

УДК 631.53/.547.2-021.387:634.75:613.12

## Розробка окремих елементів протоколу сталого росту та розмноження суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в асептичних умовах

Мацкевич В.В. , Філіпова Л.М. , Мацкевич Ю.В. 

Білоцерківський національний аграрний університет



Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Мацкевич Ю.В. Розробка окремих елементів протоколу сталого росту та розмноження суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в асептичних умовах. «Агробіологія», 2023. № 2. С. 172–186.

Matskevych V., Filipova L., Matskevych Yu. Development of individual elements of a protocol for sustainable growth and propagation of garden strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) under aseptic conditions. «Agrobiology», 2023. no. 2, pp. 172–186.

Рукопис отримано: 03.10.2023 р.

Прийнято: 18.10.2023 р.

Затверджено до друку: 23.11.2023 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2023-183-2-172-186

Суниця садова (*Fragaria ananassa* Duch.) є одним із найцінніших фруктів, попит на який на продовольчому ринку стабільно високий. Одним з обмежуючих чинників одержання стабільно високих урожаїв високої якості суниці є наявність захворювань, спричинених бактеріями, фітоплазмами, вірусами, віроїдами. З метою інтенсифікації технології вирощування суниці садової актуальною є проблема виробництва у значних обсягах генетично константного, вільного від збудників хвороб матеріалу. Актуальними технологіями, які дозволяють масово виробляти садивний матеріал з високою фітосанітарною та генетичною якістю, є застосування біотехнологічних методів. Мета дослідження – оновлення протоколу мікроклонального розмноження суниці садової для отримання безвірусного садивного матеріалу. Дослідження проводили в умовах лабораторії мікроклонального розмноження ТОВ «Благодатне» (Тевітта™) Черкаської області на суниці садовій сортів Альба та Презент. Серія досліджень проведена за принципом «step by step» на двох типах експлантів: бруньки і меристеми.

Досліджено детермінанти отримання асептичної культури із брунькових та меристемних експлантів. Трофічний вплив досліджено на середовищах з різним умістом мінеральної частини (на етапі мультиплікації) та концентрацій сахарози на етапі ризогенезу.

Із фітогормональних детермінант на етапі мультиплікації серед досліджуваних кращою була комбінація речовин із цитокініновою активністю у складі: БАП 0,2 мг/л та кінетин 0,8 мг/л. Ефективним для збільшення коефіцієнта розмноження є додавання 0,1 мл/л препарату Gibb plus (ГК<sub>4</sub> + ГК<sub>7</sub>).

Вирощування донорів експлантів на середовищі із БАП 0,2 мг/л, кінетин 0,3 мг/л, аденін 0,5, порівняно з контролем – БАП 1,0 мг/л, покращує ризогенез регенерантів. Найвищі показники коренеутворення виявлено на варіанті із 4 % сахарози (40 г/л).

**Ключові слова:** розмноження, мікроклональне розмноження, асептична культура, трофічна і гормональна детермінація.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Суниця садова (*Fragaria ananassa* Duch.), що належить до родини Розоцвітих, є одним із найцінніших фруктів. Цінність суниці полягає у її смакових якостях, ароматі, свіжості, можливостях заморожування та переробки. Вона містить відносно велику кількість елагової кислоти, яка має широкий спектр біологічної активності. Також у її складі міститься багато корисних дієтичних компонентів, зокрема вітаміни, мінерали, фолієва кислота та

клітковина. Суниця садова є багатим джерелом фітохімічних сполук, представлених переважно поліфенолами, містить протиканцерогенні сполуки та допомагає запобігти віковій втраті пам'яті [1]. У плодах є сполуки, які знижують ризик серцево-судинних захворювань й тромбозів. Одна з ефективних протитромбозних речовин, які є в суниці, – аденозин [2].

Проте, незважаючи на високі споживчі, лікувальні якості та високий сільськогосподарський потенціал, є обмеження для її вирощування.

щування через наявність захворювань, зокрема спричинених бактеріями, фітоплазмами, вірусами, віроїдами. Це пов'язано з тим, що створені людиною штучні агробіоценози є нестійкими як до біотичних, так і абіотичних чинників, це призводить до фізіологічних та інфекційних захворювань.

За даними лабораторно-виробничого комплексу Фармер ЮА [3], в Україні на суниці найбільш поширені 16 фітопатогенів: 9 вірусів, 4 грибних збудника, 1 бактерія, 1 фітоплазма. В Інституті садівництва НААН (відділ вірусології, оздоровлення і розмноження плодівих і ягідних культур) для суниці проводять діагностику на такі внутріклітинні патогени [5]: 1. Вірус зморшкватості суниці (SCV). 2. Вірус легкого пожовтіння країв суниці (SMYEV). 3. Вірус крапчастості суниці (SMoV). 4. Вірус обрамлення жилок суниці (SVBV). 5. Вірус мозаїки резухи (ArMV). 6. Вірус кільцевої плямистості малини (RRSV). 7. Вірус латентної кільцевої плямистості суниці (SLRSV). 8. Вірус чорної кільчастості томатів (ToBRV). 9. Фітоплазми суниці. 10. Вірус кільцевої плямистості томатів (ToRSV). 11. Вірус мозаїки яблуні (ArMV).

Грибну й частково бактеріальну інфекцію можливо контролювати засобами захисту, проте віруси, віроїди і фітоплазми є внутрішньоклітинними паразитами. Їх достовірно можна позбутися, лише знищивши самого господаря.

Сприяє поширенню фітопатогенів розвиток логістичної індустрії, зокрема в аграрному розсадництві. Наприклад, список фітоплазм розширюється неєвропейськими фітоплазмами: *Cydonia* Mill., *Fragaria* L., *Malus* Mill., *Prunus* L., *Pyrus* L., *Ribes* L., *Rubus* L. і *Vitis* L. [4].

Більшість патогенів є поліфагами, тобто можуть мати багато господарів, що сприяє їх поширенню. Наприклад, фітоплазма, що спричинює жовтяницю айстр, заражає багато інших рослин, зокрема, моркву, селеру, суницю [6].

Фітоплазми – специфічна група фітопатогенних організмів, що мають проміжну форму життя між бактеріями та вірусами. Вони є поліморфними організмами. Клітини їх, здебільшого, округлі, але деякі мають подовжену або гантелеподібну форму. Один і той же фітоплазмовий організм може мати клітини різних розмірів і форм. Зокрема, у клітинах флоєми стовбурних рослин тютюну наявні фітоплазми сферичної, овальної, витягнутої та інших форм. Діаметр клітин 0,1–1 мкм [6]. Цей внутрішньоклітинний паразит на свою користь змінює вигляд й специфічні ознаки своїх господарів. Наприклад, рослини суниці із симптомами філодії, гіпертрофією сім'янок і почер-

вонінням листя [7]. Фітоплазми перетворюють квітки у листки, зумовлюють хворобливе розростання пагонів, збільшуючи привабливість рослини для комах – переносників фітоплазми. Хвора рослина втрачає здатність до розмноження й гине [8].

