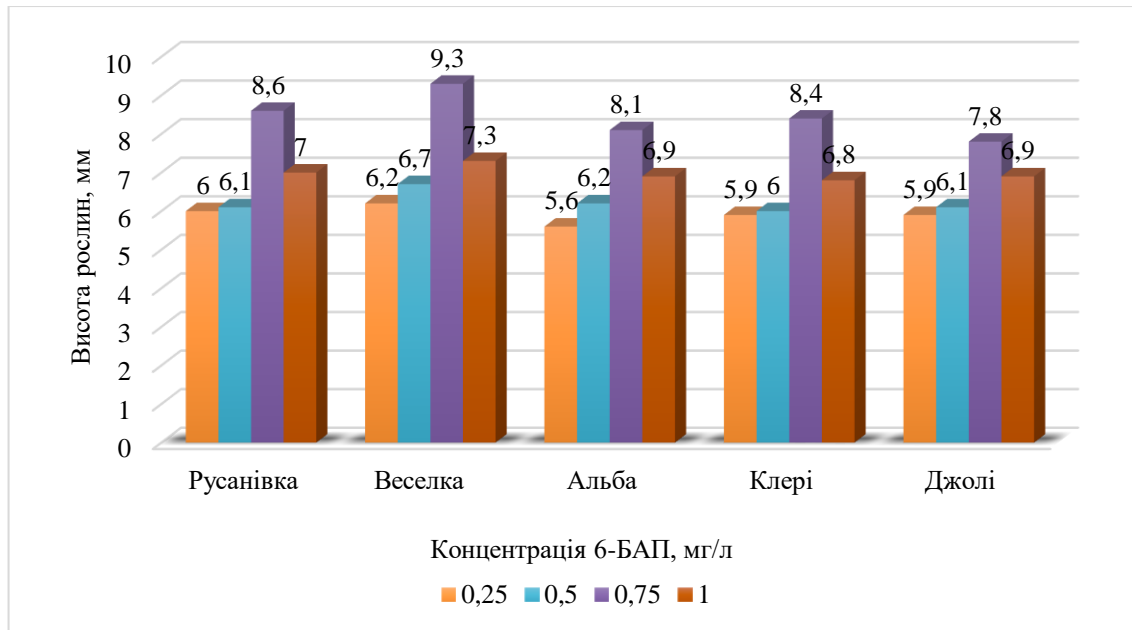
Максимальна кількість пагонів у середньому утворюється до третього пасажу 9,8-12,6 шт. на середовищі з 6-БАП 1,5 мг/л. Однак, у цьому варіанті, хоча пагонів утворюється багато, більша їх частина була обводнена або дрібна.

Проведений аналіз показав, що найбільш якісні пагони суниці виходять на середовищах при додаванні 6-БАП у кількості 0,5-1,0 мг/л.

На середовищі з 6-БАП 0,5 мг/л утворюється від 7,5-8,3 пагонів у сортів Альба, Джолі, Веселка і до 9,7 пагонів у сортів Клері та Русанівка. На середовищі з 6-БАП 1,0 мг/л з одного експланту можна отримати від 9,4 до 12,7 пагонів.

На етапі мультиплікації пагонів слід додавати 6-БАП у кількості 1,0 мг/л. При цьому від одного експланту можна отримати від 9,2 пагонів до 12,6 пагонів. При збільшенні концентрації 6-БАП до 1,5 мг/л зростає кількість вітрифікованих пагонів. У сорту Русанівка відзначено високий потенціал розмноження в культурі *in vitro* (12,6 пагонів з експланту).

Було досліджено залежність висоти росту рослин суниці садової від концентрації 6-БАП (рис.5).



**Рис. 5. Залежність висоти рослин суниці садової від концентрації 6-БАП**

Рослини з найбільшою висотою отримували при концентрації 6-БАП 0,75 мг/л – сорт Веселка –  $9,3 \pm 0,6$  мм, Русанівка –  $8,6 \pm 0,6$ , Клері –  $8,4 \pm 0,4$ , Альба –  $8,1 \pm 0,4$ , Джолі –  $7,8,6 \pm 0,2$ .

Для концентрацій 0,25 мг/л висота рослин становила  $6,2 \pm 0,6$  мм,  $6,0 \pm 0,1$  мм,  $5,9 \pm 0,3$  мм,  $5,6 \pm 0,6$  мм,  $5,9 \pm 0,2$  мм; при концентрації 0,5 мг/л –  $6,7 \pm 0,7$  мм,  $6,1 \pm 0,3$  мм,  $6,0 \pm 0,4$  мм,  $6,2 \pm 0,3$  мм,  $6,1 \pm 0,4$  мм; при концентрації 1 мг/л –  $7,3 \pm 0,4$  мм,  $7,0 \pm 0,5$  мм,  $6,8 \pm 0,4$  мм,  $6,9 \pm 0,5$  мм,  $6,9 \pm 0,1$  мм відповідно.

Як видно з рисунку 5, найнижчі показники висоти рослин спостерігалися при концентрації 6-БАП 0,25 мг/л, 0,5 мг/л.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що оптимальною концентрацією цитокініну 6-БАП при культивуванні *in vitro* суниці садової є концентрація 0,75 мг/мл.

### **3.3. Вплив регуляторів росту на вусоутворюючу здатність та продуктивність суниці садової**

Застосування регуляторів росту дозволяє отримати зміни в обміні

речовин, прискорити утворення генеративних органів, посилити ріст рослини [6].

Цитокініни – речовини, необхідні для індукції поділу рослинних клітин. Цитокініни впливають на цілий ряд фізіологічних процесів: стимулюють поділ і ріст клітин, диференціювання пластид, затримують старіння листя, активують приплив метаболітів, а також утворення пагонів з калюсів у культурі [46].

Цитокініни беруть участь у мінеральному живленні рослин, формуванні азотфіксуючих бульбочок на коренях, впливають на стійкість рослин до несприятливих чинників, і навіть розмір зерна злаків, тобто на врожайність. Пересуваючись рослиною, вони посилюють клітинний поділ і відповідають за зростання бічних бруньок на пагонах [43].

Таким чином, цитокініни збільшують активність апікальних меристем, а збільшення поділу апікальної меристеми призводить до збільшення числа розеток, у свою чергу, збільшення вусоутворення відбувається за рахунок пробудження сплячих нирок [6].

Тим не менш, якщо говорити про суницю садову, дію регуляторів росту, які містять у своєму складі цитокініни, на сьогодні вивчено недостатньо.

Під час проведених досліджень було вивчено вплив регуляторів росту Циркону та цитокіну 6-БАП на інтенсивність вусоутворення сортів суниці садової. Отримані результати наведено в таблиці 1.

Обробку рослин суниці садової проводили регуляторами росту Цирконом (30 мкл/л, доза 0,9 мкл/м<sup>2</sup>) та цитокіном 6-БАП (1 мг/л, доза 0,03 мг/м<sup>2</sup>), контролем були рослини тих самих сортів (Веселка, Русанівка, Джолі, Альба, Клері), оброблені водою.

З отриманих результатів видно, що спостерігалася тенденція збільшення частки рослин з вусами у всіх сортів суниці садової, які піддавалися обробці регуляторами росту, порівняно з контрольними групами. Це підтверджує те, що обробка надавала стимулюючу дію на вегетативні та репродуктивні процеси рослин.

