

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології
Кафедра біотехнології та хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На здобуття ступеня вищої освіти

бакалавр

на тему: «МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ
(FRAGARIA X ANANASSA DUCH.) В КУЛЬТУРИ IN VITRO»

Виконав: здобувач вищої освіти
за освітньою програмою
Біотехнології та біоінженерія
спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія
ступеня вищої освіти бакалавр
групи 162ББбд_2020
Гергель Тетяна Сергіївна

Керівник: Короткова Ірина Валентинівна,
кандидат хімічних наук, доцент

Рецензент: Колупаєв Юрій Євгенович,
доктор біологічних наук, професор

Полтава – 2024 року

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології
Кафедра біотехнології та хімії

Освітньо-професійна програма Біотехнології та біоінженерія

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Рівень вищої освіти бакалаврський

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Таміла Ромашко

«11» «вересня» 2024 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ
Гергель Тетяна Сергіївна

1. Тема роботи:

«Мікроклональне розмноження суниці садової (*fragaria x ananassa duch.*) в культурі in vitro».

керівник роботи к.х.н., доцент, професор кафедри біотехнології та хімії
Короткова І.В.

Затверджено засіданням кафедри протокол № 3 від «11» вересня 2023 р.

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи «10» червня 2024 р.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити).

РОЗДІЛ 1. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (FRAGARIA × ANANASSA DUCH.) В КУЛЬТУРИ IN VITRO (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Ботаніко-біологічна характеристика суниці садової (*Fragaria x ananassa Duch.*)

1.2 Особливості ремонтантних сортів суниці садової

1.3 Способи розмноження суниці великоплідної (*Fragaria x ananassa Duch.*)

1.3.1 Насіннєве розмноження

1.3.2 Вегетативне розмноження

1.4 Особливості клонального мікророзмноження рослин

1.5. Використання регуляторів росту та розвитку при клональному мікророзмноженні рослин

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Стерилізація рослинного матеріалу

2.2.2. Культивування in vitro

2.2.3 Клональне мікророзмноження

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Підбір оптимальних умов стерилізації рослинного матеріалу

3.2. Культивування *in vitro* апекса вуса і фрагмента листка

3.2.1 Морфогенез експлантів

3.2.2 Індукція утворення пагонів

3.2.3 Укорінення пагонів та отримання рослин-регенерантів

3.3 Культивування *in vitro* пелюстки

3.3.1 Індукція морфогенезу та калюсогенезу пелюсток

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

3. Перелік графічного матеріалу: рисунки - 1, таблиці – 11 за темою та об'єктом дослідження.

4. Дата видачі завдання «11» вересня 2023р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1. Вибір і затвердження теми роботи.	04.09.-11.09.23	виконано
2. Складання та погодження розгорнутого плану та завдання на кваліфікаційну роботу	11.09-18.09.23	виконано
3. Опрацювання літературних джерел	18.09-20.10.23	виконано
4. Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи	23.10-20.11.23	виконано
5. Виконання теоретичного розділу роботи	20.11.23-12.01.24	виконано
6. Виконання аналітичних розділів роботи	15.01.-29.03.24	виконано
7. Виконання спеціальних розділів	01.04.-30.04.24	виконано
8. Оформлення тексту роботи	01.05.-31.05.24	виконано
9. Попередній захист роботи на кафедрі	10.06.24	виконано
10. Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій	10.06.-20.06.24	виконано
11. Нормоконтроль	20.06.24	виконано
12. Захист кваліфікаційної роботи	21.06.24	виконано

Здобувач вищої освіти

Тетяна ГЕРГЕЛЬ

Керівник роботи

Ірина КОРОТКОВА

АНОТАЦІЯ

Гергель Тетяна Сергіївна

Мікроклональне розмноження суниці садової (FRAGARIA X ANANASSA DUCH.) в культурі in vitro

Кваліфікаційна робота за освітньо-професійною програмою Біотехнології та біоінженерія спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, 2024 рік.

Кваліфікаційна робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 50 найменувань. Обсяг роботи 40 сторінок, містить 1 рисунок, 11 таблиць. Мета роботи полягає у дослідженні способів розмноження суниці садової (Fragaria x ananassa Duch.) для масового одержання високоякісного садивного матеріалу сортів, що характеризуються низькою вусоутворювальною здатністю. Об'єктом дослідження є процес мікроклонального розмноження суниці садової (Fragaria × ananassa Duch.) в культурі in vitro.

На основі виконаних досліджень нами встановлено, що апекси вуса мають найбільшу морфогенетичну активність in vitro, їх застосування найефективніше для мікророзмноження ремонтантних сортів суниці садової з низькою вусоутворювальною здатністю, що дає змогу отримувати до 87 % життєздатних експлантів, які формують 1,6-3,0 пагонів на експлант і 2,1-4,3 пагонів на морфогенний конгломерат на етапі культивування.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, суниця садова, ремонтантні сорти.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (FRAGARIA × ANANASSA DUCH.) В КУЛЬТУРИ IN VITRO (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	10
1.1. Ботаніко-біологічна характеристика суниці садової (Fragaria x ananassa Duch.)	10
1.2 Особливості ремонтантних сортів суниці садової	11
1.3 Способи розмноження суниці великоплідної (Fragaria x ananassa Duch.)	14
1.3.1 Насіннєве розмноження	14
1.3.2 Вегетативне розмноження	15
1.4 Особливості клонального мікророзмноження рослин	16
1.5. Використання регуляторів росту та розвитку при клональному мікророзмноженні рослин	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	26
2.1. Матеріали досліджень	26
2.2 Методи дослідження	27
2.2.1 Стерилізація рослинного матеріалу	27
2.2.2. Культивування in vitro	27
2.2.3 Клональне мікророзмноження	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	31
3.1 Підбір оптимальних умов стерилізації рослинного матеріалу	31
3.2. Культивування in vitro апекса вуса і фрагмента листка	34
3.2.1 Морфогенез експлантів	34
3.2.2 Індукція утворення пагонів	35
3.2.3 Укорінення пагонів та отримання рослин-регенерантів	36
3.3 Культивування in vitro пелюстки	37
3.3.1 Індукція морфогенезу та калюсогенезу пелюсток	37
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43

ВСТУП

Актуальність теми. Суниця садова (*Fragaria x ananassa* Duch.) - одна з найпопулярніших і найпоширеніших ягідних культур у світі. На її частку припадає понад 70% загальносвітового виробництва ягід. Валове виробництво суниці у світі постійно зростає і нині становить понад 4 млн. тон ягід на рік.

Широке поширення суниці садової пов'язане з низкою її безперечних переваг порівняно з іншими ягідними та плодовими культурами. Цінність суниці зумовлюється її скороплідністю, високими смаковими якостями, привабливим виглядом і красивим забарвленням, а також багатим біохімічним складом, поживністю та лікувальними властивостями. Суниця дуже пластична культура. За високого рівня агротехніки її можна успішно вирощувати в різних природно-кліматичних умовах, а в захищеному ґрунті з'являється можливість позасезонного отримання товарного врожаю.

Традиційним способом розмноження суниці садової є розмноження дочірніми розетками. Однак для багатьох ремонтантних сортів характерна низька вусоутворювальна здатність, за сезон вони здатні сформувати зовсім невелику кількість вусів і дочірніх розеток, що є недостатньою для отримання необхідного обсягу розсади. У зв'язку з цим постає питання про спосіб розмноження цих сортів для прискореного і масового одержання високоякісного посадкового матеріалу в потрібні терміни[1].

Багато сортів суниці сучасного виробництва уражаються цілою низкою різних захворювань. При розмноженні традиційним способом від материнської рослини розсаді передається безліч грибкових захворювань і вірусів.

У подоланні цих труднощів надзвичайного значення набуває використання методу клонального мікророзмноження *in vitro*, що дає змогу не лише отримати оздоровлені від фітопатогенів, вірусів та інших інфекцій рослини, а й значно прискорити процес розмноження, що має особливу цінність для сортів суниці садової, які погано розмножуються вегетативно

через низьку усоутворювальну здатність. Крім того, проведення робіт у лабораторних умовах можливе цілий рік, що дозволяє завжди мати під рукою вихідний матеріал[2].

Розробка ефективної та відтворюваної системи прискореної регенерації в умовах *in vitro* є необхідною для клонального мікророзмноження ремонтантних сортів суниці садової з низькою усоутворювальною здатністю.

Оптимізація методів розмноження та розробка технології масового одержання якісного садивного матеріалу ремонтантних сортів суниці садової з низькою вусоутворювальною здатністю представляє безсумнівний інтерес і є затребуваною та актуальною.

Нині встановлено велике значення фізіологічно активних речовин - регуляторів росту та розвитку рослин у практиці сільського господарства. Великий інтерес дослідників привертає вивчення ефективності впливу регуляторів росту, проте дія багатьох регуляторів росту на перспективні сорти-новинки суниці садової, які порівняно недавно з'явилися на міжнародному ринку, залишається мало вивченою. Дослідження ефективності впливу регуляторів росту нового покоління на інтенсивність вусоутворення, а також на продуктивність ремонтантних сортів суниці садової, що характеризуються низькою вусоутворювальною здатністю, представляє інтерес для оптимізації розмноження та просування нових сортів.

Використання методу клонального мікророзмноження дає можливість найбільш швидко нарощувати значні обсяги здорових рослин суниці для закладання виробничих розсадників [3-4]. Це значно прискорює впровадження у виробництво нових, перспективних і високопродуктивних сортів. Традиційно дослідження з розробки методів та підвищення ефективності клонального мікророзмноження рослин зводяться до оптимізації складу живильних середовищ та умов культивування [5-6].

Метою дослідження було дослідження способів розмноження суниці садової (*Fragaria x ananassa* Duch.) для масового одержання високоякісного

садивного матеріалу сортів, що характеризуються низькою вусоутворювальною здатністю.

Відповідно до мети можна виділити **такі завдання:**

- Дослідити дію різних дезінфікуючих засобів та їх комбінацій на ефективність стерилізації експлантів ремонтантних сортів суниці садової.
- Дослідити умови культивування суниці садової в культурі *in vitro*.
- Визначити оптимальні концентрації та комбінації ростових регуляторів для індукції органогенезу та проростання пагонів.
- Оцінити ефективність різних середовищ культивування для розвитку та проліферації пагонів.