Фітоплазми не мають справжньої клітинної стінки, оточені тришаровою елементарною мембраною, чим відрізняються від бактерій. Порівняно з вірусами для них характерні клітинна будова та здатність розмножуватися на штучних живильних середовищах. На щільних середовищах вони утворюють дрібні специфічні колонії, що на вигляд нагадують «яєчно-глазуню». На відміну від вірусних частинок, у клітинах фітоплазм наявні два типи нуклеїнових кислот (ДНК та РНК) та рибосоми, за розмірами подібні до рибосом бактерій. Фітоплазми, на відміну від бактерій, є стійкими до пеніциліну, але порівняно з вірусами чутливі до тетрацикліну [8, 9].

Віруси є меншими за розмірами та простішої будови ніж фітоплазми. Ці патогени складаються з двох частин: носія генетичної інформації (ДНК або РНК) та захисної оболонки. Тимчасом ще простішими є віроїди, у яких є лише нуклеїнові кислоти. Віруси, віроїди не можуть жити поза клітинами жертв або переносників. Переносниками є найчастіше попелиці: сунична (*Chaetosiphon fragaefolii*), баштанна (*Aphis gossypii*), зелена персикова (*Myzus persicae*) [10]. Персистентні віруси здатні тривалий час зберігатися і навіть розмножуватися в організмі переносника.

До персистентних вірусів належить поширений вірус зморшкватості суниці (SCV). За введення очищеного вірусу SCV розмножується в попелицях [11]. Вірус слабкого пожовтіння країв суниці (*Strawberry mild yellow edge*, SMYE) – лише переноситься попелицями, тобто не розмножується в їх організмі декілька тижнів [8]. Вірус обрамлення жилок суниці (SVBV) живе в стилеті попелиці впродовж 1–4 діб, однак цього достатньо щоб за наявності незначної кількості вірусних рослин плантація на третій рік була без урожаю [12].

Не зважаючи на інтенсивне застосування пестицидів, посадковий матеріал може бути заражений збудниками грибних та бактеріальних хвороб: *Rhizoctonia*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora*, *Verticillium dahliae*, *Pythium*, *Colletotrichum* spp., *Mycosphaerella fragariae*, *Ramularia tulasnei*, *Phomopsis obscurans*, *Xanthomomas fragariae* [8].

Актуальними технологіями, які дозволяють масово виробляти садивний матеріал з високою фітосанітарною та генетичною якістю

є застосування біотехнологічних методів: культури меристем та ПЛР діагностика [15, 16]. Меристемні методи – це біотехнологічні процеси ізолювання, регенерації та культивування рослин *in vitro* для звільнення від патогенних та контамінуючих мікроорганізмів, які широко використовують для отримання однорідного генетичного матеріалу рослин впродовж короткого періоду часу і у промислових кількостях [17].

Першими, хто рекомендував використовувати культуру меристем для знищення вірусів *Fragaria* були P.W. Miller та R.O. Belkengren [18]. A.N. Adams першим застосував мікророзмноження полуниці [19]. S. Nishi та K. Oosawa розробили біотехнологічний спосіб масового розмноження безвірусних рослин суниці [20].

Ще у минулому столітті дослідники встановили, що рослинам *ex vitro* властива більша кількість листків та вища продуктивність погонів [21–23]. Подібні результати підтверджуються також в умовах комерційного промислового вирощування суниці, наприклад в Україні згідно з досвідом компанії Тевітта™ [24]. Не зважаючи на те, що мікроклональне розмноження (МКР) суниці триває понад пів століття [17–23], технологія потребує удосконалення, оптимізації.

**Мета дослідження** – оновлення протоколу отримання безвірусного садивного матеріалу суниці.

**Матеріал і методи дослідження.** Дослідження, а саме перші три з чотирьох етапів

МКР суниці сортів Альба та Презент, проводили в умовах лабораторії мікроклонального розмноження ТОВ “Благодатне” (Тевітта™) Черкаської області. Рослинні об’єкти культивували у скляних банках об’ємом 200 мл, накритих стійкими до автоклавування поліпропіленовими кришками (рис. 1).

У досліджах використовували три модифіковані агаризовані середовища, які відрізнялися за вмістом мінеральних елементів (табл. 1). Більшість дослідників у своїх дослідженнях із суницею застосовують пропис середовища за Мурасіге і Скугом [16, 19, 20, 22, 23, 25, 29] – універсальне середовище для багатьох культур (надалі MS). Також нами використано два прописи, які розроблено В. В. Мацкевичем: для актинїдії (№ 1) та малини (№ 2) [26]. Кислотність (рН)  $5,65 \pm 0,1$ .

Синтетичні аналоги гормонів, які належать до трьох класів, додавали згідно з етапами мікроклонального розмноження та схемами дослідів. Зокрема, це: ауксинова активність – індолілмасляна кислота (ІМК), індолілоцтова кислота (ІОК); цитокінінова активність – бензиламінопурин (БАП), кінетин та аденін; гіберелінова активність – гіберелова кислота № 3 (ГК<sub>3</sub>) та комерційний препарат Гібб плюс (Gibb plus) (Глобалхем Н.В.), що містить в собі суміш гіберелових кислот 4 і 7 (75 % ГК<sub>4</sub> і ГК<sub>7</sub>) [28].

Фотоперіод 16 годин на добу, інтенсивність освітлення 2,4 кЛюкс. Температура культивування  $24 \pm 2$  °С.

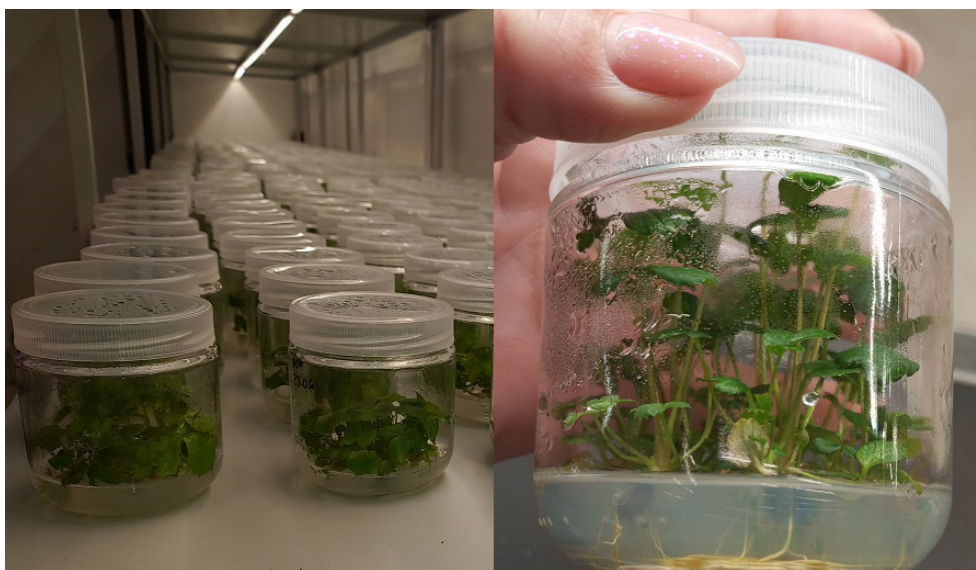


Рис. 1. Асептичне культивування об’єктів у ємностях об’ємом 200 мл.