Таблиця 1

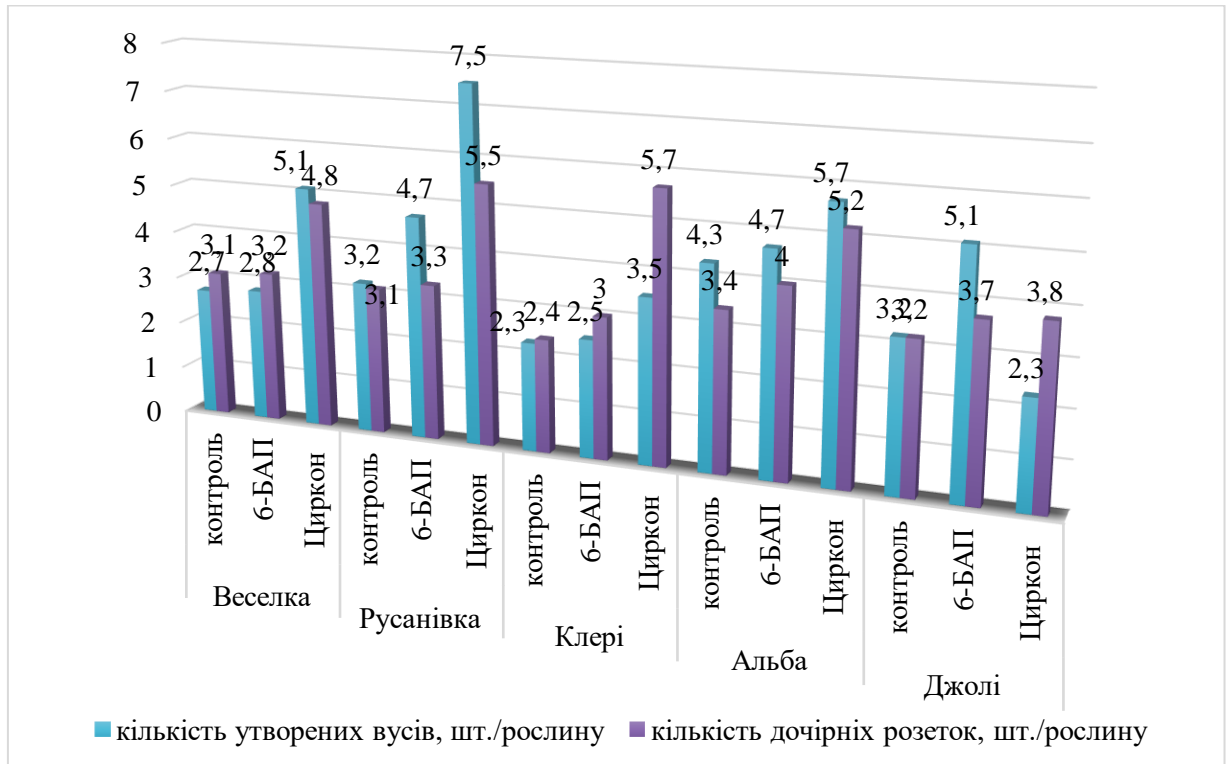
**Вплив регуляторів росту на вусоутворення рослин суниці садової в умовах відкритого ґрунту**

Сорт	Обробка рослин	Показник		
		частка рослин з вусами, %	кількість утворених вусів, шт./рослину	кількість дочірніх розеток, шт./рослину
Веселка	контроль	58,3±0,2	2,7	3,1
	6-БАП	75,2±0,5	2,8	3,2
	Циркон	83,3±0,8	5,1	4,8
Русанівка	контроль	83,5±0,8	3,2	3,1
	6-БАП	91,6±8,0	4,7	3,3
	Циркон	100,0±0,1	7,5	5,5
Клері	контроль	66,5±0,6	2,3	2,4
	6-БАП	67,8±0,6	2,5	3,0
	Циркон	81,5±0,3	3,5	5,7
Альба	контроль	91,5±0,4	4,3	3,4
	6-БАП	97,1±0,2	4,7	4,0
	Циркон	100,1±0,5	5,7	5,2
Джолі	контроль	75,1±0,5	3,2	3,2
	6-БАП	77,2±0,3	5,1	3,7
	Циркон	87,6±0,6	2,3	3,8

Найбільш ефективним виявився стимулятор росту Циркон, обробка рослин цим препаратом у 1,5-2,3 рази збільшувала кількість дочірніх розеток залежно від сорту (рис. 6).

Показники продуктивності під впливом регуляторів росту також зростали. Обробка рослин Цирконом підвищувала середню масу ягід на 10-28% та в 1,5-2,4 рази продуктивність та врожайність залежно від сорту. У кращому варіанті – у сорті Русанівка, врожайність досягала 520 г/рослину та 3,2 кг/м<sup>2</sup>.





**Рис. 6. Вплив регуляторів росту на ріст та розвиток рослин суниці садової**

Таким чином, вихід посадкового матеріалу у вигляді дочірніх розеток можна підвищити шляхом застосування регулятора росту Циркон у концентрації 30 мкл/л, що дозволяє в 1,5-2,3 рази підвищити вихід дочірніх розеток і отримувати до 6 розеток з рослини в залежності від сорту.

Вирощування рослин в умовах захищеного ґрунту сприяє збільшенню обсягів розсади: завдяки продовженню періоду вегетації рослини формують у 4,3-6,4 разів більше дочірніх розеток та з однієї рослини можна отримати до 20 розеток.

При вирощуванні маткових рослин в умовах теплиці, що обігрівається, вихід дочірніх розеток збільшується до 21 штуки на рік із однієї рослини.

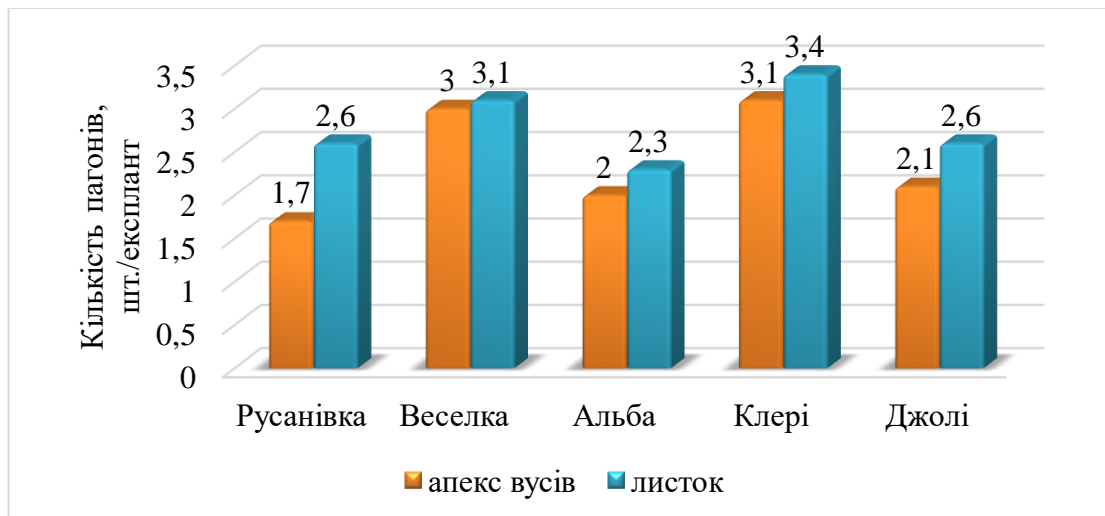
### **3.4. Культивування апексів вусів та фрагментів листка суниці садової в умовах *in vitro***

У ході дослідження була проведена оцінка морфогенетичного потенціалу різних сортів і типів експлантів.