Об'єктом дослідження є процес мікроклонального розмноження суниці садової (*Fragaria* × *ananassa Duch.*) в культурі *in vitro*.

Предмет дослідження - апекси вусів, фрагменти листка, пелюстки, морфогенні тканини, рослини суниці садової.

Методи дослідження: Лабораторний аналіз та підготовка вихідного матеріалу (стерилізація, отримання калюсної тканини, підбір складу поживного середовища), мікроклональне розмноження.

Наукова новизна результатів роботи полягає в тому, що вперше здійснено комплексне дослідження способів розмноження суниці садової (*Fragaria* × *ananassa Duch.*) ремонтантних сортів Альбїон та Мурадо в культурі *in vitro*. Удосконалено метод мікророзмноження, що дозволить підвищити ефективність розмноження та якість рослинного матеріалу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати створюють основу для подальшої розробки, аналізу, дослідження та вирощування суниці садової.

Особистий внесок здобувача: Робота виконана на базі навчально-наукової лабораторії «Загальної біотехнології» кафедри біотехнології та хімії Полтавського державного аграрного університету. Весь обсяг експериментальних досліджень по темі кваліфікаційної роботи, аналіз

літературних даних, обробка отриманих результатів, їх опис та аналіз виконані випускником особисто.

Структура та обсяг роботи. Загальний обсяг сторінок кваліфікаційної роботи 40 сторінок. Робота містить 11 таблиць, 1 рисунок та список використаних джерел, що складає 50 позицій.

РОЗДІЛ 1. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (FRAGARIA × ANANASSA DUCH.) В КУЛЬТУРІ IN VITRO (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Ботаніко-біологічна характеристика суниці садової (*Fragaria x ananassa Duch.*)

Великоплідна суниця або суниця садова (*Fragaria x ananassa Duch*) являє собою міжвидовий гібрид між октоплоїдними американськими видами *Fragaria chiloensis* (суниця чилійська) і *Fragaria virginiana* (суниця віргінська), що виник спонтанно понад 250 років тому в Європі за спільного вирощування двох видів, завдяки чому вид суниці садової вирізняється поліморфізмом ознак[7].

Суниця садова належить до класу дводольні, родини Rosaceae (Розоцвіті), підродини Rosoideae (Рожеві), роду *Fragaria* (Суниця), виду *Fragaria x ananassa Duch.* (Суниця садова). Каріотип $2n = 56$.

Суниця садова - багаторічна трав'яниста рослина, що займає проміжне положення між багаторічними трав'яними та напівчагарниковими формами. Висота рослини - до 40 см. Коренева система суниці мичкувата, розгалужена, добре розвинена. Складається з багаторічного кореневища, додаткових коренів ріжка і бічних мичкуватих коренів. Кореневище суниці - багаторічне видозмінене стебло, вкрите прилисками - лусочками, що не опадають. З другого-третього року після посадки суниці нижня частина кореневища починає відмирати. Що старіше кореневище, то менші його верхівкові прирости і тим слабкіша коренева система. Надземна частина рослини складається з укорочених пагонів-ріжків, вусоплетей і листя. Ріжки являють собою укорочені однорічні пагони. Кожен сформований ріжок має верхівкову бруньку, розетку з 3-7 листків, бічні пазушні бруньки, біля основи приросту - додаткове коріння. З верхівкових і пазушних бруньок верхніх листків наступного року формуються квітконоси. Нижні бруньки частіше залишаються вегетативними, з них розвиваються вусоплеті (вуса) - однорічні сланкі пагони, що стеляться, - органи вегетативного розмноження. Вуса

з'являються у суниці одразу після закінчення цвітіння, але активно починають розвиватися після збирання врожаю - з червня і до настання осінніх холодів. На другому міжвузлі вусів утворюються дочірні рослини - розетки. До кінця літа біля основи розеток утворюється мочка коренів, вони вкорінюються і стають самостійними рослинами. Листок складний, тупо-зубчастий, зазвичай трійчастий. Квітконоси утворюються у квітні-травні і живуть до кінця плодоношення. Зацвітає суниця через 25-30 діб після початку вегетації, цвітіння всієї рослини триває 15-35 діб, а однієї квітки - 4-6 діб. Від кінця цвітіння до початку дозрівання ягід проходить від 18 до 22 діб, а від початку утворення бутонів і до повного дозрівання ягід - від 35 до 42 діб. Кількість квітконосів на одному кущі та квіток на одному квітконосі залежить від сорту, віку рослин та агротехніки[8-9]. У більшості сортів на кущі розміщується 4-12 квітконосів, що мають по 4-10 квіток. Квітки суниці білі або рожеві залежно від сорту, зазвичай двостатеві. Плоди суниці являють собою численні сім'янки розміром близько 2 мм, втиснуті в м'якоть розрослого квітколожа - ягоди. Маса ягоди коливається від 5 до 50 г і більше, забарвлення рожеве або червоне. Ягоди можуть зав'язуватися без допомоги комах, при цьому вітер стає переносником пилку, проте практика засвідчила велике значення комах для запилення суниці.

Закладка і диференціація генеративних бруньок починаються в рік, що передує плодоношенню, і закінчуються восени того ж року або наступної весни (залежно від сорту). Процеси успішно протікають в умовах короткого 10-12-годинного дня, знижених температур (не вище 12°C) і вологості ґрунту 70-80%. Критична температура для квіток і зав'язей - - 1,5°C[10].

1.2 Особливості ремонтантних сортів суниці садової

Ремонтантність - це здатність рослин через короткий період спокою до повторного або навіть багаторазового цвітіння і плодоношення протягом однієї вегетації. Властивість ремонтантності має низка видів роду суниці.

Дуже чітко вона виражена у суниці овальної (*F. ovalis*). У суниці чилійської (*F. chiloensis*) і суниці віргінської (*F. virginiana*), які є батьківськими формами суниці садової великоплідної, трапляються екотипи, що володіють властивістю ремонтантності[11].

Останніми роками ремонтантна великоплідна суниця привертає дедалі більшу увагу як садівників-любителів, так і виробників. Це пояснюється низкою її особливостей: вона вступає в плодоношення раніше за звичайну садову суницю, повноцінний урожай можна отримати вже з однорічних плантацій, а ягоди досягають на 3-4 дні раніше за найбільш ранні, звичайні сорти. Але головна відмінна і найбільш цінна властивість ремонтантної суниці - її повторне плодоношення наприкінці літа. Перша хвиля плодоношення в сезоні у неї збігається за термінами з неремонтантними сортами, друга починається в першій половині серпня і триває до заморозків. Основна маса ягід дозріває в серпні. Вирощування ремонтантної суниці дає змогу збільшити період споживання свіжих ягід до трьох місяців і, тим самим, значно збільшити обсяги врожаю[12-15]. Плоди ремонтантної суниці мають гарні десертні та дієтичні якості, вирізняються високим вмістом вітамінів і Р-активних сполук, що визначають їхні лікувальні властивості.

На відміну від звичайних сортів суниці, які формують генеративні бруньки в період короткого світлового дня (кінець літа - початок осені) та плодоносять тільки на початку літа, ремонтантна суниця може закладати генеративні бруньки для наступного врожаю або під час довгого світлового дня (у другій половині травня) за тривалості світлового дня 16-17 годин та температури повітря понад 17 °С, або в умовах будь-якої довжини дня («нейтрального дня»). У першому випадку рослини дають два врожаї ягід з інтервалом від 3 до 8 тижнів, причому, другий врожай рясніший, а нейтральноденні сорти мають майже безперервне плодоношення протягом усього сезону.

Нейтральноденні генотипи суниці нечутливі до світлового періоду і закладають квіткові бруньки приблизно через три місяці після висаджування незалежно від тривалості дня. Сорти нейтрального дня продукують квіткові

меристеми циклічно протягом усього періоду вегетації, хоча формування призупиняється за високих температур.

Сорти «нейтрального дня» у відкритому ґрунті поведуться практично так само, як і ремонтантні, відрізняючись тільки тим, що на півдні можуть давати три врожаї за сезон. З огляду на те, що ремонтантні сорти плодоносять двічі на рік, причому перший урожай дають уже в рік посадки, вони більш вимогливі до родючості ґрунту й агротехніки, ніж звичайна суниця. Їх рекомендується вирощувати на добре структурованих, багатих органікою ґрунтах. Ремонтантні сорти суниці особливо потребують фосфору, дещо менше азоту і калію, хоча на бідних на калій ґрунтах підживлення їм не менш необхідні. Цвітіння і закладка другого врожаю у ремонтантної суниці нерідко збігаються з посушливим періодом, тому рослини слід регулярно поливати з червня по серпень, якщо немає дощів. Необхідно видаляти квітконоси, що утворюються у вересні й пізніше, тому що зимостійкість більшості ремонтантних сортів знижена, а цвітіння і плодоношення восени ще більше послаблює рослини і не дає їм змоги нормально підготуватися до перезимівлі[16].

У ремонтантної суниці ягоди формуються не тільки на материнських, а й на молодих рослинах, що утворилися в результаті вкорінення вусів на початку сезону. Іноді молоді розетки, ще не встигнувши вкоренитися, починають утворювати квітконоси, цвісти і зав'язувати ягоди - це призводить до сильного виснаження маточних рослин, які при цьому теж продовжують плодоносити. Щоб запобігти цьому небажаному процесу, необхідно або обрізати вуса, або, якщо молоді розетки потрібно зберегти, щойно вони сформувалися, підгорнути їх і полити, щоб швидше вкоренилися. Щойно це станеться - перерізати столони, що зв'язують їх із маточною рослиною. Ремонтантні сорти нерідко погано розмножуються вусами, а деякі взагалі не дають вусів[17]. Для таких сортів можливе отримання посадкового матеріалу діленням куща або з насіння. Сорти, що дають невелику кількість вусів, утворюють їх переважно на першому році життя.