Таблиця 1 – Мінеральні компоненти середовищ, мг/л

Компонент середовища	MS	№ 1	№ 2	
Макросолі				
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650,0	417	1250	
$\text{KNO}_3$	1900,0	367	1100	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170,0	324	970	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	257	770	
Сполуки кальцію				
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	-	293	440	
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	-	-	
Хелатні комплекси заліза				
*“зелений розчин”	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,80	18,54	34,75
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,30	24,7	46,63
“червоний розчин” – Ferrilene 4.8 Orto – Orto	-	62,17	114,63	
Мікроелементи				
$\text{H}_3\text{BO}_3$		6,2		
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$		22,3		
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$		0,025		
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$		0,025		
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		8,6		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$		0,25		
KJ		0,83		

\*Хелати заліза мали у першому випадку світло-зелений колір, а в іншому – насичений темно-червоний. Залежно від схеми окремих дослідів застосовували лише один із вказаних розчинів.

У дослідах використали два типи експлантів: бруньки і меристеми. Донорні рослини вирощували в умовах поля, закритого ґрунту та спеціалізованого приміщення – депозитарію. Для ізоляції експлантів взимку (11.01.2023) материнські рослини за два тижні заносили в опалюване приміщення. У депозитарії донори вирощували за розсіяного освітлення та контрольованого волого-температурного режиму із запобіганням появи переносників (кліщів, попелиць, трипсів та інших комах) збудників хвороб.

Стерилізацію матеріалу для ізоляції бруньок проводили у розчині препарату Бланіда-300 з попереднім замочуванням у розчинах фунгіциду Фунгіцид Магнікур Енерджі (Превікур Енерджі) згідно з раніше розробленими власними методиками [26, 27]. Наявність контамінантів (грибів, бактерій) визначали

візуально за їх появою на поверхні або помутніння живильного середовища.

МКР суниці, як і більшості культур, складається з наступних етапів:

- етап “0” – підготовчий (підбір та культивування донорів первинних експлантів);
- етап I – деконтамінація, первинне асептичне культивування;
- етап II – передбачає мультиплікацію рослин *in vitro*;
- етап III – індукція і власне процес ризогенезу в регенерантів;
- етап IV – постасептична адаптація *ex vitro* відбувається поза асептичної частини лабораторії в спеціалізованих приміщеннях закритого ґрунту.

Серія досліджень проведена за принципом «step by step». Тобто кращий варіант попереднього дослідження був контрольним у наступному.



**Результати дослідження та обговорення.** На етапі "0" встановили вплив способів підготовки материнських рослин донорів експлантів на ефективність деконтамінації та регенераційний потенціал брунькових і меристемних експлантів (табл. 2).

Встановлено сортову особливість щодо наявності контамінантів та кількості регенованих рослин з експлантів. Зокрема, сорт Альба за обома показниками в усіх трьох варіантах переважав сорт Презент. Найбільше випадків контамінування мікрофлорою як брунькових, так і меристемних експлантів, було на варіанті культивування донорних материнських рослин в умовах поля (відкритий ґрунт). Вважаємо, це пов'язано зі складністю контролювання поширення контамінантів. Причиною низького регенераційного потенціалу є факторонестатичні умови перебігу онтогенезу материнських рослин. Це впливає на проходження ембіонального етапу як бруньок, так і меристем, зокрема.

Отже, для подальших досліджень відібрано варіант вирощування донорів експлантів у депозитарії. З цих донорів ізолювали експланти у різні пори року. Не зважаючи на те, що приміщення депозитарію ізольоване від низки сезонних чинників впливу на приживлюваність та деконтамінацію, показники у варіантах були різними (табл. 3). Кращі показники як у випадку брунькових, так і меристемних експлантів, отримано за ізоляції експлантів 15.03.2023.

Технологічно найнижчі показники відмічено у випадку введення в асептичну культур експлантів у серпні. Встановлено також сортову реакцію на сезонність. За перших двох термінів ізоляції (11.01.2023 і 15.03.23) сорту Альба були властиві вищі показники регенерації, в останніх двох термінах (04.04.2023 та 07.08.2023) сорт Презент мав вищий відсоток експлантів, які регенерували. Стосовно кількості контамінованих експлантів за усіх чотирьох термінів відбору вищий відсоток був у сорту Презент як у брунькових, так і меристемних експлантів.

Таблиця 2 – Вплив умов вирощування донорів експлантів на їх контамінування та приживлюваність, % (ізоляція 11.01.2023)

Показник	Умови вирощування донорів експлантів					
	Депозитарій		Закритий ґрунт		Поле	
	Сорт					
	Альба	Презент	Альба	Презент	Альба	Презент
Бруньки						
Контаміновано, %	14	24	21	57	68	71
Прижилось, %	84	68	26	19	16	11
Меристеми						
Контаміновано, %	3	5	12	16	21	36
Прижилось, %	19	12	11	7	8	4

Таблиця 3 – Вплив сезонності контамінування та приживлюваність експлантів, %

Показник	Дата ізоляції донорів							
	11.01. 2023		15.03.23		04.04. 2023		07.08. 2023	
	Сорт							
	*А	П	А	П	А	П	А	П
Бруньки								
Контаміновано, %	14	24	19	30	11	16	24	32
Прижилось, %	84	68	86	79	61	65	53	62
Меристеми								
Контаміновано, %	3	5	5	7	5	6	11	19
Прижилось, %	19	12	27	23	18	19	13	15

\*Скороченням «А» відповідає сорт Альба, «П» – сорт Презент.

На етапах отримання асептичної культури та мультиплікації середовище MS використано як контрольне. В усі середовища додавали: бензиламінопурин (БАП) 1,0 мг/л та ІМК 0,1 мг/л.

Порівняння середовищ проводили, висаджуючи ізольовані бруньки та меристеми (табл. 4). Доцільність дослідження двох видів експлантів пов'язана з їх диференційованим застосуванням. Брунькові експланти дають менше калюсів і порівняно з меристемними мають швидші темпи регенерації. Їх технологічно доцільно використовувати за умов наявності маточних рослин, вільних за результатами діагностики від вірусів та інших збудників хвороб. Меристемні експланти попри довший період регенерації та менший відсоток приживання є єдиним видом експлантів, якщо донори експлантів містять збудники хвороб.