Культивування апексів вусів та фрагментів листків суниці садової проводили на середовищі MS з низькими концентраціями гормонів (6-БАП 0,5 мг/л), що дозволило уникнути утворення калюсу і отримати від 10,0 до 86,9% морфогенних експлантів залежно від сорту.

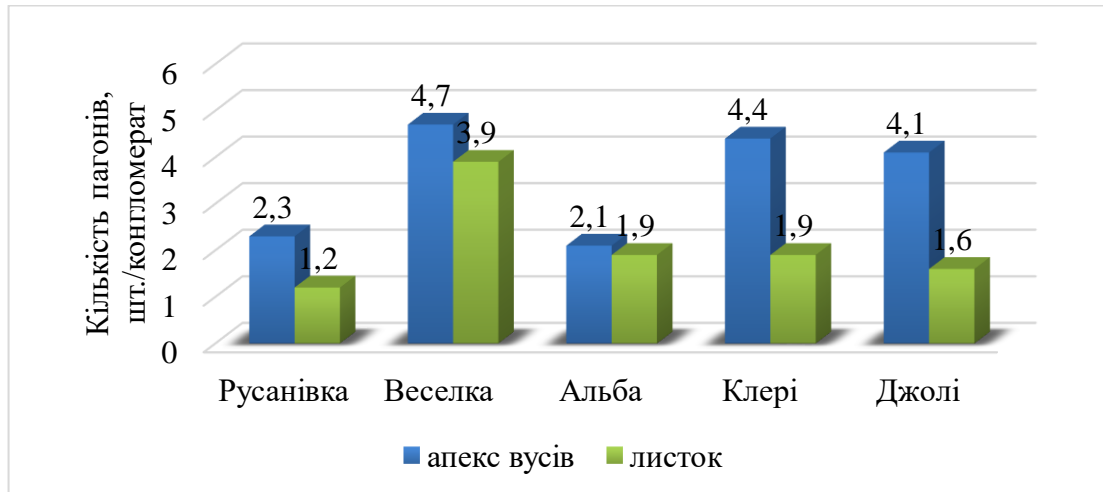
Життєздатнішими виявилися апекси вусів. Частка регенеруючих апікальних експлантів досягала 86%. Частка регенеруючих листових експлантів була порівняно невисокою (10-41%).

Через 30 діб культивування на морфогенних експлантах формувалися бруньки та пагони. На апексах вусів формувалося 2,4-3,9 бруньок та 1,7-3,1 пагонів, а на фрагментах листка – 2,7-3,7 бруньок та 2,3-3,4 пагонів у перерахунку на один експлант (рис. 7).



*Рис. 7. Морфогенез експлантів на етапі введення (6-БАП 0,5 мг/л)*

При подальшому культивуванні найбільш інтенсивний морфогенез спостерігався у конгломератів апікального походження. У ремонтантних сортів формувалося в середньому 2,3-4,7 бруньок та 2,1-4,7 пагонів на конгломерат, а на структурах листового походження – 1,7-2,1 бруньок та 1,2-1,9 пагонів на конгломерат (рис. 8).



**Рис. 8. Морфогенез на етапі розмноження морфогенних конгломератів**

У сорту Веселка коефіцієнт розмноження був найвищими (4,7-3,9). Серед ремонтантних сортів вищими показниками виділився сорт Клері – 4,4 бруньок і 1,9 пагонів на конгломерат.

Було досліджено процес укорінення пагонів та адаптації рослин-регенерантів в умовах *in vitro*.

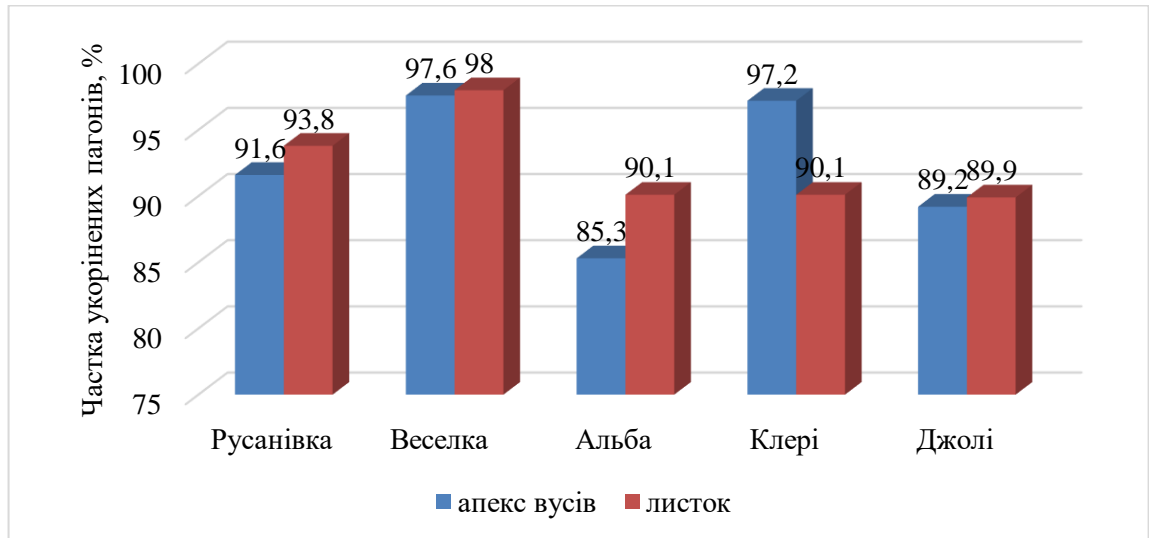
Для індукції ризогенезу пагони переносили на середовище МС, що містить 0,5 мг/л ІМК. Частка пагонів, що укорінилися, у всіх варіантах була високою – 85,3-97,6 %.

Частки укорінених пагонів апікального та листового походження в межах сорту, загалом, відрізнялися не суттєво (рис. 9).

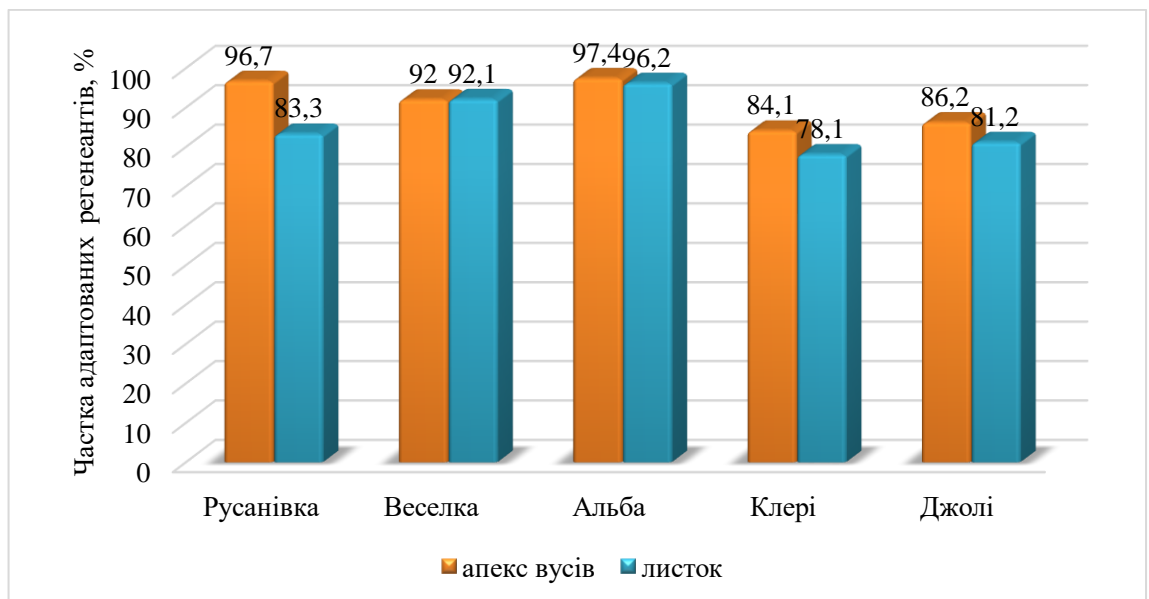
Після утворення коріння рослини адаптували до умов *ex vitro* в торф'яних таблетках фірми «Jiffy» (Норвегія) (рис. 10).