Посадки ремонтантної суниці використовують, як правило, 2, максимум 3 сезони, оскільки надалі врожайність падає. Це пояснюється тим, що рослини утворюють дуже потужні кущі з великою кількістю ріжків, як будь-яка суниця зі зниженим вусоутворенням, а коренева система поступово відмирає і все більше оголюється. Все більша невідповідність між великою вегетативною масою і кореневою системою призводить до голодування рослин, що негайно позначається на врожаї [18-20]. З тієї ж причини рослини ремонтантних сортів потрібно висаджувати на дещо більшій відстані одна від одної, ніж звичайні сорти (25-30 см), щоб забезпечити рослинам можливість утворювати більше додаткових коренів і достатню для них площу живлення.

Для отримання високих і стабільних урожаїв сорт суниці садової повинен володіти господарсько-цінними ознаками, зокрема бути високоврожайним (не менше 12 т/га або 1,2 кг/м²), мати досить великі плоди (середня маса 12 г) і характеризуватися високими смаковими якостями, вирівняністю за формою та величиною. Нейтральноденні і ремонтантні великоплідні сорти вже в рік посадки можуть давати врожай до 28 т/га (за густоти посадки 50 тис. шт. /га).

Вирощування ремонтантної суниці є високорентабельним і перспективним як для великих господарств із чітко налагодженою технологією, так і для невеликих фермерських господарств. Однак нездатність деяких ремонтантних сортів, дуже привабливих за багатьма показниками, утворювати достатню кількість вусів і розеток, значно ускладнює процес їх розмноження традиційним способом.

1.3 Способи розмноження суниці великоплідної (*Fragaria x ananassa* Duch.)

1.3.1 Насіннєве розмноження

Насіннєве розмноження суниці великоплідної (за допомогою насіння) - застосовують здебільшого в селекційній роботі при виведенні нових сортів, а також при розмноженні ремонтантних безвусих сортів [21].

Оскільки суниця великоплідна є міжвидовим гібридом, октоплоїдом, що має 56 хромосом, а подальша селекція ґрунтується переважно на міжсортівній гібридизації, то під час розмноження насінням сортові особливості материнських рослин потомству не передаються і спостерігається розщеплення ознак. Деякі насінницькі фірми практикують виробництво і розповсюдження насіння ремонтантної суниці. Однак при вирощуванні з насіння частина отриманих рослин поведуться як ремонтантні - цвітуть і плодоносять, але не утворюють вусів, а інші дають багато вусів, але практично не плодоносять [21].

1.3.2 Вегетативне розмноження

Однією з відмінних рис ягідних культур є широке використання вегетативних способів розмноження. Вегетативне розмноження здійснюється за участю тільки соматичних клітин, тканин і органів рослини. Отримані в такий спосіб рослини є вегетативними клонами і генетично подібні до материнської рослини, зберігають усі біологічні та господарсько-цінні ознаки і є константними за своїми біологічними властивостями: силою росту, продуктивністю, якістю плодів тощо. Традиційним і найбільш поширеним способом розмноження суниці великоплідної є розмноження дочірніми розетками, що формуються на вусах материнської рослини. Розеткова розсада генетично повністю подібна до материнської рослини. Найбільш якісна розсада утворюється з розеток, розташованих ближче до материнського куща (розетки першого-другого порядку). На таких рослинах закладається більше квіткових бруньок і, отже, утворюється більше плодів. Безперечною перевагою цього методу є його простота. Однак від материнської рослини передаються захворювання і віруси, які зберігаються в дочірніх рослинах і знижують якість розсади [22].

Останніми роками все більше господарств починають застосовувати сучасні інтенсивні технології вирощування суниці великоплідної, які передбачають використання розсади типу "Фріґо" (Frigo plants). Технологія

вирощування цих саджанців передбачає викопування рослин із маточника в другій половині листопада, коли притупляється метаболічна діяльність і відбувається відтік вуглеводів до кореневища, а закладання генеративних бруньок і вегетативний ріст повністю припиняються. Викопані рослини охолоджують і зберігають у поліетиленових мішках за температури $-1,5...-2^{\circ}\text{C}$. Можливий час посадки такої розсади розтягується від середини березня до кінця липня, оптимальні терміни посадки фріго: травень-червень [22].

Метод ділення куща застосовують тільки за певних умов розмноження суниці - наприклад, у разі гострої нестачі в посадковому матеріалі нових сортів або за раптової необхідності перенесення цінних сортів на нове місце. Ділити кущі рекомендується у 2-4-річному віці, відбираючи рослини з частиною здорового кореневища і добре розвиненою на них кореневою системою [23].

Ділення кущів застосовується при розмноженні деяких сортів ремонтантної суниці, які утворюють дуже мало вусів або ж вуса взагалі відсутні. Пагони-ріжки мають верхівкову бруньку і кілька пазушних, розетку листя, а біля основи додаткове коріння. Восени або навесні такі рослини викопують, розділяють на частини, використовуючи для посадки як нову рослину кожен ріжок з корінням і розеткою листя [23].

Однак для даних способів вегетативного розмноження (дочірніми розетками або ріжками) характерним є низький коефіцієнт розмноження, а також передача розсаді численних хвороб [23].

Для отримання здорового садивного матеріалу, крім запобіжних методів (вирощування стійких сортів, хімічний захист садивного матеріалу і плантацій, регулювання прийомів агротехніки, біологічна боротьба), застосовують методи клонального мікророзмноження.

1.4 Особливості клонального мікророзмноження рослин

Біотехнологічний метод отримання насіння і розсади є одним з найбільш перспективних сучасних напрямків сільськогосподарського, декоративного і лісового виробництва. Регенерація рослин *in vitro*, їх відновлення від

патогенних мікроорганізмів, особливо вірусів, створення генетично модифікованих форм рослин, формування сортів рослин і банків видів, а також їх збереження і підтримання *in vitro* – справжні досягнення біотехнології рослин[24].

Уперше клональне мікророзмноження здійснив французький учений Жорж Морель на орхідеях у 50-х роках ХХ століття. У своїх роботах він використовував техніку культивування апікальної меристеми рослин. Рослини, отримані таким чином, були вільні від вірусної інфекції.

Відповідно до наукової термінології клональне мікророзмноження - нестатеве розмноження рослин у культурі клітин і тканин, за якого утворені форми рослин є генетично ідентичними до вихідного екземпляра [25].

Існує багато методів клонального мікророзмноження, і різними авторами пропонуються різні системи їх класифікації. Найбільш поширеною є класифікація, згідно з якою мікроклональне розмноження може здійснюватися за рахунок:

- активації розвитку вже наявних у рослині меристем (апекса стебла, пазушних і сплячих бруньок, інтеркалярних зон стебла);
- індукції адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експланта;
- індукції соматичного ембріогенезу;
- диференціації адвентивних нирок у первинній і пересадковій калюсній тканині [26-29].

Основний метод, що використовується при клональному мікророзмноженні рослин, - це активація розвитку вже наявних у рослині меристем. Він заснований на знятті явища апікального домінування, що може бути досягнуто такими шляхами:

а) мікроживцюванням пагона на безгормональному середовищі з видаленням верхівкової меристеми стебла;

б) додаванням у живильне середовище речовин цитокінінового типу дії, що індукують розвиток численних пазушних пагонів. Для цього використовують БАП або кінетин, а також 2-ізопентеніладенін і зеатин.

Отримані пагони відокремлюють від первинного материнського експланта і знову культивують на свіжоприготовленому поживному середовищі, яке стимулює проліферацію пазушних меристем і виникнення пагонів вищих порядків [30].

Другий метод - це індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експланта. Він заснований на здатності ізольованих частин рослини за сприятливих умов живильного середовища відновлювати відсутні органи і, таким чином, регенерувати цілі рослини. Утворення адвентивних бруньок можна домогтися майже з будь-яких органів і тканин рослини (ізольованого зародка, листка, стебла, сім'ядоль, лусочок і донця цибулини, сегментів коріння і зачатків суцвіть). Цей процес, як правило, відбувається на поживних середовищах, що містять тільки цитокініни або цитокініни в поєднанні з ауксинами у співвідношенні 10:1 або 100:1. Як ауксин найчастіше використовують ІУК або НУК[32].

Третій метод, що практикується під час клонального мікророзмноження, - індукція соматичного ембріогенезу - ґрунтується на диференціації зародкоподібних структур із соматичних клітин, які за своїм зовнішнім виглядом нагадують зиготичні зародки. Як правило, соматичний ембріогенез є досить трудомісткою операцією, оскільки не завжди вдається реалізувати властиву клітинам тотипотентність. Однак цей метод розмноження має свої переваги, пов'язані зі скороченням останнього етапу клонального мікророзмноження, що вимагає підбору спеціальних умов вкорінення та адаптації пробіркових рослин, оскільки соматичні зародки являють собою повністю сформовані рослинки. При використанні відповідної техніки капсулювання з цих ембріодів можна отримати штучне насіння [31].

Четвертий метод клонального розмноження - диференціація адвентивних бруньок у первинній і пересадковій калюсній тканині - мало використовується для отримання посадкового матеріалу *in vitro*. Це пов'язано з тим, що за періодичного пересаджування калюсної тканини на поживне середовище спостерігаються явища, небажані під час мікророзмноження:

зміна плоїдності клітин, структурні перебудови хромосом і накопичення генних мутацій, втрата морфогенетичного потенціалу культивованими клітинами. Цей метод доцільно застосовувати лише до тих рослин, для яких показано генетичну стабільність калюсної тканини, а варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості. До таких рослин можна віднести амариліс, томати, спаржу, деякі деревні породи та інші культури [33].

Процес мікророзмноження складається з низки послідовних операцій, кожна з яких має свою специфіку (рис. 1.1.).

Етапи клонального мікророзмноження:

- відбір відповідних експлантів, їх стерилізація і перенесення на живильне середовище;
- власне мікророзмноження;
- укорінення пагонів з подальшою адаптацією їх до ґрунтових умов;
- вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до висаджування в поле [34].