Експлантам на середовищі MS був властивий як прямий морфогенез, так і непрямий через калюсоутворення. Як відомо, непрямий морфогенез відбувається через дедиференціацію й потім деференціацію клітин калюсних тканин. На цих етапах зростає ймовірність втрати генетичної константності [17, 26]. Це є технологічно неприпустимим під час застосування біотехнологічних методів у розсадництві.

За порівняння двох типів експлантів на середовищах з однаковим умістом біологічно активних речовин встановлено, що менший відсоток експлантів з ознаками формування калюсних тканин був у брунькових експлантів. Зокрема, по сорту Альба у брунькових експлантів на контрольному середовищі було 4 % експлантів, тимчасом всього живими – 86 %, у сорту Президент відповідно 9 і 79 %.

У меристемних експлантів за меншої приживлюваності – всього 27 % у сорту Альба й 23 % у сорту Президент, калюсогенез становив відповідно 15 і 17 %. Також на контрольному середовищі була візуально більша кількість вітрифікованих регенерантів.

Серед порівнюваних середовищ для отримання регенерантів як з бруньок, так і з меристем, кращим було середовище № 1, яке мало відносно менший уміст мінеральних елементів (табл. 1). Вважаємо, що порівняно нижча концентрації елементів у живильному розчині зменшує стрес на етапі переходу рослинних об'єктів *in vivo* – *in vitro*.

Варіант середовища № 2 за досліджуваними показниками займав проміжне положення між MS та № 1.

Процеси морфогенезу детермінуються не лише трофічними елементами, а також біологічно активними речовинами, зокрема, біологічно активними речовинами вторинного походження (вторинними метаболітами). Вони не є джерелом енергії або будівельним матеріалом, однак визначають напрями і швидкість онтогенезу. Домінантними такими речовинами є фітогормони, або їх штучно синтезовані аналоги.

У дослідженнях на етапі отримання морфогенної асептичної культури випробувано такі синтетичні аналоги цитокінінів: бензиламінопурин, кінетин та речовина, з якої рослинні клітини самі синтезують природний цитокінін – бензиламінопурин (табл. 5). Порівняно варіанти із додаванням по 1,0 мг/л БАП, кінетину, аденіну та сумісне додавання цих цитокінінів у сумарній кількості 1,0 мг/л (три речовини по 0,333 мг/л).

Таблиця 4 – Особливості морфогенезу первинних експлантів на різних живильних середовищах, % (ізоляція донорів 15.03.23)

Середовище	MS (контроль)		№ 1		№ 2	
	Альба	Презент	Альба	Презент	Альба	Презент
Бруньки						
Прижилося всього	86	79	94	91	90	86
Прямий морфогенез	82	70	92	87	84	79
Калюсогенез	4	9	2	4	6	7
Меристеми						
Прижилося всього	27	23	47	34	36	27
Прямий морфогенез	12	6	41	26	25	14
Калюсогенез	15	17	6	8	11	13

Таблиця 5 – Регенерація експлантів на середовищі № 1 з різним умістом цитокінінів на фоні 0,1 мг/л ІМК

	БАП 1,0 мг/л (контроль)		Кінетин 1,0 мг/л		Аденін 1,0 мг/л		БАП, кінетин, аденін по 0,333 мг/л	
	*А	П	А	П	А	П	А	П
Бруньки								
Прижилось, %	93	90	93	91	91	87	95	92
Морфогенних, %	83	77	80	69	56	43	89	82
Вітрифікованих, %	11	17	2	6	1	3	1	3
Меристеми								
Прижилось, %	48	32	46	33	44	29	57	49
Морфогенних, %	44	29	41	24	16	12	36	32
Вітрифікованих, %	13	17	7	9	3	4	4	7

\*Скороченням “А” відповідає сорт Альба, “П” – сорт Презент.

За показником приживлюваності брунькових експлантів варіанти суттєво не відрізнялися. Приживалося від 90 до 95 % бруньок. У випадку меристемних експлантів кращі показники приживлюваності встановлено на варіанті сумісного додавання речовин. З меристем сорту Альба приживалося в середньому 57 %, у сорту Презент – 49 %. На решті варіантів приживлюваність меристемних експлантів становила у сорту Альба 44–48 %, а у сорту Презент – 29–33 %. Тобто різниця в межах одного чи іншого сорту становила п'ять відсотків, що є на рівні розрахункової помилки.

Кращий показник приживлюваності на середовищі із сумішшю гормонів, на нашу думку, пов'язаний з тим, що фітогормони у різних формах детермінують різні процеси [26, 27, 30]. Також на середовищі із одночасним додаванням по 1/3 кількості БАПу, кінетину й аденіну відмічено найменший показник гіпергідратації тканин (вітрифікації).

Найбільше морфогенних як брунькових, так і меристемних експлантів було за додавання бензиламінопурина. У сорту Альба морфогенез відбувся на середовищі з БАП у бруньок 83 % і у меристем 44 %, у сорту Презент відповідно 77 і 29 %. Водночас, на цьому варіанті кількість вітрифікованих експлантів обох типів становила від 11 до 17 %.

У меристемних експлантів, порівняно з бруньковими, відмічено більше вітрифікованих регенерантів. Вважаємо, що це зумовлено комплексом чинників, такими як, зокрема, різні рівні метаболізму неоднакових за розмірами

первинних експлантів (наявність ендогенних фітогормонів, ферментів, їх транспорту), різні анатомічні особливості та неоднаковий рівень порушення кореляційних взаємозв'язків між частинами цілісного організму, різне співвідношення розміру експланта і раневої поверхні.

Варіант із кінетином поступався за кількістю морфогенних експлантів, але мав меншу кількість регенерантів з гіпергідратованими тканинами. Також візуально регенеранти мали більші листкові пластинки.

На середовищі з аденіном (1,0 мг/л) відсоток вітрифікованих рослин був найнижчим. Водночас кількість морфогенних меристемних експлантів також була найнижчою: 16 % у сорту Альба і 12 % у сорту Презент.

Враховуючи високий відсоток гіпергідратованих регенерантів та ефект накопичення фітотоксичного надлишку цитокінінів, є потреба підбору комбінацій гормонів, які б забезпечували сталі показники морфогенності експлантів. Тому в подальшому нами випробувано комбінації з поєднанням гормонів класу цитокінінів (табл. 6). Контролем був БАП у кількості 1,0 мг/л. У решті варіантів кількість цієї речовини зменшено у п'ять разів, тобто до 0,2 мг/л. До 0,2 мг/л БАПу залежно від варіанта додано: 0,8 мг/л кінетину; 0,3 мг/л кінетину + 0,5 аденіну; 1,0 мг/л кінетину + 1,0 мг/л аденіну. Найбільше приживалося, були морфогенними й встановлено найменший відсоток з гіпергідратованими тканинами в обох видів експлантів на варіанті із сумісним додавання 0,2 мг/л БАП, кінетину 1,0 мг/л, аденіну 1,0 мг/л.