Адаптаційна здатність рослин-регенерантів виявилася досить високою: від 84,1 до 97,4% рослин, отриманих з апексів вусів, успішно адаптувалися.

Регенеранти ремонтантних сортів, отримані з листка, приживалися дещо гірше регенерантів апікального походження. У сорту Веселка походження рослин-регенерантів не впливало на ефективність адаптації.



*Рис. 9. Укорінення пагонів in vitro*



*Рис. 10. Адаптація рослин-регенерантів до умов ex vitro*

Як експлант для введення в культуру *in vitro* значний інтерес представляє пелюсток суниці садової. Цвітіння у ремонтантних сортів триває практично весь період вегетації, що дозволяє довгий час мати під рукою вихідний матеріал – бутони [9].

Пелюстки суниці садової досить великі і легко відокремлюються від квітколожа. Перебуваючи в закритих бутонах, пелюстки не піддаються зовнішнім впливам і забрудненням із боку довкілля.

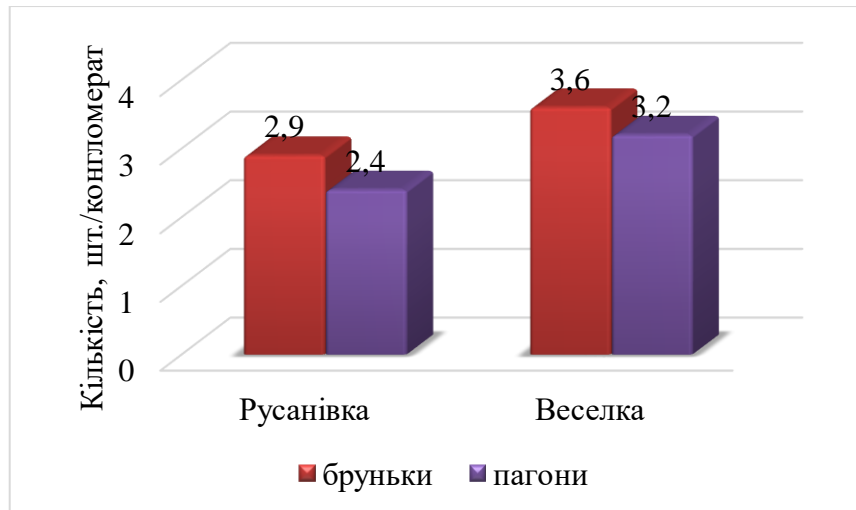
При дослідженні морфогенезу пелюсток та проліферації пагонів суниці (рис. 11) було встановлено, що частка життєздатних морфо- і калусогенних пелюсток виявилася невисокою – не більше 43%, а в деяких варіантах усі пелюстки гинули.



*Рис. 11. Морфогенез пелюсток на етапі введення*

У сортів Русанівка та Веселка був відзначений прямий морфогенез пелюсток, частка морфогенних експлантів становила 24,5-42,9%. Пелюстки, що формують адвентивні бруньки та пагони безпосередньо з тканини пелюстки, представляли найбільший інтерес для подальшого вивчення. На пелюстках сорту Русанівка у середньому формувалося по 3,2 бруньки та 2,4 пагони на експлант, а у сорту Веселка – 3,7 бруньки та 3,2 пагонів на експлант.

На етапі розмноження пагонів (рис. 12) у сорту Русанівка формувалося 2,9 бруньок і 2,4 пагонів на один морфогенний конгломерат, у сорту Веселка – 3,6 бруньок і 3,2 пагонів на конгломерат.



**Рис. 12. Морфогенез пелюсток на етапі розмноження морфогенних конгломератів**

Для вивчення укорінення пагонів та адаптації рослин-регенерантів, отриманих з пелюсток суниці, пагони переносили на середовище МС з ІМК (0,5 мг/л). Більше 90% пагонів успішно укорінялося.

Після формування коріння рослини-регенеранти адаптували в торф'яні таблетки «Jiffy». Частка адаптованих регенерантів до умов *ex vitro* склала 91,2-94,2%.

Дослідження показали, що регенерація рослин суниці садової з пелюстки шляхом прямого морфогенезу можлива, але на початковому етапі культивування спостерігається високий відсоток їх загибелі. Тим не менш, отримані пагони мають високу регенераційну активність, добре вкорінюються та адаптуються до звичайних умов середовища.

Знаючи коефіцієнт розмноження та коефіцієнти втрат, можна зробити висновки про вихід рослин-регенерантів із експлантів різного походження за певні терміни.

Застосування апексів вусів є універсальним і найбільш ефективним для розмноження всіх вивчених сортів суниці садової. У ремонтантних сортів з низькою вусоутворюючою здатністю регенераційна активність листових експлантів значно нижча, ніж у експлантів апікального походження.

Регенерація з пелюстки шляхом прямого морфогенезу є можливою, проте морфогенетична активність пелюсток знову ж таки є нижчою, ніж у апексів вусів.

Оскільки у ремонтантних сортів суниці садової, які вивчаються, кількість апікальних експлантів (апексів вусів) може бути обмеженою, допустимим є використання як додаткових вихідних експлантів фрагментів листка та пелюсток рослини.

Серед вивчених ремонтантних сортів найбільша регенераційна активність відзначена у сорту Веселка. Потенційний вихід регенерантів може досягати більше 850 штук від одного морфогенного апекса вусів за 6 місяців культивування. Сорт Русанівка має високий регенераційний потенціал – за півроку можна отримати більше 1150 рослин-регенерантів з одного експланту.

Рослини-регенеранти мають всі цінні сортові ознаки, в 1,5-2,5 рази менше уражаються сірою гниллю (*Botrytis cinerea* Pers.), білою (*Ramularia Tulasnei* Sacc.) та бруєю плямистістю (*Marssonina poientillae* Desm.).

Висока життєздатність, масове утворення пагонів, гарне укорінення та приживаємість свідчать про те, що культивування *in vitro* апексів вусів може успішно застосовуватися для розмноження та отримання якісного посадкового матеріалу ремонтантних сортів суниці садової.

### **3.5. Порівняльний аналіз харчової цінності та хімічного складу суниці, вирощеної в умовах мікроклонування та у відкритому ґрунті**

Для оздоровлення посадкового матеріалу та прискореного розмноження рослин застосовують різноманітні біотехнологічні методи. Одним з перспективних способів виробництва оздоровленого садівного матеріалу є мікроклональне розмноження [15].