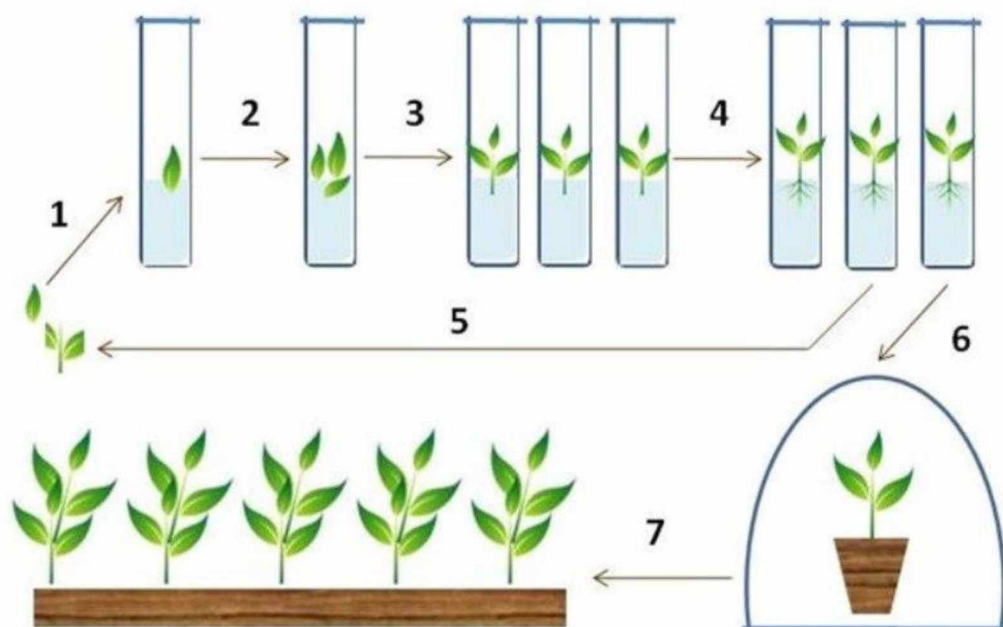


Рисунок 1.1. Схема мікророзмноження рослин (1-стерилізація експлантів, 2 – культивування в стерильних умовах, 3 –

мікроживцювання, 4- укорінення, 5 – повторне розмноження, 6 – адаптація мікроклонів, 7 – висадка в ґрунт

I етап. Під час вибору експланта необхідно враховувати як вид рослини, так і метод мікророзмноження, який буде використовуватися. На процес отримання мікроклонів впливає сезон року і фаза розвитку батьківської рослини, реакція експланта багато в чому залежить від того, з якого органу рослини його взято. Важливість першого етапу мікророзмноження зумовлена тим, що від отримання первинної культури тканин або органів залежить весь подальший процес розмноження. На першому етапі поживні середовища містять високі концентрації мінеральних солей, вуглеводів, вітаміни, цитокініни та ауксини, іноді гібереліни [35].

II етап - власне розмноження. У деяких випадках склад поживного середовища на другому етапі (власне розмноження) залишається колишнім. В інших випадках його збагачують гормонами, здатними індукувати морфогенетичні реакції *in vitro*. У більшості випадків дослідники віддають перевагу середовищу Мурасіге-Скуга. Регулювання морфогенезу за допомогою екзогенних фітогормонів лежить в основі клонального мікророзмноження рослин. Серед найбільш використовуваних цитокінінів - кінетин, БАП, зеатин, ауксинів - ІУК і НУК у концентрації до 0,5 мг/л [36].

III-IV етапи - укорінення мікропагонів, їхня подальша адаптація до ґрунтових умов і висадка в поле. Це найбільш трудомісткі етапи, від яких залежить успіх клонального мікророзмноження. На етапі вкорінення і висаджування в ґрунт зазвичай змінюють основний склад середовища. Зменшують кількість солей і вуглеводів, виключають цитокініни і додають ауксини. Вибір концентрацій ауксинів, необхідних для нормального вкорінення пагонів, залежить від низки причин. Серед них спадкова схильність пагонів до вкорінення, зумовлену видовими та сортовими особливостями батьківських рослин, тип використовуваного ауксину, а також концентрацію і співвідношення фітогормонів на етапі розмноження пагонів. Ефективність ауксинів під час укорінення пагонів значною мірою

зменшується під впливом високих доз цитокинінів, які вносяться в поживне середовище на першому і другому етапах мікророзмноження [37].

У деяких випадках коренеутворення стимулюється додаванням хлорогенової або ферулової кислот. Можна також рекомендувати обробку базальної частини пагонів, витягнутих із пробірок, розчинами стимуляторів ауксинового типу в більш високих концентраціях протягом 3 - 6 год, а потім укорінення їх у безгормональному агаризованому середовищі або *ex vitro* у відповідному субстраті. Цей метод у низці випадків кращий, ніж постійна присутність ауксинів у середовищі [38-40].

Найкращим часом для висадки в ґрунт мікроклонів є період, коли починає розростатися коріння, а молоді листки стають досить розвиненими і здатними до фотосинтезу, що забезпечує рослині повну автономність. Найсприятливіший час для пересадки пробіркових рослин у ґрунт - весна або початок літа. Рослини з двома-трьома листками і розвинутою кореневою системою обережно виймають з колб або пробірок пінцетами. Коріння відмивають від залишків агару і висаджують у ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований за 85-90 °С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрати використовують суміші в таких співвідношеннях: торф : пісок (3:1); торф : дернова земля : перліт (1:1:1); торф : пісок : перліт (1:1:1). Пікірувальні ящики або торф'яні горщики, в яких вирощують рослини-регенеранти, заповнюють заздалегідь приготованим ґрунтовим субстратом [41].

Метод клонального мікророзмноження дає змогу значно прискорити розмноження суниці садової, а також отримати рослини, оздоровлені від фітопатогенів, вірусів та інших інфекцій. Крім того, проведення робіт у лабораторних умовах можливе цілий рік, що дає змогу завжди мати під рукою вихідний матеріал [41].

Цей метод є досить трудомістким і потребує великих матеріальних витрат. Водночас висока рентабельність методу *in vitro* зумовлена низкою переваг порівняно з традиційними способами розмноження, а саме:

- вищий коефіцієнт розмноження;

- мініатюризація процесу, що призводить до економії площ, зайнятих маточними і розмножуваними рослинами;
- отримання оздоровлених від інфекцій рослин;
- розмноження рослин, що важко розмножуються звичайними способами;
- можливість працювати в лабораторних умовах цілий рік, а також можливість тривалого зберігання пробіркових рослин, що дає змогу завжди мати під рукою вихідний матеріал [42].

З усіх факторів, що визначають успіх клонального мікророзмноження, найбільше значення має генотип вихідної рослини. Необхідно використовувати перспективні сорти та гібриди F1. Для введення в культуру *in vitro* бажано відбирати добре розвинені, типові рослини без ознак ураження шкідниками та хворобами. Має значення і вік вихідної рослини, виправдано як експланти використовувати тканини й органи проростків, у цьому разі виявлено кращу приживлюваність експлантів [43].

Таким чином, клональне мікророзмноження аналогічне до вегетативного способу розмноження і відрізняється лише тим, що весь процес протікає в умовах *in vitro* ("у склі"), де з експлантів певного типу можна прискорено одержувати досить велику кількість рослин, ідентичних початковому примірникові (до 3 млн. штук рослин суниці садової на рік від однієї початкової рослини) [44].

Найбільшого поширення в галузі розмноження садивного матеріалу набув метод формування множинних адвентивних пагонів ізольованими апексами або бруньками. В основі методу лежить здатність цитокінінів знімати апікальне домінування пагонів. Цей метод став промисловим для багатьох культур, зокрема для суниці. Уперше технологію масового комерційного розмноження суниці розробив Боксю. Елементи цієї технології надалі зазнали різних змін, спрямованих на її вдосконалення [45].

Розмноження *in vitro* є найбільш інтенсивним методом вегетативного розмноження і тому контроль генетичної стабільності потомства має

величезне значення. Тому сучасні теоретичні дослідження в галузі клонального мікророзмноження намагаються вирішити дві основні проблеми: з одного боку, це досягнення достатнього коефіцієнта розмноження, з іншого - зведення до мінімуму можливості відхилення від сорту [45].

1.5. Використання регуляторів росту та розвитку при клональному мікророзмноженні рослин

Нині встановлено велике значення фізіологічно активних речовин - регуляторів росту і розвитку рослин у практиці сільського господарства.

Останніми роками в результаті проведення великомасштабних робіт з випробування новосинтезованих речовин найрізноманітнішої хімічної природи на наявність біологічної активності було відкрито велику кількість регуляторів росту, які володіють різноманітною спрямованістю впливу на рослини.

Регулятори росту рослин - це природні або синтетичні органічні речовини, здатні стимулювати або пригнічувати ріст і розвиток рослин, не призводячи до їхньої загибелі. За характером дії на рослинні тканини регулятори росту поділяють на стимулятори та інгібітори. Відомі три типи стимуляторів:

- Ауксини;
- Гібереліни;
- Цитокініни.

Виробниче значення регуляторів росту визначилося відтоді, як було виявлено синтетичні речовини, здатні спричиняти в рослин реакції, ідентичні тим, які виникають під впливом природних ауксинів. У результаті з'явилася можливість за допомогою синтетичних регуляторів росту стимулювати низку процесів, пов'язаних з утворенням і розвитком плодів, затримувати проростання бруньок, пригнічувати ріст бур'янів тощо. В даний час синтетичні регулятори росту знайшли широке застосування в багатьох галузях[46].

Одним із найважливіших резервів у справі підвищення врожайності суниці є науково обгрунтоване застосування регуляторів росту. Вони є своєрідним «інструментом» рослинного організму, що впливає на перебіг фізіологічних процесів і дає змогу змінити обмін речовин. Нині накопичено значний фактичний матеріал, що висвітлює вплив регуляторів росту на рослини. Зокрема, їх використовують для прискорення росту розсади, збільшення врожайності та підвищення якості ягід суниці садової.

Застосування регуляторів росту рослин у практиці дає змогу отримати зрушення в обміні речовин, ідентичні тим, що виникають під впливом певних зовнішніх умов (тривалості дня, температури), наприклад, прискорити утворення генеративних органів, посилити або загальмувати ріст тощо. Регулятори росту використовують головним чином у вигляді розчинів і дисперсій шляхом обприскування рослин у стадії вегетації або обробки насіння[47].