Порівняно з контролем залежно від сорту приживлюваність брунькових експлантів зростала на 1–3 %. Кількість меристем, що прижилися, зростала із 48 % на контролі до 56 % у сорту Альба, у сорту Презент із 32 до 51 % відповідно. Інші варіанти (БАП 0,2 + Кінетин 0,8; БАП 0,2 + Кінетин 0,3 + Аденін 0,5) поступалися контролю як за приживлюваністю, так і кількістю морфогенних експлантів. Проте кількість регенерантів з ознаками гіпергідратації в брунькових експлантах становила на рівні 0–3 %, у меристемних 1–5 %. За досліджуваних концентрацій встановлено обернену залежність між кількостями морфогенних та з ознаками гіпергідратації експлантів.

них рослин формувалися у розетці бруньки, донори живців після цього значно не збільшувалися в розмірах. На середовищі № 1 регенеранти повільніше росли, мали порівняно менші розміри. У середньому період між повторними живцюваннями становив по сорту Альба 41 добу і по сорту Презент 56 діб.

Після п'яти послідовних живцювань методом накладання різниці між середовищами за періодом повторного живцювання збільшилася. На контролі цей показник становив у сорту Альба 30 діб, у сорту Презент 32 доби, середовищі № 2 – відповідно 26 і 28 діб. Тобто за п'яти послідовних живцювань період між живцюваннями скоротився із 27 до

Таблиця 6 – Регенерація експлантів на середовищі № 1 з різним комбінаціями речовин з цитокініноюю активністю на фоні 0,1 мг/л ІМК

Цитокініни, мг/л	БАП 1,0 мг/л (контроль)		БАП 0,2 Кінетин 0,8		БАП 0,2 Кінетин 0,3 Аденін 0,5		БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0	
	*А	П	А	П	А	П	А	П
Бруньки								
Прижилося, %	93	90	91	89	88	85	96	91
Морфогенних, %	83	77	80	74	77	72	90	86
Вітрифікованих, %	11	17	1	3	0	1	2	6
Меристеми								
Прижилося, %	48	32	51	42	39	30	56	51
Морфогенних, %	44	29	50	33	22	18	49	37
Вітрифікованих, %	13	17	2	5	1	2	3	9

\*Скороченням «А» відповідає сорт Альба, «П» – сорт Презент.

На етапі мультиплікації *in vitro* порівняно за основними технологічними показниками (коефіцієнт розмноження, період між живцюваннями) три варіанти середовищ різних за умістом мінеральних речовин, та проведено підбір оптимальних фітогормональних детермінант цитокінінової та гіберелінової природи.

Онтогенез регенерантів, у яких донорами живцевих експлантів були рослини *in vitro*, залежав від мінеральної частини живильного середовища за однакових органічних компонентів (табл. 7), зокрема і цитокінінів.

На контрольному (MS) і на середовищі № 2 швидкість росту рослин була однаковою. Період між живцюваннями становив близько одного місяця: 27–28 діб у сорту Альба та 33 доби у сорту Презент. За цей період у маточ-

26 діб у сорту Альба і з 33 до 28 діб у сорту Презент. На середовищі № 1 період між живцюваннями зріс із 41 і 56 до 49 і 60 діб відповідно.

Період між живцюваннями та коефіцієнт розмноження – це основні показники, які характеризують технологічну швидкість мультиплікації. Найвищий коефіцієнт розмноження був по обох сортах як за першого, так і п'ятого живцювання методом накладання на середовищі № 2. У сорту Альба за першого живцювання він становив 3,1, у випадку п'ятого живцювання 3,3 за 2,4 і 2,0 на контрольному варіанті. У сорту Презент на середовищі № 2 коефіцієнт розмноження становив відповідно 2,8 і 3,0 за 1,9 і 1,9 на контролі. Отже, на середовищі MS порівняно із середовищем № 2 зменшився коефіцієнт розмноження.



Таблиця 7 – Особливості морфогенезу первинних експлантів на різних живильних середовищах, % (БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0, ІМК 0,1)

Середовище	MS (контроль)		№ 1		№ 2	
Сорт	Альба	Презент	Альба	Презент	Альба	Презент
1-й пасаж						
Період між живцюваннями, дів	28	33	41	56	27	33
Коефіцієнт розмноження	2,4	1,9	2,1	1,7	3,1	2,8
Непридатні для живцювання, %	1	2	0	1	1	1
5-й пасаж						
Період між живцюваннями, дів	30	32	49	60	26	28
Коефіцієнт розмноження	2,0	1,9	1,6	1,4	3,3	3,0
Непридатні для живцювання, %	5	7	1	3	3	6

Серед порівнюваних середовищ найменший коефіцієнт розмноження встановлено на середовищі № 1. За першого пасажу у сорту Альба 2,1 і сорту Презент 1,7. За п'ятого живцювання цей показник знизився до 1,6 і 1,4 відповідно.

Середовище № 1 серед порівнюваних містило меншу кількість рослинних об'єктів, непридатних для живцювання (не морфогенні, інтенсивна гіпергідратація).

Отже, якщо серед порівнюваних середовищ № 1 виявилось кращим на етапі переходу первинних експлантів з нативних в асептичні умови, то для сталої тривалої мультиплікації за показниками періоду культивування і коефіцієнта розмноження кращим було середовище № 2.

Для збільшення коефіцієнта розмноження застосовано гормональну детермінацію пробудження більшої кількості сплячих пазушних бруньок (табл. 8). У першому живцюванні порівняно з контролем у разі застосування гіберелінів встановлено значне зростання кое-

фіцієнта розмноження як завдяки пробудженню більшої кількості пазушних бруньок, так і утворенню вусів з 1–2 бруньками (рис. 2). За першого живцювання на середовищі із ГК<sub>3</sub> у сорту Альба зростання відбулося із 3,1 до 3,9. На варіанті із ГК<sub>4+7</sub> цей показник зріс до 4,9. Подібна тенденція встановлена у сорту Презент. Варіант із ГК<sub>4+7</sub> порівняно із ГК<sub>3</sub> за коефіцієнтом розмноження переважав останній. За впливом на період між живцюваннями по сорту Альба варіанти суттєво не відрізнялися від контролю, а по сорту Презент період між культивуваннями становив 35 дів на контролі проти 29 дів на варіантах із гібереліном.