Мікроклонування рослин дає змогу збільшити виробництво цінної за харчовими якостями ягідної сировини. Але водночас, із товарознавчої точки

зору, це дає можливість збільшити масштабність виробництва таких ягід, які потребують ретельного вивчення показників якості та харчової цінності з метою підтвердження генетичної однорідності мікроклонованої рослини вихідного матеріалу та вивчення можливості використання у виробництві продуктів харчування [14].

Проведено дослідження показників якості суниці сорту Русанівка, вирощеної в польових умовах при розмноженні вусами у відкритому ґрунті під впливом зовнішніх природних факторів протягом всього вегетаційного періоду, і суниці, вирощеної в умовах *in vitro* з використанням мікроклонального розмноження. Результати досліджень представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

**Показники якості ягід суниці, вирощених в умовах *in vivo* та *in vitro***

Показник	Норми згідно ДСТУ 7653:2014	Суниця, отримана <i>in vivo</i>	Суниця, отримана <i>in vitro</i>
1	2	3	4
Зовнішній вигляд	Ягоди повністю розвинені, здорові, свіжі, цілі, зрілі, чисті, без механічних пошкоджень та зайвої зовнішньої вологи, з плодоніжкою або без неї, але з чашечкою	Ягоди повністю розвинені, здорові, свіжі, цілі, зрілі, чисті, без механічних пошкоджень та зайвої зовнішньої вологи, з плодоніжкою, з чашечкою	Ягоди повністю розвинені, здорові, свіжі, цілі, зрілі, чисті, без механічних пошкоджень та зайвої зовнішньої вологи, з плодоніжкою, з чашечкою
Смак і запах	Властиві даному сорту, без стороннього запаху та присмаку	Властиві даному сорту, без стороннього запаху та присмаку	Властиві даному сорту, без стороннього запаху та присмаку
Забарвлення ягід	Однорідне	Однорідне	Однорідне

*Продовження таблиці 2*



1	2	3	4
Зрілість	Ягоди однорідні за ступенем зрілості	Ягоди однорідні за ступенем зрілості	Ягоди однорідні за ступенем зрілості
Розмір по найбільшому діаметру, мм, не менше	25,0	26,2	28,7
Частка ягід, % від маси, не більше: механічних пошкоджень уражених шкідниками та птицями			
	2,0	1,3	1,1
	2,0	0,9	0,5

З таблиці 2 видно, що отримані дані щодо вимог до якості суниці сорту Русанівка, вирощеної в різних умовах, відповідають нормі згідно ДСТУ 7653:2014 [10]. Слід зазначити, що суниця, отримана шляхом мікроклонального культивування, більша порівняно з полуницею, вирощеною в умовах відкритого ґрунту, вона містить менше механічних пошкоджень та пошкоджень шкідниками, що говорить про покращені умови при вирощуванні *in vitro*.

Проведено порівняльну оцінку харчової цінності та хімічного складу суниці сорту Русанівка, вирощеної в умовах *in vivo* під впливом зовнішніх природних факторів протягом усього вегетаційного періоду та суниці, вирощеної в умовах *in vitro* з використанням мікроклонального розмноження (табл. 3).

На підставі даних, поданих у таблиці 3, харчова цінність суниці, вирощеної за різних умов, немає достовірної відмінності.

З мікроелементів у складі ягід суниці виявлено залізо, бор, ванадій, йод, кобальт, марганець, мідь, молібден та цинк. Залізо бере активну участь у процесах кровотворення, входить до складу окислювально-відновних ферментів, що регулюють дихання тканин у людини. В цілому, завдяки

великому вмісту різних корисних речовин, зокрема, мінеральних (особливо К, Mg та Fe), плоди цієї рослини мають загальнозміцнюючу, оздоровчу та дієтичну дію [9].

Таблиця 3

**Харчова цінність ягід суниці, вирощених в умовах in vivo та in vitro, г/ 100 г продукту**

Показник	Суниця, отримана in vivo	Суниця, отримана in vitro
Вода	90,18	89,85
Зола	0,37	0,41
Органічні кислоти	1,8	1,85
Вуглеводи	6,42	6,63
Білки	0,85	0,84
Жири	0,38	0,42

Вміст мікроелементів в ягодах суниці садової, вирощеної у відкритому ґрунті під впливом факторів навколишнього середовища, і в суниці садової, отриманої in vitro за допомогою мікроклонального культивування, представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

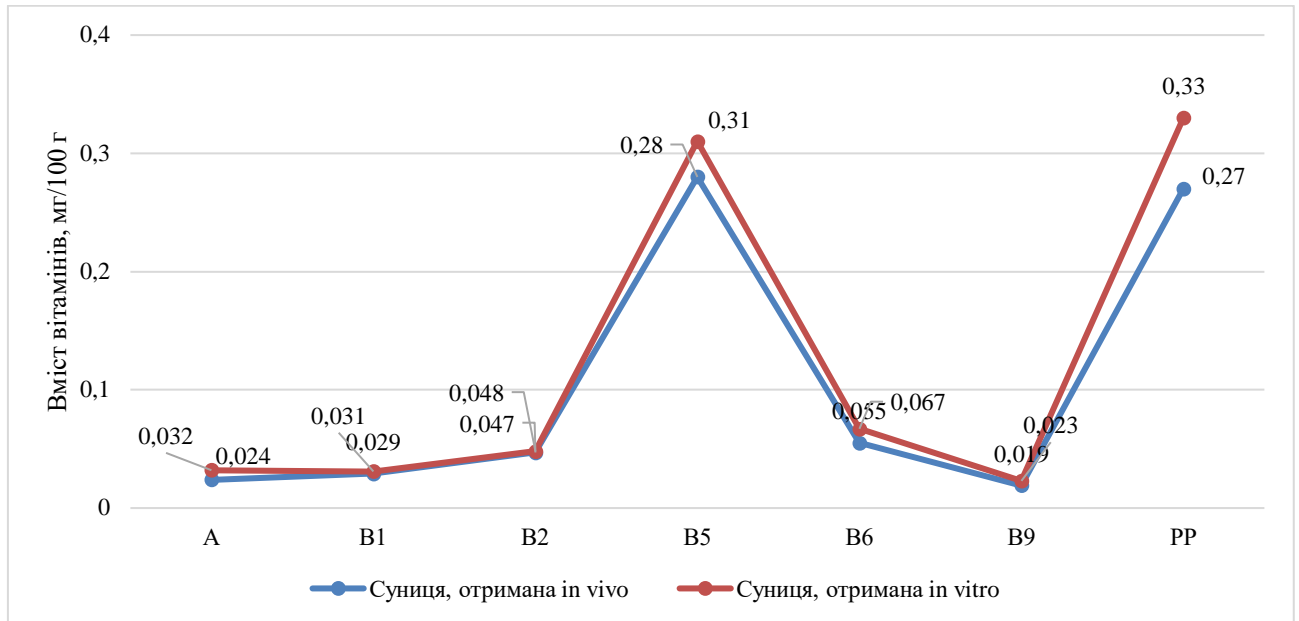
**Вміст мінеральних речовин в ягодах суниці, вирощених в умовах in vivo та in vitro, мг/100 г продукту**

Мінеральні речовини	Суниця, отримана in vivo	Суниця, отримана in vitro
Залізо	1,12	1,2
Йод	0,75	0,85
Калій	153,1	162,1
Магній	17,4	19,3
Селен	0,75	0,73

Виходячи з даних, поданих у таблиці 4, видно, що вміст заліза, йоду, калію та магнію в ягодах суниці сорту Русанівка, вирощених в умовах мікроклонального розмноження, вище на 7,14; 13,3; 5,9 та 10,9% порівняно з

ягодами, які вирощували в умовах відкритого ґрунту.