Відомо, що цілу низку регуляторів росту успішно використовують у розсадниках суниці для обробки садивного матеріалу та дорослих рослин (гібереліни, ауксини, α -нафтилоцтова кислота, бензиладенін та ін.). Їх застосування сприяє збільшенню кількості квітконосів, підвищенню врожайності та якості вирощуваної продукції, формуванню в рослин стійкості до інфекцій, поліпшенню зав'язування плодів[48].

Вивчено ефективність застосування деяких регуляторів росту на рослини суниці садової в польових умовах. Досліджувані препарати чинили стимулювальні та адаптогенні ефекти з широким спектром фізіологічної дії: підвищували швидкість розмноження та потенційну продуктивність рослин, покращували вкорінюваність молодих розеток, оптимізували водний баланс. Використання регуляторів росту рослин дало змогу збільшувати вусоутворювальну здатність суниці в 1,5-2 рази. Потенційна продуктивність під дією всіх регуляторів росту зростала до 120-197%, при цьому збільшувалася як кількість квітконосів, так і кількість плодоеlementів на квітконосі. Часто спостерігалася сортоспецифічність дії препаратів, і хоча на

різних сортах оптимально діяли різні концентрації препаратів, дані регулятори росту можна використовувати як досить потужні фактори, які впливають на ріст і розвиток рослин суниці, що підтверджує їхню універсальність[49].

У сучасних біотехнологічних технологіях велике практичне значення регуляторів росту визначається багатьма обставинами: впливаючи в малих дозах на процеси метаболізму рослин, вони призводить до значних змін у рості та розвитку. При цьому регулятори росту розглядаються як екологічно чистий та економічно вигідний спосіб підвищення врожайності сільськогосподарських культур, що дозволяє повніше реалізовувати потенційні можливості рослинних організмів.

Аналіз літературних даних свідчить про доцільність застосування регуляторів росту нового покоління, з високою ефективністю дії в мінімальних дозах і максимальною безпекою та екологічністю, для передпосівної обробки насіння, прискорення росту та розвитку вегетативних і генеративних утворень, підвищення врожайності рослин суниці садової та ін[50].

Вивчення впливу регуляторів росту нового покоління на інтенсивність вусоутворення та продуктивність ремонтантних сортів суниці садової з низькою вусоутворювальною здатністю, з урахуванням конкретних ґрунтово-кліматичних умов і сортових особливостей, є актуальним.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Вибір експланта в мікроклональному розмноженні відіграє важливу роль у подальшій індукції процесів росту і розвитку в культурі *in vitro*. Під час вибору експланта необхідно враховувати: вид рослини, фази розвитку рослини та розвитку органів, з яких узято експлант, а також пори року.

Матеріалом для досліджень були пелюстки розміром 2-3 мм, ізольовані з бутонів завдовжки 3-4 мм, фрагменти основ листових дисків розміром 2×2 мм, ізольовані у фазу розкриття листка, та апекси вусів завдовжки 1-2 мм.

У дослідженнях були використані рослини сортів суниці садової Альбїон та Мурано.

1. Альбїон (Albion):

Походження: США

Тип плодоношення: ремонтантний (безперервне плодоношення з травня до пізньої осені)

Форма ягід: великі, конічні, темно-червоні

Смак: солодкий, насичений аромат

Вага ягід: 30-50 г

Врожайність: висока (до 2 кг з куща за сезон)

Стійкість: витривалий до спеки, хвороб, добре переносить транспортування

Особливості: потребує гарного зволоження, але не терпить застою води

2. Мурано (Murano):

Походження: Італія

Тип плодоношення: ремонтантний, безперервне плодоношення з травня до заморозків

Форма ягід: округло-конічні, яскраво-червоні

Смак: збалансований, солодко-кислий

Вага ягід: 25-40 г

Врожайність: висока (до 1,5 кг з куща)

Стійкість: добре переносить спеку, стійкий до грибкових хвороб

Особливості: швидке дозрівання плодів, добре росте як у відкритому ґрунті, так і в теплицях.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Стерилізація рослинного матеріалу

Для оптимізації стадії стерилізації рослинної сировини було випробувано різні стерилізуючі агенти: гіпохлорит натрію, перманганат калію, етанол.

Стерилізацію проводили в кілька етапів. Рослинний матеріал промивали в проточній водопровідній воді з мильним розчином. Далі посадковий матеріал кілька разів промивали стерильною дистильованою водою. Зрізавши листя, зародки поміщали в стерильні склянки і послідовно обробляли розчинами стерилізуючих агентів. Як змінний параметр змінюється відсотковий склад об'єкта, що стерилізується, "Білизна", а також час витримки етанолу. "Білизна" використовується в таких відсотках: 20%, 15% і 10%, а відсотковий вміст етанолу і перманганату калію залишається незмінним. При зміні відсоткового вмісту виробів, що стерилізуються, було обрано оптимальну концентрацію для подальшої стерилізації.

Щоб визначити ступінь стерилізації, потрібно помістити експланти в спеціальні колби в умовах повної темряви за кімнатної температури на тиждень. Через тиждень ми побачили, де був заражений матеріал, і видалили його [48].

2.2.2. Культивування in vitro

Сучасна технологія клонального мікророзмноження суниці заснована на культивуванні апікальних меристем. Для культивування *in vitro* суниці садової найчастіше застосовуються апекси пагонів-вусів, адже даний тип експланта є оптимальним для масового *in vitro* розмноження суниці садової.

Для введення в культуру використовували пелюстки розміром 2-3 мм, ізольовані з бутонів завдовжки 3-4 мм, фрагменти основ листових дисків розміром 2×2 мм, ізольовані у фазу розкриття листка, та апекси вусів завдовжки 1-2 мм.

2.2.3 Клональне мікророзмноження

Регенерацію рослин у культурі *in vitro* проводили на агаризованому поживному середовищі, що має мінеральну основу Мурасіге-Скуга, містить сахарозу, регулятори росту в різних концентраціях, згідно з отриманими позитивними результатами різних авторів.

Таблиця 2.1 - Склад живильного середовища Мурасіге-Скуга (MS)

Компоненти поживного середовища	Концентрація, мг/л		
	Середовище для індукції морфогенезу експлантів	Середовище для проліферації пагонів	Середовище для вкорінення пагонів
Макроелементи			
CaCl ₂ × 2H ₂ O / безводний	440 / 340	440	440
KH ₂ PO ₄	170	170	170
KNO ₃	1900	1900	1900
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
Мікроелементи			
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA × H ₂ O	37,3	37,3	37,3
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,025
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
KJ	0,83	0,83	0,83
MnSO ₄ × H ₂ O	16,9	16,9	16,9
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25	0,25	0,25
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Органічні сполуки			
Інозитол	100	100	100
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5
Піридоксин × HCl	0,5	0,5	0,5
Тіамін × HCl	0,1	0,1	0,1
Гліцин	2,0	2,0	2,0
Сахароза	30000	30000	30000
Агар-агар	6000	6000	6000
Гормони (регулятори росту)			
6-бензиладенін (БА)	0,5	0,5	-

індолілмасляна кислота (ІМК)	-	0,1	0,5
pH	5,6		

Основу використовуюваного нами поживного середовища становить маточний розчин, що містить необхідні макро- і мікроелементи, вітаміни та органічні сполуки за табл. 2.1. Залежно від етапу культивування додавали фітогормони в різних поєднаннях і концентраціях. Усі вихідні розчини для приготування поживних середовищ зберігали в холодильнику за температури +2...+4°C. Для приготування 1 літра агаризованого живильного середовища використовували 2 колби об'ємом 1 літр кожна. На кожній колбі робили позначку, що відповідає об'єму 500 мл (половина заданого об'єму). У колбу №1 наливали невелику кількість дистильованої води, додавали 6 г агару і доводили об'єм до 500 мл дистильованою водою, після чого колбу з розчином нагрівали на електричній плитці до повного розчинення агару (розчин має стати прозорим).

У колбу №2, додавали 100 мл розчину мікро- та макроелементів, 30 г сахарози та гормони в різних поєднаннях і концентраціях залежно від етапу культивування - цитокініни та ауксини, потім доводили об'єм до 500 мл дистильованою водою. Після розчинення компонентів доводили рН розчину до кислотності 5,6 за допомогою 1н NaOH, після чого розчин у колбі №2 також нагрівали.

Коли розчини в обох колбах досягали приблизно однакової температури та ставали прозорими, вміст колб зливали в одну та нагрівали до появи невеликих бульбашок. Приготоване середовище розливали по культиваційних посудинах - колбах і пробірках, ізолювали алюмінієвою фольгою, потім стерилізували лабораторному стерилізаторі в режимі 2 рази по 15 хвилин. Простерилізоване живильне середовище після застигання готове до використання.

Стерильні бутони, листя і фрагменти пагонів препарували в чашках Петрі. Оптимальний розмір експланта для культури суниці вважається 2-3 мм. З бутонів виділяли пелюстки, з листя - фрагменти основ розміром 2×2 мм, з

пагонів-вусів - апекси (конус наростання) довжиною 1-2 мм. Виділені експланти поміщали в культивацийні судини на поживне середовище MS, що містить 6-бензиладенін (БА) у концентрації 0,5 мг/л. Першу добу після введення експлантів у культуру *in vitro* культивацийні судини утримували в темряві. Після чого введений *in vitro* матеріал культивували при температурі +20...+23°C у світловій кімнаті за інтенсивності освітлення 4000-5000 люкс і 16-годинного фотоперіоду протягом 4-5 тижнів. Отримані в ході морфогенезу пагони розділяли і переносили на середовище MS, що містить БА 0,5 мг/л та індолілмасляну кислоту (ІМК) 0,1 мг/л. Після кількох пасажів, сформовані трансплантати завдовжки 30-40 мм, що мають щонайменше три добре розвинені листки, переносили на середовище для вкорінення, що містило ІМК у концентрації 0,5 мг/л.