Якщо за першого живцювання за додавання гіберелінів виявлено позитивний вплив на показники мультиплікації (зменшення тривалості періоду між живцюваннями й збільшення коефіцієнта розмноження), то у наступних живцюваннях ці показники змінювалися, а у п'ятому й наступних пасажах за цими показниками варіанти із ГК<sub>3</sub> і ГК<sub>4+7</sub> поступалися безгібереліновому контролю.

Таблиця 8 – Особливості морфогенезу первинних експлантів на середовищі № 2 з різними гіберелінами, % (БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0, ІМК 0,1)

Середовище	Без гіберелінів		ГК <sub>3</sub>		ГК <sub>4+7</sub>	
Сорт	Альба	Презент	Альба	Презент	Альба	Презент
1 пасаж						
Період між живцюваннями, дів	28	35	24	29	23	29
Коефіцієнт розмноження	3,1	2,8	3,9	3,4	4,9	4,1
5 пасаж						
Період між живцюваннями, дів	25	30	30	32	27	29
Коефіцієнт розмноження	3,3	3,0	2,1	1,7	2,2	2,0

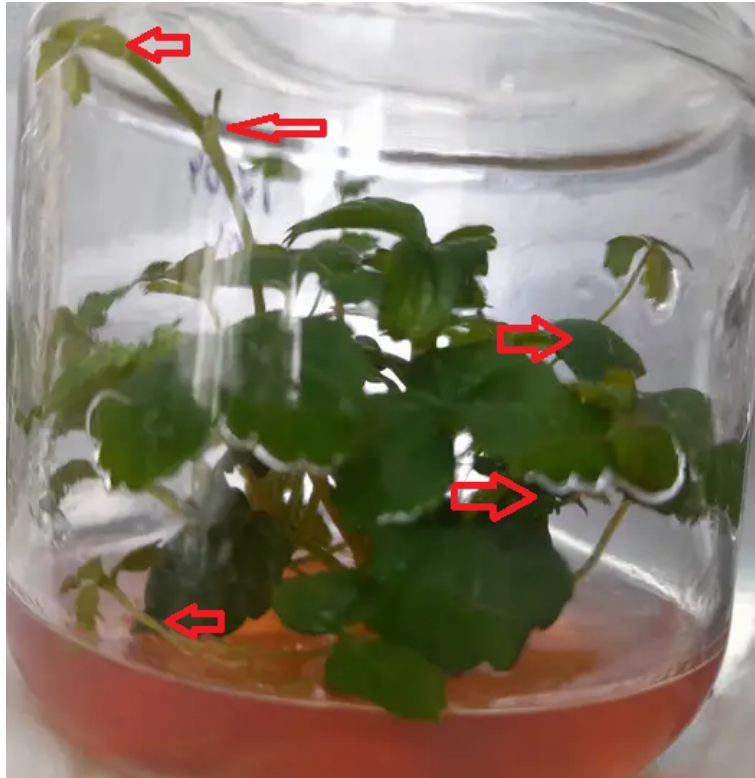


Рис. 2. Утворення вусів на середовищі № 2 з додаванням препарату Gibb plus (ГК<sub>4</sub> + ГК<sub>7</sub>).

У літературі, зокрема, у дослідженнях, що стосуються розмноження малини, ожини встановлено кращий розвиток регенерантів у разі заміни класичного Fe-хелату на еквівалентну кількість іонів ферума у формі добрива Ferrilen 4.8 Orto-Orto [31, 26]. Проте встановлено доцільність такої заміни через 4–5 пасажів одного виду залізоумісних сполук на інші. Це сприяє кращому розвитку та зменшенню кількості регенерантів із гіпергідратованими тканинами.

На третьому етапі МКР основною технологічною потребою є індукція та розвиток кореневої системи. Це необхідно для ефективної постасептичної адаптації. Ризогенез детермінується низкою чинників. Це, зокрема, кількісний і якісний склад мінеральної частини середовища, фітогормони або їх синтетичні аналоги та органічні речовини.

Наприклад, згідно з правилом Скуга-Мілера, за кількісного переважання цитокінінів над ауксинами знімається апікальне гілкування. Відбувається пробудження бічних бруньок. Це є технологічно позитивним ефектом, який застосовують на етапі мультиплікації для збільшення коефіцієнта розмноження.

На третьому етапі МКР для стимулювання ризогенезу необхідне «перематювання»

гормонального статусу, а саме, зменшити вміст цитокінінів і збільшити – ауксинів.

Рослини мають властивість відкладати гормони у різних формах про запас. У випадках вегетативного розмноження, зокрема в умовах *in vitro* частина материнського організму з набутих їй фітогормональним статусом регенерується до нового дочірнього організму. Накопичені гормони впливають на розвиток потомства [17, 26, 30]. Таким чином створюється ситуація, що експлант містить надлишок цитокінінів, а у регенованої з нього рослині мають відбуватися процеси коренеутворення.

За вирощування донорів експлантів на середовищах з різним умістом речовин з цитокініновою активністю встановлено неоднаковий ризогенез у потомства (табл. 9). В обох сортів найбільший відсоток регенерантів встановлено у потомства з донорів експлантів, які виростили на середовищі з трьома речовинами з цитокініновою активністю порівняно з контролем у невеликих концентраціях: БАП 0,2 + Кінетин 0,3 + Аденін 0,5. Ці речовини володіють процитокіновою активністю (аденін) або мають м'якшу дію (кінетин і уміст БАП 0,2 мг/л), порівняно із застосуванням 1,0 мг/л БАПу на контролі. За культивування донорів експлантів ризогенез відбувався у 94 % регенерантів сорту

Альба та 89 % сорту Презент порівняно з 85 і 61 % на контролі відповідно. Також процес початку ризогенезу проявлявся швидше порівняно з контролем в інших варіантах зі зменшеною кількістю БАП (0,2 мг/л).

У нативних умовах наявний тісний кореляційний зв'язок між ризосферою та фотоасиміляційним апаратом. Складовою взаємодії між органами є поглинання (або) асиміляція, перетворення органічних та мінеральних компонентів метаболізму, інакше кажучи фотосинтез та кореневе живлення. Надходження органічних елементів живлення забезпечує корінь як енергією, так і будівельним матеріалом. В асептичному міксотрофному живленні з переважанням гетеротрофного способу фотоасиміляція виконує переважно регулюючі функції. Уміст органічних речовин залежить від тих синтетичних речовин, які додають технологічно у середовище. Для більшості культур, зокрема суниці, таким вуглеводом є сахароза, яку ще називають цукровий цукор. Уміст цього вуглеводу впливає на розвиток як листостеблового апарату, так і кореневої системи [17, 26, 30]. Наприклад, додавання у середовище для МКР картоплі 1–2 % сахарози ефективно для мультиплікації, а збільшення до 4–6 % уповільнює ріст та стимулює бульбоутворення [26]. У базовому середовищі уміст сахарози MS 3 %. Про-

те для суниці доцільним є підбір оптимальної концентрації сахарози у середовищі. Нами випробувано варіанти з такими концентраціями сахарози: 1; 2; 3; 4; 5; 6 % (табл. 10).