Проведено дослідження вмісту вітамінів у ягодах суниці садової, отриманих в умовах *in vivo* та *in vitro* (рис. 13).



**Рис. 13. Вміст вітамінів у ягодах суниці, вирощених в умовах *in vivo* та *in vitro*, г/ 100 г продукту**

З рисунку 13 видно, що вміст вітамінів у ягодах суниці, вирощених в умовах *in vitro*, є вищим у порівнянні з ягодами, які були одержані в умовах *in vivo*.

Так, вміст вітамінів А, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>5</sub> та РР в ягодах суниці сорту Русанівка, вирощених в умовах *in vitro*, був вищим, ніж в ягодах, отриманих в умовах *in vivo*, на 33,3; 6,9; 2,1; 10,7 і 22,2% відповідно.

Суниця – справжня джерело вітаміну С (аскорбінова кислота). Особливо багато його в листі, трохи менше – у ягодах. Цей вітамін забезпечує нормальне дихання клітин людського організму та щільність стінок кровоносних судин, у тому числі й капілярів, сприяє загоєнню ран, підвищує опірність організму до хвороб [27].

Вміст вітаміну С в усіх ягодах суниці був високим і становив 58,2 мг (in

vivo) та 60,4 мг (in vitro) на 100 г продукту.

В результаті проведених досліджень встановлено, що харчова цінність ягід суниці, отриманих із застосуванням мікроклонального розмноження, вища, що зумовлено безінфекційним вирощуванням на початкових етапах репродукції мікророслини.

При вирощуванні суниці під впливом природних факторів спостерігаються зміни у складі мікроелементів та вітамінів у залежності від складу ґрунту, погодних умов, ступеня поливу, впливу шкідників та бур'янів. Слід зазначити, що різниця в кількісному складі мінеральних речовин та вітамінів говорить про високий вміст есенціальних речовин у мікроклонованій суниці.

Таким чином, метод мікроклонального розмноження дозволяє отримати ягоди суниці з високою харчовою цінністю, ідентичні ягодам суниці, що отримують при застосуванні традиційних методів вирощування.

Можливість використання у виробництві мікроклонального культивування дозволяє підняти на якісно високий рівень виробництво посадкового матеріалу, що дозволяє задовольняти зростаючий попит на нові високоврожайні сорти та постачати нові посадкові матеріали високої якості.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

Для організації біотехнологічної лабораторії необхідні просторі ізольовані приміщення, а також сучасне обладнання та високоякісні реактиви. Для зручності проведення дезінфекції підлоги стіни та стеля у приміщеннях повинні мати водостійке та ультрафіолетостійке покриття [1].

Під час роботи в лабораторії повинна працювати вентиляція, що забезпечує обмін та очищення повітря, обов'язково має бути витяжна шафа для роботи з їдкими та летючими речовинами. Підлога повинна бути вистелена матеріалом, що не накопичує статичну електрику. Двері повинні відкриватися назовні [4].

Джерелами небезпеки в лабораторії можуть бути отруйні, легколеткі та легкозаймисті речовини, шкідливі реактиви, ультрафіолетові випромінювання, електроприлади [23].

Реактиви повинні зберігатись у відповідних тарах з маркуванням. У приміщенні має бути аптечка для першої медичної допомоги при нещасних випадках [1].

Ламінарій розміщують в окремій кімнаті. Якщо немає ламінарних боксів, то обладнають спеціальну кімнату-бокс – операційну. Стіни такої кімнати облицьовують кахлем, підлогу застилають лінолеумом. Двері операційної повинні герметично зачинятися і перед ними має бути тамбур (передбоксік). У бокс має надходити стерильне кондиціоноване повітря. Бокс оснащують бактерицидними лампами. Потрібні лабораторні столи, стелажі, шафи для матеріалів та обладнання [5].

Особливої обережності необхідно дотримуватись при роботі у боксі. Входити в нього можна лише після вимкнення УФ-опромінення. Обов'язково слід стежити за джерелами відкритого вогню (спиртування). При роботі з концентрованими кислотами та лугами необхідно одягати гумові рукавички та захисні окуляри. Зливати відпрацьовані розчини у загальну каналізацію

забороняється [26].

Органічні розчинники не можна залишати у відкритому посуді. Спирти повинні зберігатися в спеціальній опечатаній шафі. На тарі з токсичними речовинами має бути напис «Отрута».

Обладнання мийного приміщення: повинні бути глибокі раковини з кислотостійкого матеріалу та крани з гарячою та холодною водою, дистильована вода; дистильатори та бідистильатори; сушильні шафи з режимом роботи для сушіння посуду до 100-130 °С, для інструментів до 170 °С, шафи для зберігання чистого посуду та інструментів, ємності для зберігання миючих засобів, витяжні шафи з ексикаторами для хромпіку [5].

Перш ніж розпочати роботу, необхідно переконатися у справності устаткування. Усі роботи можна проводити лише при справному стані електроприладів, заземлюючих пристроїв.

Обладнання приміщення для стерилізації: автоклави з режимом роботи – тиск 1-2 атмосфери та температура 120 °С, стелажі для штативів із живильним середовищем, шафи для зберігання стерильних матеріалів. Дане приміщення має бути обладнане припливно-витяжною вентиляцією та мати каналізаційний злив для відведення конденсату з автоклаву [1, 12].

Автоклав є джерелом підвищеної небезпеки, тому обов'язково треба дотримуватись техніки безпеки під час роботи з ним. Наступні прості правила допоможуть уникнути можливих проблем:

1. Уважно вивчіть інструкцію з експлуатації автоклаву. Складіть покрокову інструкцію та чек-лист роботи з автоклавом, помістіть цю інструкцію у приміщенні для автоклавування на видному місці.

2. Призначте відповідального за роботу з автоклавом. Якщо у вашій лабораторії працює більше однієї людини, то з автоклавом повинен завжди працювати один і той самий постійний співробітник. Цей принцип дозволить уникнути багатьох проблем, зокрема порушення протоколу стерилізації.

3. Дотримуйтесь протоколу стерилізації. Пам'ятайте, що неправильно проведена стерилізація може спричинити зараження живильного середовища.

Зараження живильного середовища – це завжди відкладені в часі втрати, по суті – збитки. Чим раніше буде виявлено контамінацію або, наприклад, розгерметизацію контейнера, тим менше втрат зазнає лабораторія мікроклонального розмноження рослин.

4. Перевіряйте нові матеріали на стійкість до автоклавування. Наприклад, якщо ви придбали нові пластикові контейнери для вирощування клонів, особливо якщо це прості харчові контейнери, їх варто перевірити. Може статися так, що саме ця партія контейнерів трохи відрізнятиметься від заявлених властивостей, наприклад, витримуватиме меншу температуру або тиск.

5. Ніколи не відкривайте працюючий або гарячий автоклав. Зазвичай, автоклавування проводять увечері і залишають автоклав закритим, охолоджуватися до ранку. За цей час вміст автоклава встигає охолонути, а тиск усередині вирівнятися. Якщо автоклав відкрити відразу, то різниця температури і тиску може призвести до розгерметизації ємностей, що автоклавуються – контейнерів, пробірок, колб і банок. У них потрапить зовнішнє повітря, а разом з ним і потенційні патогени – суперечки грибів та бактерій. Зазвичай в інструкції до автоклава вказано, як правильно і через який час його можна відкривати. Якщо таких даних немає, зачекайте щонайменше 4-6 годин, перш ніж відкрити автоклав після його роботи.