Після утворення кореневої системи, що складалася з 3-5 коренів довжиною 10-20 мм, рослини-регенеранти адаптували до звичайних умов середовища - умов *ex vitro*. Для адаптації до нового газового складу, до повітря з меншою вологістю та інфекційного навантаження в кришках культивацийних посудин проробляли отвори, які розширювали в міру адаптації рослин.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Підбір оптимальних умов стерилізації рослинного матеріалу

Сувору стерильність є обов'язковою умовою для роботи з ізольованою культурою тканин. Відповідно до умов асептики при виконанні робіт з вирощування рослин *in vitro* операційне приміщення, в якому проводиться утеплення і посадка сільськогосподарських культур, одяг і руки робочого персоналу, інструменти, які використовуються для вирощування об'єктів, всі необхідні інструменти і матеріали, поживні середовища та об'єкти вирощування повинні бути стерилізовані. Як показує практика, необережність, допущена під час експерименту, навіть якщо робоче місце добре обладнане, зводить нанівець усі докладені зусилля. Тому чистота набагато важливіша за складне спеціальне обладнання.

Головною умовою успішного культивування та вирощування калюсних і суспензійних культур є стерилізація рослинних об'єктів, що полягає у знищенні грибних і бактеріальних спор на зовнішній поверхні без пошкодження внутрішніх тканин. Для цього використовують різні стерилізувальні речовини.

Тип стерилізуючого агента, його концентрація та тривалість застосування залежать від щільності та чутливості тканини, що стерилізується. Правильний вибір стерилізуючого агента полягає в тому, що він чинить шкідливий вплив на всі мікроорганізми і водночас мінімально пошкоджує тканини. Ще однією важливою умовою є те, що стерилізатор має бути легко видалений із тканини шляхом промивання її дистильованою водою або розкладання. В іншому разі відбувається отруєння тканин, що негативно позначається на утворенні та рості калюса.

Для стерилізації основних об'єктів дослідження, нами проведено етап підбору умов стерилізації. Як стерилізуючі агенти використовувалися: "Білизна", 70% етанол і перманганат калію. Підбір стерилізуючих умов проводили в трьох варіантах: у першому варіанті відсотковий склад "Білизни"

становив 20%, у другому - 10 %, у третьому - 15%. Процентний вміст 70% етанолу і 0,1% розчину перманганату калію залишався незмінним у всіх варіантах. При цьому в кожному з варіантів час витримки експлантів у 0,1% розчині перманганату калію був різним. У першому варіанті - 4 хвилини, у другому - 3 хвилини, у третьому - 2 хвилини, відповідно.

Попередньо підготовлені експланти промивали в проточній воді. Експлант тримали деякий час в етанолі, після чого в розчині гіпохлориду натрію, а потім у перманганаті калію. Далі посадковий матеріал кілька разів промивали стерильною дистильованою водою, а потім поміщали в живильне середовище.

Пробірки з експлантами потім поміщали у темну кімнату за кімнатної температури на два тижень, щоб визначити ступінь стерильності. Загалом на даному етапі дослідження використовували 3 способи проведення стерилізації експланту, склад і час експозиції в яких представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 - Підбір умов стерилізації

<i>Варіанти стерилізації</i>	<i>Концентрація стерилізуючого агенту</i>	<i>Обробка, хв</i>
1 варіант		
Мильний розчин		30
Гіпохлорид натрію	20	10
Перманганат калію	0,1	4
Етанол	70	5
H ₂ O	дист	30
2 варіант		
Мильний розчин		30
Гіпохлорид натрію	10	10
Перманганат калію	0,1	3
Етанол	70	5

H ₂ O	дист	30
3 варіант		
Мильний розчин		30
Гіпохлорид натрію	15	10
Перманганат калію	0,1	2
Етанол	70	5
H ₂ O	дист	30

Оцінку ефективності всіх 3 способів обробки проводили за співвідношенням числа інфікованих/стерильних експлантів по відношенню до загальної кількості введених у культуру експлантів (таблиця 3.2).

Протягом 3-4 тижнів після стерилізації ми спостерігали заростання при обробленні 1 способом, на 9 день культивування.

Таблиця 3.2.

1 спосіб		2 спосіб		3 спосіб	
Відсоток інфікованих, %	Відсоток стерильних, %	Відсоток інфікованих, %	Відсоток стерильних, %	Відсоток інфікованих, %	Відсоток стерильних, %
95	5	60	40	15	85

Як видно з табл. 3.2., для всіх даних умов стерилізації, результати дослідження були досить різні.

Аналіз результатів, отриманих у даному експерименті, показав, що перший варіант стерилізації виявився малоефективним для стерилізації експлантів. Первинне бактеріальне зараження, було помічене на 9 день культивування.

Дані у таб. свідчать про те, що відсоткове співвідношення заражених експлантів по відношенню до здорових складає 95/5. Стерилізація першим способом не була успішною.

З огляду на те, що цей варіант стерилізації проводився в трьох повтореннях, і результати кожного майже не відрізнялися, було зроблено висновок, що цей спосіб стерилізації не підходить.

Результати, отримані при використанні другого способу стерилізації також свідчать про, те що стерилізація не була успішною.

Третій варіант стерилізації виявився найоптимальнішим з метою обробки експлантів для введення у культуру *in vitro*. Частка інфікованих експлантів склала 10%, тоді як 90% експлантів культивувалися без зараження.

Таким чином, на основі отриманих даних аналізу ефективності способів стерилізації експлантів суниці для введення їх у культуру *in vitro* оптимальним виявився 3 варіант.

3.2. Культивування *in vitro* апекса вуса і фрагмента листка

Сучасна технологія клонального мікророзмноження суниці заснована на культивуванні апікальних меристем. Для культивування *in vitro* суниці садової найчастіше застосовують апекси пагонів-вусів. Для введення в культуру використовували апекси молодих пагонів-вусів завдовжки 1-2 мм і фрагменти основ листових пластинок розміром 2×2 мм.

3.2.1 Морфогенез експлантів

У проведених нами дослідженнях відмічено, що культивування апексів вусів і фрагментів листка суниці садової на середовищі MS із додаванням цитокініну 6-бензиладенін (БА) у концентрації 0,5 мг/л, дало змогу отримати від 10,0 до 86,7% життєздатних експлантів залежно від сорту. Більш життєздатними у всіх сортів виявилися апекси вусів. Частка регенеруючих експлантів становила 83,3-86,7%. Частка життєздатних експлантів листового походження була значно нижчою - 10,0-20,0%. Частка листових експлантів ремонтантних сортів, що регенерують, була порівняно невисокою.

Після закінчення 25-35 діб культивування на морфогенних експлантах формувалися бруньки і пагони. На експлантах з апексів вусів сформувалося

2,3-3,7 бруньок і 1,6-3,0 пагонів, а на експлантах листового походження – 3,3-3,8 бруньок і 2,7-3,0 пагонів у перерахунку на один експлант (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 - Утворення бруньок і морфогенез в апексів вусів і фрагментів листка суниці садової (середовище MS, БА 0,5 мг/л; сахароза 30 г/л, агар 6 г/л; рН 5,6)

Сорт	Тип експланта	Висаджено експлантів, шт	Число життєздатних експлантів		Утворилося в середньому	
			шт.	%±Sp	бруньок, шт./експлант	пагонів, шт./експлант
Альбїон	апекс вуса	60	50	83,3±4,8	2,3	1,6
	листок	60	6	10,0±3,9	3,3	2,7
Мурано	апекс вуса	60	52	86,7±4,4	3,7	3,0
	листок	60	12	20,0±5,2	3,8	3,0

Пагони, що утворилися, розділяли і переносили на свіжоприготоване середовище MS, яке містило БА в концентрації 0,5 мг/л та індолілмасляну кислоту (ІМК) в концентрації 0,1 мг/л, для індукції проліферації придаткових пагонів.

3.2.2 Індукція утворення пагонів

За подальшого культивування у ремонтантних сортів за інтенсивністю морфогенезу переважали конгломерати, що сформувалися з апексів вусів, порівняно з конгломератами листового походження. У сорту Мурано значення коефіцієнтів розмноження пагонів як апікального (5,1 бруньок і 4,7 пагонів), так і листового походження (5,2 бруньок і 4,9 пагонів) виявилися близькими (табл. 3.4). Морфогенні конгломерати, що розрослися, розділяли на пагони, які переносили на свіжі середовища того ж складу (БА 0,5 мг/л + ІМК 0,1 мг/л).

Найбільший коефіцієнт розмноження відмічено у пагонів сорту Мурано. Рослини даного сорту в польових умовах добре розмножуються вегетативно за рахунок інтенсивного вусоутворення. Це пояснює гарний морфогенез і в умовах *in vitro*, оскільки клональне мікророзмноження є різновидом

вегетативного розмноження. Вищими показниками вирізнявся сорт Альбїон - 4,6 бруньок та 4,3 пагонів на конгломерат. Частка пагонів, що сформували нові бруньки та пагони, становила 94,4-96,2% (табл. 3.4).

Таблиця 3.4. - Утворення бруньок і пагонів у суниці садової *in vitro* (середовище MS, БА 0,5 мг/л, ІМК 0,1 мг/л; сахароза 30 г/л, агар 6 г/л; рН 5,6)

Сорт	Тип експланту	Висаджено пагонів, шт.	Отримано морфогенних конгломератів		Утворилося в середньому	
			шт.	%±Sp	бруньок, шт./конгломерат	пагонів, шт./конгломерат
Альбїон	апекс вуса	156	148	94,9±1,8	4,6	4,3
	листок	36	34	94,4±3,8	1,9	1,6
Мурано	апекс вуса	132	127	96,2±1,7	5,1	4,7
	листок	160	151	94,4±1,8	5,2	4,9

У міру розростання конгломератів їх знову розділяли на пагони і пересаджували на свіже середовище MS того ж складу. Після 3-4 пасажів формувалися пагони з кількома добре розвиненими листками.

3.2.3 Укорінення пагонів та отримання рослин-регенерантів

Пагони завдовжки 25-30 мм, що мають не менше трьох добре розвинених трійчастих листків, переносили на середовище MS, яке містило ауксин ІМК у концентрації 0,5 мг/л для індукування ризогенезу. Через 3-4 тижні формувалося коріння, а також тривав ріст і утворення нових листків.