Встановлено, що за збільшення концентрації із 1 до 4 % зростає як кількість коренів, так і їх довжина. Зокрема, у сорту Альба у регенерантів, вирощених на середовищі із 4 % сахарози, довжина коренів була у чотири рази більшою порівняно із регенерантами, які виростили на середовищі з 1 % сахарози (рис. 3). У регенерантів на середовищі із 1 % сахарози візуально відмічено утворення більшої кількості листків, що ймовірно, вказує на індукцію фотоасиміляційного апарату за низького умісту екзогенних штучних синтетичних вуглеводів (сахарози) для синтезу ендогенних вуглеводів.

На середовищі із максимальною кількістю (6 %) сахарози спостерігалось інгібування як ризогенезу, так і листостеблового апарату (рис. 4).

Порівняння впливу ІМК та ІОК проводили за такими комбінаціями: ІМК 1,0 мг/л (контроль); ІМК 0,2 мг/л + ІОК 0,2 мг/л; ІМК 0,2 мг/л + ІОК 0,5 мг/л; ІМК 0,2 мг/л + ІОК 0,8 мг/л; ІМК 0,2 мг/л + ІОК 1,0 мг/л; ІМК 0,2 мг/л + ІОК 1,2 мг/л. Більшу кількість коренів та з більшою довжиною отримано на варіанті ІМК 0,2 мг/л + ІОК 1,0 мг/л.

Таблиця 9 – Коренеутворення регенерантів залежно від умов вирощування донорів експлантів

Цитокініни, мг/л	БАП 1,0 мг/л (контроль)		БАП 0,2 Кінетин 0,8		БАП 0,2 Кінетин 0,3 Аденін 0,5		БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0	
	*А	П	А	П	А	П	А	П
Регенерантів з коренями, %	85	61	92	79	94	89	90	78
Початок ризогенезу, діб	21	29	19	24	14	17	20	23
Приживання регенерантів з коренями в умовах закритого ґрунту, %	81	73	90	78	92	90	84	82

\*Скороченням «А» відповідає сорт Альба, «П» – сорт Презент.

Таблиця 10 – Вплив різних концентрацій сахарози на ризогенез суниці (ІМК 1,0 мг/л)

Показник	Сорт/ концентрація	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %
Довжина кореневої системи, мм	Альба	43	56	89	117	62	17
	Презент	27	33	77	100	97	64
Кількість коренів, шт.	Альба	2,3	2,7	3,4	5,4	2,1	1,3
	Презент	2,1	2,5	3,3	5,2	5,0	1,9





Рис. 3. Розвиток регенерантів суниці на етапі ризогенезу на середовищах з різним умістом сахарози, сорт Альба.



Рис. 4. Пригнічення росту регенерантів на середовищі із 6 % сахарози.

**Висновки.** На основі експериментальних досліджень розроблено наступні компоненти протоколу мікронального розмноження:

- у випадках наявності за результатами діагностики вільних від збудників хвороб асептичну культуру отримують введенням *in vitro* брунькових експлантів;
- за потреби оздоровлення донори первинних експлантів вирощують в умовах депози-

тарію з подальшою культурою меристем та ПЛР діагностикою;

- для первинного культивування використовують середовище № 1, для мультиплікації та ризогенезу – № 2;

- на етапі мультиплікації додають БАП 0,2 мг/л, кінетин 0,8 мг/л;

- останнє перед коренеутворенням культивування на етапі мультиплікації донорів



експлантів для отримання індукованих для вкорінення маточних рослин проводять з додаванням БАП 0,2 мг/л, кінетин 0,3 мг/л, аденін 0,5 мг/л.

- на етапі індукції ризогенезу кількість цитокінінів зменшують, додають ауксини ІМК 0,2 мг/л + ІОК 1,0 мг/л;

- для покращення ризогенезу кількість сахарози збільшують із 3 до 4 %.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health / F. Giampieri et al. *Nutrition* 28. 2012. P. 9–19.

2. Adenosine Acts as an Active Antiplatelet Constituent in Strawberries (*Fragaria × ananassa*) BPB Reports / N. Ichihara et al. 2023. Vol. 6. Issue 1. P. 27–32.

3. Розсада суниці з маточників *in vitro*. URL: <https://farmer.ua/centr-posadkovogo-materialu/roz sada-sunici-z-matochnikiv-in-vitro/>

4. List of non EU phytoplasmas of *Cydonia* Mill., *Fragaria* L., *Malus* Mill., *Prunus* L., *Pyrus* L., *Ribes* L., *Rubus* L. and *Vitis* L. / C. Bragard et al. *EFSA Journal*. 2020. 18(1). 5930 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5930

5. Ідентифікація збудників вірусних та інших хвороб плодів, ягідних, горіхоплідних культур і хмелю. URL: <https://labprice.ua/wp-content/uploads/2021/03/Patogeni-poslugi.pdf>

6. Gardener. Фітопатогенні мікоплазми – збудники хвороб рослин. URL: <https://fruit-grower.info/2022/12/13/fitopatogeni-mikoplazmi-zbudniki-hvorob-roslin/>

7. Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile / Cui Weier et al. *European Journal of Plant Pathology*. 2019. 155 p. DOI: 10.1007/s10658-019-01808-w.

8. Namba S. Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy. Series B*. 2019. Vol. 95. Issue 7. P. 401–418. DOI: 10.2183/pjab.95.028.

9. Літвіненко С.Г., Буджак В.В. Фітопатологія: конспект лекцій. Вид. 2-ге, випр. і доп. Чернівці: Чернівецький нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2022. 92 с.

10. Удовиченко К. Вірусні хвороби суниці. URL: <http://www.jagodnik.info/virusni-hvoroby-sunytsi-sadovoyi/>

11. Posthuma Karin, Adams A., Hong Yiguo, Kirby M. Detection of Strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology*. 2002. 51. P. 266–274. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00725.x.

12. Molecular characterization of strawberry vein banding virus from China and the development of loop-mediated isothermal amplification assays for their detection / J. Ren et al. *Scientific Reports*. 2022. 12. 4912 p. DOI: 10.1038/s41598-022-08981-9 <https://www.nature.com/articles/s41598-022-08981-9>

13. Павлюк В. Суниця цілий рік – сорти і способи вирощування. *Агроexpert*. 2013. 72 с.

14. Вукович Г. Важнейшие болезни плодовых. Київ: ООО "Аграр Медиен Украина", 2010. 129 с.