6. Підбирайте час роботи автоклава залежно від його завантаження. Для стерилізації великих і потужних об'єктів потрібно більше часу, ніж дрібних. Так, дистильовану воду у великій ємності слід стерилізувати довше, ніж багато маленьких контейнерів з живильною сумішшю.

7. Ведіть журнал автоклавування. Якими б не були величезними ваші обсяги виробництва – завжди ведіть журнал автоклавування. Журнал цей досить простий і містить у собі дату стерилізації, час початку і час кінця процедури, інформацію про стерилізований матеріал, а також тривалість та умови стерилізації. У журналі має бути графа для інших нотаток. Записувати в цю графу варто все, що виходить за межі стандарту [25].

## ВИСНОВКИ

1. Введення експлантів суниці садової сортів Альба, Джолі, Веселка, Клері та Русанівка в культуру *in vitro* більш ефективно проводити в другій декаді серпня. За таких умов приживання експлантів складає у сортів Веселка, Русанівка та Альба 84,1-94,3%, у сортів Джолі та Клері – 66,2-74,2%.

2. Оптимальною концентрацією цитокініну 6-БАП при культивуванні *in vitro* суниці садової є концентрація 0,75 мг/мл. Найнижчі показники розвитку рослин спостерігалися при концентрації 6-БАП 0,25 мг/л, 0,5 мг/л.

3. Регулятори росту Циркон і 6-БАП мають загальний стимулюючий ефект на рослини ремонтантних сортів суниці садової. Обробка Цирконом в концентрації 30 мкл/л найбільш ефективна та дозволяє в 1,5-2,3 підвищити вихід дочірніх розеток, на 10-28% збільшити середню масу ягоди та в 1,5-2,4 рази підвищити продуктивність та врожайність в залежності від сорту та року вегетації. У кращому варіанті – у сорті Русанівка, врожайність досягала 520 г/рослину та 3,2 кг/м<sup>2</sup>.

4. Вирощування рослин в умовах захищеного ґрунту сприяє збільшенню обсягів розсади: завдяки продовженню періоду вегетації рослини формують у 4,3-6,4 разів більше дочірніх розеток та з однієї рослини можна отримати до 20 розеток. При вирощуванні маткових рослин в умовах теплиці, що обігрівається, вихід дочірніх розеток збільшується до 21 штуки на рік із однієї рослини.

5. Встановлено, що апекси вусів суниці садової мають найбільшу морфогенетичну активність *in vitro*, їх застосування найбільш ефективно для мікророзмноження сортів суниці садової з низькою вусоутворюючою здатністю і дозволяє отримувати до 86% життєздатних експлантів, що формують 1,7-3,1 пагонів на експлант і 2,1-4,7 пагонів на морфогенний конгломерат на етапі культивування.

6. Частка регенеруючих листових експлантів була порівняно невисокою (10-41%). Коефіцієнт розмноження – 1,2-1,9 пагонів на конгломерат.



7. Встановлено, що регенерація рослин суниці садової з пелюстки шляхом прямого морфогенезу можлива, але на початковому етапі культивування спостерігається високий відсоток їх загибелі. Тим не менш, отримані пагони мають високу регенераційну активність, добре вкорінюються та адаптуються до звичайних умов середовища.

8. В результаті проведених досліджень експериментально доведено, що харчова цінність ягід суниці садової, отриманих із застосуванням мікроклонального розмноження, вища, що зумовлено безінфекційним вирощуванням на початкових етапах репродукції мікророслини. Слід зазначити, що різниця в кількісному складі мінеральних речовин та вітамінів говорить про високий вміст есенціальних речовин у мікроклонованій суниці.

## ПРОПОЗИЦІЇ

1. Введення експлантів суниці садової в культуру *in vitro* краще проводити в другій декаді серпня.
2. У поживному середовищі для культивування суниці садової *in vitro* оптимальною концентрацією цитокініну 6-БАП є 0,75 мг/мл.
3. Обробка суниці садової Цирконом в концентрації 30 мкл/л має загальний стимулюючий ефект на ріст та розвиток рослин.
4. Після укорінення рослин-регенерантів суниці садової на половинному середовищі МС без додавання ауксинів, укорінені рослини слід адаптувати в субстраті, що складається з ґрунтового-торф'яної суміші, перліту та вермікуліту у співвідношенні 3:1:1.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Атаманчук П. С., Мендерецький В. В. Безпека життєдіяльності (теоретичні основи), Навчальний посібник, Каменець-Подільський: Центр навчальної літератури, 2017. 273 с.
2. Бублик О.М. Чинники соматоклональної мінливості рослин О. М. Бублик //Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2011. Том 9. №1. С.49-54.
3. Власенко М.Ю. Фізіологія рослин з основами біотехнології / М. Ю. Власенко, Л. Д. Вельямінова-Зернова, В. В. Мацкевич. Біла Церква, 2006. 504 с.
4. Вишняков Д. С. Запобігання професійним захворюванням і виробничому травматизму – запорука підвищення конкурентоспроможності підприємства. *Участь молоді у розбудові агропромислового комплексу України: 32-ї студентської науково-теоретичної конференції, 18-20 березня 2020 р., Миколаїв. Миколаїв : МНАУ, 2020, С. 71-74.*  
[URL:http://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/7022.](http://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/7022)
5. Войналович О. В., Марчишина Є. І., Білько Т. О. Охорона праці у сільському господарстві : навч. підруч.; Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ : Центр учбової літератури, 2018. 690 с.
6. Впливання регулятора росту «Універсальний» на продуктивність та якість ягід суниці в умовах Північно-Кавказького регіону / Н.І. Ненько, Л.А. Хилько, Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая // Садівництво та виноградарство. 2011. № 3. С. 36-40.
7. Гарбуз В. Способи визначення суничного кліща на полуниці і способи боротьби зі шкідником. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.harbuz.info/sposobi-viznachennya-sunichnogo-klissha-na-polunici-ispisobi-borotbi-zi-shkidnikom/>
8. Галат Л.М. Світовий ринок ягід: сучасні тенденції та перспективи для

України [Електронний ресурс] / Л. М. Галат // Електронне наукове фахове видання «Ефективна економіка»: інтернет-журн. № 2, 2021 / 25.02.2021 р. Режим доступу: [http://www.economy.nayka.com.ua/pdf/2\\_2021/78.pdf](http://www.economy.nayka.com.ua/pdf/2_2021/78.pdf).

9. Гель І. М. Суниця: біологія, сорти, технології вирощування та переробки / І. М. Гель, І. С. Рожко. Львів : Український бестселер, 2011. 110 с.

10. ДСТУ 7653:2014 Суниця свіжа. Технічні умови. [Чинний від 01.07.2015]. Київ : Інститут садівництва Національної академії аграрних наук України, 2014. 8 с.

11. Завірюха П. Д. Сільськогосподарська біотехнологія: Клітинна та генетична інженерія рослин : термінологія для студ. агроном. ф-ту / П. Д. Завірюха [видання 2-ге доп.]. Львів, 2001. 20 с.

12. Закон України «Про охорону праці» затверджений Президентом України 21 листопада 2002 року, № 229 - ІУ, м. Київ.

13. Єщенко В. О. Основи наукових досліджень в агрономії : підруч. Для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Єщенко, П. Г. Копитко, П. В. Костогриз. Київ : Дія, 2005. 186 с.