Частка вкорінених пагонів у всіх варіантах була досить високою - 85,0-98,0%. Показники відсотка вкорінених пагонів залежно від їхнього походження в межах сорту, загалом, різнилися незначно. З апекса вуса 85,0-97,6% пагонів сформували коріння, а з фрагмента листка - 87,1-98,0% (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5. - Укорінення пагонів суниці садової (середовище MS, ІМК 0,5 мг/л; сахароза 30 г/л, агар 6 г/л; рН 5,6)

Сорт	Тип експланту	Вивчено пагонів, шт.	Утворилося пагонів із корінням	
			шт.	%±Sp
Альбїон	апекс вуса	107	91	85,0±3,5
	листок	75	68	87,1±3,4
Мурано	апекс вуса	208	203	97,6±1,1
	листок	204	200	98,0±1,0

3.3 Культивування *in vitro* пелюстки

Нами були проведені пошукові роботи з культивування пелюсток суниці садової на поживних середовищах із вмістом фітогормонів у різних поєднаннях і концентраціях. Матеріалом для досліджень були пелюстки розміром 2-3 мм, ізольовані із закритих бутонів завдовжки 3-4 мм.

Закладку проводили на середовище MS із трьома варіантами поєднань гормонів:

- 1) БА 0,5 мг/л - стандартний варіант середовища для введення суниці в культуру *in vitro*;
- 2) БА 1 мг/л + α -нафтилоцтова кислота (ННК) 0,1 мг/л;
- 3) БА 2 мг/л + ННК 2 мг/л.

3.3.1 Індуція морфогенезу та калусогенезу пелюсток

На 12-14-ту добу після введення пелюстки починали зеленіти та розростатися, що тривало протягом трьох тижнів. За цей час, на 33-35 добу культивування, пелюстки ставали рівномірно зеленими і збільшувалися в розмірах у 2-3 рази, досягаючи 5-6 мм. На 40-42-гу добу кількість життєздатних експлантів зменшилася - деякі починали буріти, проте на деяких почалися морфо- і калусогенні процеси - з'явилися бруньки або зачатки калюса. На 50-55-ту добу культивування у регенеруючих експлантів сформувалися бруньки або калюси, а пелюстки, що залишилися, остаточно побуріли, так і не сформувавши морфогенних утворень.

Число життєздатних регенеруючих експлантів виявилося невисоким. Тільки на середовищі з додаванням БА і НУК по 2 мг/л морфо- або калюсогенез був відмічений у всіх вивчених сортів. Частка морфогенних експлантів становила 18,2- 42,9%. (табл. 3.6.).

Таблиця 3.6 - Життєздатність пелюсток суниці садової на різних термінах культивування in vitro (середовище MS, сахароза 30 г/л, агар 6 г/л, рН 5,6)

Сорт	Варіант середовища (концентрація гормонів, мг/л)	Висаджено пелюсток, шт.	Частка життєздатних експлантів, %		
			доба культивування		
			35	42	56
Альбійон	БА 0,5	74	95,9±2,3	39,2±5,7	0±0
	БА 1 + НУК 0,1	23	86,9±7,0	26,1±9,2	4,3±4,2
	БА 2 + НУК 2	28	89,3±5,8	67,9±8,8	42,9±9,4
Мурано	БА 0,5	84	85,7±3,8	39,3±5,3	0±0
	БА 1 + НУК 0,1	20	100±0	25,0±9,7	0±0
	БА 2 + НУК 2	22	100±0	45,5±10,6	18,2±8,2

Частка інфікованих експлантів на всіх варіантах середовищ була невеликою - 0-28,6%, переважна більшість пелюсток залишалися неураженими, середовище зберігалось чистим. Низька життєздатність експлантів була зумовлена переважно некротичними процесами тканин пелюсток - від 46,4 до 100 % висаджених пелюсток буріли та відмирали, і меншою мірою інфікуванням (табл. 3.7.).

Таблиця 3.7. - Частка нежиттєздатних пелюсток суниці садової (середовище MS, сахароза 30 г/л, агар 6 г/л, рН 5,6)

Сорт	Варіант середовища (концентрація гормонів, мг/л)	Висаджено пелюсток, шт.	Утворилося інфікованих експлантів		Утворилося експлантів із некрозом	
			шт.	%±Sp	шт.	%±Sp
Альбійон	БА 0,5	108	12	11,1±3,0	96	88,9±3,0
	БА 1 + НУК 0,1	30	0	0±0	30	100±0
	БА 2 + НУК 2	28	8	28,6±8,5	13	46,4±9,4
	БА 0,5	84	12	14,3±3,8	72	85,7±3,8

Мурано	БА 1 + НУК 0,1	20	0	0±0	20	100±0
	БА 2 + НУК 2	22	0	0±0	18	81,8±8,2

На середовищі з підвищеним вмістом гормонів (з 2 мг/л БА і НУК) частка морфо- і калусогенних експлантів виявилася найбільшою і становила 18,2- 42,9%. У всіх сортів у цьому варіанті був відзначений переважно калусогенез. Утворені калюси були округлої форми, розміром від 3 до 8 мм. Частка морфо- і калусогенних експлантів на інших варіантах середовищ була дуже низькою і становила не більше 4,3% (табл.3.8.).

У сорту Альбїон із тканин пелюстки утворилися адвентивні бруньки на середовищі, яке містило 1 мг/л БА і 0,1 мг/л НУК, і на середовищі з 2 мг/л БА і НУК, а в сорту Мурано - на середовищі з БА в концентрації 0,5 мг/л.

Таблиця 3.8. - Морфогенез і калусогенез пелюсток суниці садової (середовище MS, сахароза 30 г/л, агар 6 г/л, рН 5,6)

Сорт	Варіант середовища (концентрація гормонів, мг/л)	Висаджено пелюсток, шт.	Отримано морфо- та калусогенних експлантів		Число експлантів із бруньками		Число експлантів із калусом	
			шт.	%±Sp	шт.	%±Sp	шт.	%±Sp
Альбїон	БА 0,5	74	0	0±0	-	-	-	-
	БА 1 + НУК 0,1	23	1	4,3±4,2	1	100±0	0	-
	БА 2 + НУК 2	28	12	42,9±9,4	1	8,3±7,9	11	91,7±7,9
Мурано	БА 0,5	84	0	0±0	-	-	-	-
	БА 1 + НУК 0,1	20	0	0±0	-	-	-	-
	БА 2 + НУК 2	22	4	18,2±8,2	0	-	4	100±0

3.3.2 Морфогенез пелюсток і проліферація пагонів

На експлантах сорту Альбїон сформувалося по 3 бруньки та 2 пагони на експлант. У сорту Мурано на пелюстках утворилося в середньому 3,5 бруньки і 3,0 пагона на експлант (табл. 3.9.).

Таблиця 3.9. - Утворення бруньок і морфогенез пелюсток суниці садової (середовище MS, сахароза 30 г/л, агар 6 г/л, рН 5,6)

			Отримано	Утворилося в
--	--	--	----------	--------------

Сорт	Варіант середовища	Висаджено	морфогенн		бруньок, шт./експлант	пагонів, шт./експлант
			шт.	%±Sp		
Альбїон	БА 1 + НУК 0,1	23	1	4,3±4,2	3,0	2,0
	БА 2 + НУК 2	28	1	3,6±3,5	3,0	2,0
Мурано	БА 0,5	81	2	2,5±1,7	3,5	3,0

Пагони, що утворилися, розділяли і переносили на середовище MS, яке містило 0,5 мг/л БА і 0,1 мг/л ІМК, для індукції проліферації придаткових пагонів. На етапі розмноження у сорту Альбїон формувалося 2,8 бруньок і 2,3 пагона на один морфогенний конгломерат, у сорту Мурано коефіцієнт розмноження був вищим - 3,7 бруньок і 3,3 пагонів на конгломерат (табл. 3.10).

Таблиця 3.10 - Утворення бруньок і пагонів у суниці садової in vitro, отриманих із пелюстки (середовище MS, БА 0,5 мг/л, ІМК 0,1 мг/л; сахароза 30 г/л, агар 6 г/л; рН 5,6)

Сорт	Висаджено пагонів, шт.	Отримано морфогенних конгломератів		Утворилося в середньому	
		шт.	%±Sp	бруньок, шт./конгломерат	пагонів, шт./конгломерат
Альбїон	4	3	75,0±21,7	2,8	2,3
Мурано	6	5	83,3±15,2	3,7	3,3

У міру розростання конгломератів їх розділяли на пагони і пересаджували на свіже середовище MS того самого складу, після кількох пасажів формувалися пагони з кількома добре розвиненими листками.

Застосування апексів вусів як вихідного матеріалу для введення в культуру in vitro є універсальним і найбільш ефективним для розмноження всіх вивчених нами сортів суниці садової. У сортів з інтенсивним вусоутворенням морфогенетично активними є також і листові експланти. У ремонтантних сортів із низькою вусоутворювальною здатністю регенераційна

активність фрагментів листка значно нижча, ніж у експлантів апікального походження. Регенерація з пелюстки шляхом прямого морфогенезу виявилася можливою, проте морфогенетична активність пелюсток знову ж таки нижча, ніж у апексів вусів. Оскільки у досліджуваних ремонтантних сортів кількість апікальних експлантів (апексів вусів) може бути обмежена через характерну для них низьку вусоутворювальну здатність, припустимим є використання як додаткових вихідних експлантів фрагментів листка і пелюсток.

ВИСНОВКИ

На основі проведеного дослідження можна зробити наступні висновки:

1) Встановлено, що апекси вуса мають найбільшу морфогенетичну активність *in vitro*, їх застосування найефективніше для мікророзмноження ремонтантних сортів суниці садової з низькою вусоутворювальною здатністю, що дає змогу отримувати до 87 % життєздатних експлантів, які формують 1,6-3,0 пагонів на експлант і 2,1-4,3 пагонів на морфогенний конгломерат на етапі культивування.

2) Фрагменти листка ремонтантних сортів суниці садової мають меншу регенераційну активність *in vitro*, ніж апекси вусів (до 40% життєздатних експлантів, коефіцієнт розмноження 1,3-1,8 пагонів на конгломерат).

3) Культивування *in vitro* пелюсток суниці садової дає змогу отримати до 4,3 % морфогенних експлантів, які формують 2,0-3,0 пагона на експлант і 2,3-3,3 пагона на морфогенний конгломерат на етапі розмноження.