14. Костенко В. М. Шляхи розвитку вітчизняного садівництва у новій ситуації. Що маємо на сьогодні і що слід зробити для вирішення існуючих проблем галузі / В. М. Костенко // Сад, виноград і вино України. 2009. № 7-9. С. 5-10.

15. Кушнір Г. П., Сарнавська В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ : Наукова думка, 2005. 272 с.

16. Лапа О. М. Сучасні технології вирощування та захисту ягідних культур / О. М. Лапа, Ю. П. Яновський, Є. В. Чепернатий. Київ : Колобіг, 2006. 99 с.

17. Лук'янчук І. В. Стійкі до грибних захворювань сорти суниці. Захист та карантин рослин. 2008. № 6. С. 42.

18. Лобова О. В., Пилипчук О. О. Сільськогосподарська біотехнологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів

спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія». Київ, 2014. 20 с.

19. Макрушин М.М. Фізіологія рослин. / М.М. Макрушин, Є.М, Макрушина, Н.В. Петерсон, М.М. Мельников. Вінниця: Нова книга, 2006. 413 с.

20. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Удосконалення технології клонального мікророзмноження *Miscanthus giganteus* / В.В.Мацкевич, Л.М. Філіпова // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Мацкевич В.В. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Astrophytum myriostigma* та *Sclerocactus sp.* / В. В. Мацкевич, Л. А. Козак, Л. М. Філіпова //Агробіологія: збірник наукових праць БНАУ. Біла церква, 2012. 8 (94). С. 115-118.

21. Мацкевич. В.В. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник / В.В. Мацкевич, С.В. Роговський, М.Ю. Власенко, В.М. Черняк. Біла Церква: БНАУ, 2010. 156 с. Вип.80, частина 1, Агронімія. Умань. 2012 р. С. 129-137.

22. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Підручник. Киев: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.

23. Методичні вказівки до проведення практичного заняття «Розробка інструкції з охорони праці» для студентів спеціальностей 201 «Агронімія» і 206 «Садово-паркове господарство» ОС магістр: /Дніпропетровський держ. агр.-ек. ун-т.: - Дніпро, 2017, 20 с.

24. Методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни «Основи біотехнології в рослинництві» зі спеціальностей 201 «Агронімія», 202 «Захист і карантин рослин», 203 «Садівництво та виноградарство» вищих аграрних закладів освіти III-IV рівнів акредитації. Умань: УНУС, 2019. 16 с.

25. Основи охорони праці: змістовий модуль № 4. «Основи пожежної безпеки». Тема № 10. «Основи пожежної профілактики на виробничих об'єктах»: конспект лекції / уклад. В. М. Курепін. Миколаїв : МНАУ, 2021. 45 с. URL : <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/9874>.

26. Охорона праці на підприємстві. Кузнецов В. 2-ге вид., перероб. і доп. Харків: Фактор, 2005. 428 с.

27. Павлюк Н. В. Нові сорти суниці садової великоплідної (*fragaria grandiflora ehrh.*) // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. Київ, 2006. №4. С. 124-129.

28. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: за станом на 03 березня 2021 р. - [Електронний ресурс] Документ Департаменту екологічної безпеки Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України. Режим доступу: <https://mepr.gov.ua/content/derzhavniy-reestr-pesticidiv-i-agrohimikativdozvolenih-do-vikoristannya-v-ukraini-dopovnennya-z-01012017-zgidno-vimogpostanovi-kabinetu-ministriv-ukraini-vid-21112007--1328.html>

29. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.

30. Прохорчук І. Світовий ринок ягід 2019: чи можна буде «вижити» без трендів? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.growhow.in.ua/cvitovyy-rynok-iahid-2019-chy-mozhna-budevvyzhyty-bez-trendiv/>.

31. Субін О. В. Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria Ananassa Duch.*) сорту Аліна в культурі *in vitro* / О. В. Субін // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія : Біологія, біотехнологія, екологія. 2015. Вип. 214. С. 281-288. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnau\\_biol\\_2015\\_214\\_44](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnau_biol_2015_214_44).

32. Федоренко В. П. Шкідники сільськогосподарських культур / В. П. Федоренко, Й. Т. Покозій, М. В. Круть. Ніжин: Аспект-Поліграф, 2004. 367 с.

33. Ягідництво: Навчальний посібник / Ю. П. Яновський, В. В. Воєводін, О. М. Лапа, Є. В. Чепернатий; За ред. д-ра с.-г. наук Ю. П. Яновського, канд. с.-г. наук О. М. Лапи. Київ : Колообіг, 2009. 216 с.

34. Яновський Ю. П. Препарат нупрід 600, ТН в системі захисту промислових насаджень суниці від ґрунтових шкідників у Лісостепу України

/ Ю. П. Яновський, О. А. Балабак, Є. В. Чепернатий, Л. П. Бандура, К. П. Маслікова // Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони НААН України. 2015. № 9. С. 53-57.

35. Яновський Ю. П. Біологічні особливості розвитку та шкідливість західного травневого хруща в промислових насадженнях суниці в Лісостепу України / Ю. П. Яновський, Є. В. Чепернатий, Л. П. Бандура, К. П. Маслікова // Таврійський науковий вісник. Сільськогосподарські науки. 2016. Вип. 95. С. 105-111.

36. Ara M.T., Karim R., Karim M.R., Ahmad Sh., Islam R., Hossain M. Effects of different hormones on in vitro regeneration of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) // International Journal of Biosciences (IJB). 2012. Vol. 2, No. 10(1). P. 86-92.

37. Cathy T. Bug vs. Bug-managing two-spotted Spider Mite with the Predatory Mite *Neoseiulus californicus* / T. Cathy // The Vegetable and Small Fruit Gazette. 2001. Vol.5, №10. P.5.

38. Jan A., Bhat K.M., Bhat S.J.A., Mir M.A., Bhat M.A., Imtiyaz A., Rather J.A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. 2013. Vol.12 (39). P. 5749-5753.

39. Kay Thi Oo, Kyaw Swar Oo, YinYin Mon. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of Scientific and Innovative Research; 2018. Vol. 7(3). P. 70-742.

40. Mok D.W.S., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu. Rev. Plant Physiol, and Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 52. P. 89-118.

41. Moradi K., Otrshy M., Azimi M.R Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures // Journal of Agricultural Technology. 2011. Vol. 7(6). P. 1755-1763.

42. Mahmoud K. Ben, Najar A., Jedid E., Jema, Jemmali A. Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in

strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of new sciences, Agroculture and Biotechnology, 2017. V. 47 (2), P. 2564-2676.

43. Palei S. In vitro studies of strawberry – an important fruit crop: a review / S. Palei, A.K. Das, G.R. Rout // The Journal of Plant Science Research. 2015. Vol. 31, N2. P. 115-131.

44. Pokhylenko, A. P., Didur, O. O., Kulbachko, Y. L., Bandura, L. P., & Chernykh, S. A. (2020). Influence of saprophages (Isopoda, Diplopoda) on leaf litter decomposition under different humidification and chemical loading. *Biosystems Diversity*, 28(4), 384-389. Режим доступу: <http://dspace.dsau.dp.ua/jspui/handle/123456789/3502>.

45. Rusea I., Popescu A., Isac V., Hoza D. Micropropagation of strawberry cv Magic. *Annals of the University of Craiova*. XXIV (LX). 2020. P. 218-223.

46. Sakakibara H. Nitrate specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants I I J. *Plant Res*. 2003. Vol. 116. P. 253-257.