4) Серед вивчених ремонтантних сортів найбільшою життєздатністю та регенераційною активністю *in vitro* володіє сорт Альбїон, коефіцієнт розмноження становив 4,6 бруньок та 4,3 пагонів на конгломерат.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Giampieri, F.; Alvarez-Suarez, J.M.; Mazzoni, L.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; González-Paramàs, A.M.; Santos-Buelga, C.; Quiles, J.L.; Bompadre, S.; Mezzetti, B.; et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Molecules* 2014, 19, 7798–7816.
2. Etienne, H.; Berthouly, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *PCTOC* 2002, 69, 215–231.
3. Ariza, M.T.; Martínez-Ferri, E.; Domínguez, P.; Medina, J.J.; Miranda, L.; Soria, C. Effects of harvest time on functional compounds and fruit antioxidant capacity in ten strawberry cultivars. *J. Berry Res.* 2015, 5, 71–80.
4. Beattie, J.; Crozier, A.; Duthie, G.G. Potential Health Benefits of Berries. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2005, 1, 71–86.
5. Meyers, K.J.; Watkins, C.B.; Pritts, M.P.; Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6887–6892.
6. Hannum, S.M. Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 1–17.
7. Contreras-Paredes, C.A.; Silva-Rosales, L.; Gallegos, V.; Ortiz-Castellanos, M.L.; Jofre-Garfias, A.E.; Dávalos-González, P.A. Incidencia de Infecciones Virales Mezcladas en un Área de Producción de Fresa en Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2014, 32, 12–25.
8. Clavijo, R.; Beltrán, A.; Llauger, R.; Rodríguez, A.; Farrés, E.; García, M.E.; Placeres, J.; Betancourt, M.; Avalos, Y.; Rodríguez, M. Apuntes sobre el cultivo de la fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Rev. CitriFrut.* 2010, 27, 67–71.
9. Rojas, P.; Almada, R.D.; Sandoval, C.; Keller, K.E.; Martin, R.R.; Caligari, P.D.S. Occurrence of aphidborne viruses in southernmost South American populations of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Plant Pathol.* 2013, 62, 428–435.
10. Da Fonseca, A.P.; da Silva, E.C.; Pereira, M.B.; de Oliveira, R.P.; Dornelles, A.L.C. Phenotypic stability of strawberry genotypes subjected to variable number of in vitro subcultures. *Ciencia Rural* 2013, 43, 1345–1350.
11. Quiroz, K.A.; Berríos, M.; Carrasco, B.; Retamales, J.B.; Caligari, P.D.S.; García-González, R. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biol. Res.* 2017, 50, 20.
12. Niedz, R.P.; Bausher, M.G. Control of In vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* 2002, 38, 468–471.
13. Sirijan, M.; Pipattanawong, N.; Chaiprasart, P. Effect of 1-naphthalene acetic acid and 6-benzyladenine on micropropagation of strawberry cultivar ‘Praratchatan No. 80’. *Agr. Nat. Resour.* 2019, 53, 355–363.

14. Diengngan, S.; Murthy, B.N.S.; Mahadevamma, M. Effective Decontamination and Regeneration Protocol for In Vitro Culture of Strawberry Cv. Chandler. *J. Hort. Sci.* 2014, 9, 126–130.
15. Haddadi, F.; Aziz, M.A.; Saleh, G.; Rashid, A.A.; Kamaladini, H. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from In Vitro Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortScience* 2010, 45, 453–456.
16. Rahman, W.; Zohora, S.; Talukder, A.I.; Kayess, O. Effect of different hormone combinations on callus induction and plant regeneration of strawberry. *Int. J. Adv. Res.* 2015, 3, 1244–1250.
17. Dutta, C.; Sen, D. In Vitro Propagation in Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Indian J. Hill Farming* 2019, 2019, 77–81.
18. Nehra, N.S.; Kartha, K.K.; Stushnoff, C.; Giles, K.L. Effect of in vitro propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. *Euphytica* 1994, 76, 107–115.
19. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 1962, 15, 473–497.
20. Casierra-Posada, F.; Peña, G.R.; Peña-Olmos, J.E. Estimación indirecta del área foliar en *Fragaria vesca* L., *Physalis peruviana* L., *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, *Rubus glaucus* L., *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey Y. *Ficus Carica* L. *Rev. UDCA Act. Div. Cient.* 2008, 11, 95–102.
21. Moradi, K.; Otroshy, M.; Azimi, M.R. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. *Int. J. Agric. Technol.* 2011, 7, 1755–1763.
22. García-González, R.; Quiroz, K.; Carrasco, B.; Caligari, P. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cienc. Inv. Agr.* 2010, 37, 5–30.
23. Ko, C.; Al-Abdulkarim, A.M.; Al-Jowid, S.M.; Al-Baiz., A. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8, 2611–2615.
24. Munir, M.; Iqbal, S.; Baloch, J.U.D.; Khakwani, A.A. In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars. *J. Appl. Hort.* 2015, 17, 192–198.
25. Bhatia, P.; Ashwath, N. Improving the Quality of in vitro Cultured Shoots of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Red Coat). *Biotechnology* 2008, 7, 188–193.
26. Cüce, M.; Bektaş, E.; Sökmen, A. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. *Turk. J. Agric. For.* 2013, 37, 40–44.
27. Debnath, A.J.; Gangopadhyay, G.; Basu, D.; Sikdar, S.R. An efficient protocol for in vitro direct shoot organogenesis of *Sesamum indicum* L. using cotyledon as explant. *3Biotech* 2018, 8, 146.
28. Zakaria, H.; Hussein, G.M.; Abdel-Hadi, A.-H.A.; Abdallah, N.A. Improved regeneration and transformation protocols for three strawberry cultivars. *GM Crops Food* 2013, 5, 27–35.

29. Domínguez, G.; Donayre, M.L. Acclimatación de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. producida in vitro. *Ecología Aplicada* 2006, 5, 67–74
30. Valencia-Juárez, M.C.; Escobedo-López, D.; Díaz-Espino, L.F.; González-Pérez, E. Acclimatación ex vitro de plántulas de *Fragaria × ananassa* Duch. *Rev. Mex. Cienc. Agrícolas* 2019, 10, 91–100.
31. Jofre-Garfias, A.E.; Vazquez-Sanchez, M.N.; Hernandez-Razo, A.R.; Davalos-Gonzalez, P.A. Production and Acclimatization of In Vitro Produced Strawberry Plants. *Acta Hort.* 2006, 727, 67–72.
32. Peixe, A.; Raposo, A.; Lourenço, R.; Cardoso, H.; Macedo, E. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Sci. Hortic.* 2007, 113, 1–7.
33. Prando, M.A.; Chiavazza, P.; Faggio, A.; Contessa, C. Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L. *Sci. Hortic.* 2014, 171, 91–94.
34. Ajie, W.K.B.; Malinda, R.; Yuniastuti, E.; Yunus, A. In vitro micropropagation of Raja Bulu banana in medium supplemented with coconut water and NAA. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019, 250, 012014.
35. Dewir, Y.H.; El-Mahrouk, M.E.; Murthy, H.N.; Paek, K. Y. Micropropagation of *Cattleya*: Improved in vitro rooting and acclimatization. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2015, 56, 89–93.
36. Díaz, L.P.; Namur, J.J.; Bollati, S.A.; Arce, O.E.A. Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2010, 12, 27–40.
37. Eissa, F.M.; Fathi, M.A.; El-Shall, S.A. The role of humic acid and rootstock in enhancing salt tolerance of “Le-Conte” pear seedlings. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 2007, 32, 3651–3666.
38. Ismail, A.F.; Hussien, S.M.; El-Shall, S.A.; Fathi, M.A. Effect of irrigation and humic acid on Le-Conte pear. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 2007, 32, 7589–7603.
39. Haggag, F.; Shahin, M.F.M.; Mustafa, N.S.; Mahdy, H.A.; Hassan, H.S.A. Studies on the Effect of Vinasse, Amino acids and Humic Acid Substances as Soil Applications on Fruit Quality and Quantity of Manzanillo Olive Trees. *Middle East J. Appl. Sci.* 2015, 5, 984–991.
40. Lo, S.-F.; Nalawade, S.M.; Kuo, C.-L.; Chen, C.-L.; Tsay, H.-S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino—A medicinally important orchid. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2004, 40, 528–535.
41. Benati, J.A.; Nava, G.; Mayer, N.A. Spad index for diagnosis of nitrogen status in ‘Esmeralda’ peach. *Rev. Bras. Frutic.* 2021, 43, e093.
42. Ebrahimi, R.; Ebrahimi, F.; Ahmadizadeh, M. Effect of Different Substrates on Herbaceous Pigments and Chlorophyll Amount of Strawberry in Hydroponic Cultivation System. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2012, 12, 154–158.

43. Mixquititla-Casbis, G.; Villegas-Torres, O.G.; Andrade-Rodríguez, M.; Sotelo-Nava, H.; Cardoso-Taketa, A.T. Crecimiento, rendimiento y calidad de fresa por efecto del régimen nutrimental. *Rev. Mex. Cienc. Agrícolas* 2020, 11, 1337–1348.
44. Tembe, K.O.; Chemining'wa, G.N.; Ambuko, J.; Owino, W. Effect of water stress on yield and physiological traits among selected African tomato (*Solanum lycopersicum*) land races. *Int. J. Agron. Agric. Res.* 2017, 10, 78–85.
45. Grigatti, M.; Giorgioni, M.E.; Ciavatta, C. Compost-based growing media: Influence on growth and nutrient use of bedding plants. *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 3526–3534.
46. Borowski, E.; Nurzyński, J. Effect of different growing substrates on the plant water relations and marketable fruit yield greenhouse-grown tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Agrobot.* 2012, 65, 49–56.
47. Chaves, M.M.; Oliveira, M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 2004, 55, 2365–2384.
48. Lawlor, D.W.; Tezara, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.* 2009, 103, 561–579.
49. Degu, A.; Hochberg, U.; Wong, D.C.J.; Alberti, G.; Lazarovitch, N.; Peterlunger, E.; Castellarin, S.D.; Herrera, J.C.; Fait, A. Swift metabolite changes and leaf shedding are milestones in the acclimation process of grapevine under prolonged water stress. *BMC Plant Biol.* 2019, 19, 69.
50. Jones, H.G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 1998, 49, 387–398.