15. An Optimized Protocol for Micropropagation and Acclimatization of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Variety ‘Aroma’ / J.C. Neri et al. *Agronomy*. 2022. 12. 968 p. DOI: 10.3390/agronomy12040968

16. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.) / Karla Quiroz et al. *Biological Research*. 2017. 50 p. DOI: 10.1186/s40659-017-0125-8.

17. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Олешко О.Г. Фізіологія та біотехнологія рослин: підручник. Біла Церква: БНАУ, 2022. 427 с.

18. Miller P.W., Belkengren R.O. Elimination of yellow edge, crinkle and vein banding viruses and certain other virus complexes from strawberries by excision and culturing of apical meristems. *Plant Dis. Rep.* 1963. 47. P. 298–300.

19. Adams A.N. An improved medium for strawberry meristem culture. *J. Hort. Sci.* 1972. 47. P. 263–264.

20. Nishi S., Oosawa K. Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agr. Res. Quart.* 1973. 7. P. 189–194.

21. Torres K.C. Tissue Culture of Strawberry (*Fragaria*). In: *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Springer, Boston, MA. 1989. DOI: 10.1007/978-1-4615-9756-8\_9

22. Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars / N.S. Nehra et al. *Euphytica*, 1994. 76. P. 107–115. DOI: 10.1007/BF00024027

23. Cameron J.S., Hancock J.F., Nourse T.M. The field performance of strawberry nursery stock produced originally from runners or micropropagation. *Adv. Strawberry Prod.* 1985. 4. P. 56–58.

24. Юлія Немцева. Стало відомо, яку технологію вирощування полуниці використовує Tevitta. 2022. URL: <https://kurkul.com/news/31477-stalo-vidomoyaku-tehnologiyu-viroschuvannya-polunitsi-vikoristovuye-tevitta>

25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. 15. P. 473–497.

26. Мацкевич В.В. Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація: дис. ... д-ра с.-г. наук: 06.01.05. Суми, 2020. 478 с.

27. Мацкевич В.В., Подгаєцький А.А., Філіпова Л.М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2019. 85 с.

28. Регулятор росту рослин ГІББ ПЛЮС (GIBB PLUS). URL: <https://agrarii-razom.com.ua/preparations/gibb-plus-gibb-plus>

29. Tashmatova L.V., Matsneva O.V., Khromova T.M., Shakhov V.V. Optimization of individual elements of clonal micro-propagation of fruit and berry crops in the production system of healthy planting material. *E3S Web Conf. The Role of Biotechnology in Obtaining Pure Virus-free Material*. 2021. Vol. 254. DOI: 10.1051/e3sconf/202125404001

30. Терек О.І., Пацула О.І. Ріст і розвиток рослин: навч. посібн. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. 328 с.

31. Мацкевич В.В., Подгаєцький А.А. Особливості використання форми і кількості заліза за вирощування *in vitro* ожини і малини. Вісник Сумського національного аграрного університету. Агрономія і біологія. 2015. Вип. 9 (30). С. 46–51.

## REFERENCES

1. Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*. no. 28, pp. 9–19.

2. Ichihara, N., Maekawa, S., Ogawa, N., Yamada, A., Nagasato, T., Maruyama, I., Sone, K., Yasuda, M., Matsushita, K., Ito, C., Takaya, Y. (2023). Adenosine Acts as an Active Antiplatelet Constituent in Strawberries (*Fragaria × ananassa*) *BPB Reports*. Vol. 6, Issue 1, pp. 27–32.

3. Rozsada sunytsi z matochnykv *in vitro* [Strawberry seedlings from the mother plant nursery *in vitro*]. Available at: <https://farmer.ua/centr-posadkovogo-materialu/rozsada-sunici-z-matochnikiv-in-vitro>

4. Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M.A., Miret, J.A.J., Justesen, A.F., MacLeod, A., Magnusson, C.S., Milonas, P., Navas-Cortes A, J., Parnel L.S., Potting, R., Reignault, P.L., Thulke, Hans-Hermann, Van der Werf, W., Civera, A.V., Yuen, J., Zappalà, L. (2020). List of nonEU phytoplasmas of *Cydonia* Mill., *Fragaria* L., *Malus* Mill., *Prunus* L., *Pyrus* L., *Ribes* L., *Rubus* L. and *Vitis* L. *EFSA Journal*. no. 18(1), 5930 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5930.

5. Identyfikatsiia zbudnykv virusnykh ta inshykh khvorob plodovykh, yahidnykh, horikhoplidnykh kultur i khmeliu [Identification of pathogens of viral and other diseases of fruit, berry, nut crops and hops]. Available at: <https://labprice.ua/wp-content/uploads/2021/03/Patogeni-poslugi.pdf>

6. Gardener. Fitopatohenni mikoplazmy – zbudnyky khvorob roslyn [Phytopathogenic mycoplasmas are pathogens of plant diseases]. 2022. Available at: <https://fruit-grower.info/2022/12/13/fitopatogeni-mikoplazmi-zbudniki-hvorob-roslyn/>

7. Weier, Cui, Barrera, Quiroga, Curkovic, Nicolas, Zamorano, S., Fiore Nicola, Alan. (2019). Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile. *European Journal of Plant Pathology*. 155 p. DOI: 10.1007/s10658-019-01808-w.

8. Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy. Series B*. Vol. 95, Issue 7, pp. 401–418. DOI: 10.2183/pjab.95.028.

9. Litvinenko, S.H., Budzhak, V.V. *Fitopatolohiia: konspekt lektsii* [Phytopathology]. Chernivtsi, Chernivtsi National University named after Yu. Fedkovicha, 92 p.

10. Udovychenko, K. *Virusni khvoroby sunytsi sadovoi* [Virus diseases of garden strawberries]. Available at: <http://www.jagodnik.info/virusni-hvoroby-sunytsi-sadovoyi/>

11. Posthuma, Karin, Adams, A., Hong, Yiguo, Kirby, M. (2002). Detection of Strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology*. no. 51, pp. 266–274. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00725.x.

12. Ren, J., Zhang, J., Wang, Q., Zhou, Y., Wang, J., Ran, C., Shang, Q. (2022). Molecular characterization of strawberry vein banding virus from China and the development of loop mediated isothermal amplification assays for their detection. *Scientific Reports*. no. 12, 4912 p. DOI: 10.1038/s41598-022-08981-9

13. Pavliuk, V. (2013). *Sunytsia tsilyi rik – sorty i sposoby vyroshchuvannia* [Strawberries all year round – varieties and methods of cultivation]. *Agroexpert*, 72 p.

14. Vukovych, H. (2010). *Vazhneishye bolezny plodovykh* [The most important fruit diseases]. Kyiv, OOO Agrar Medien Ukraine, 129 p.

15. Neri, J.C., Meléndez-Mori, J.B., Tejada-Alvarado, J.J., Vilca-Valqui, N.C., Huaman-Huaman, E., Oliva, M., Goñas, M. (2022). An Optimized Protocol for Micropropagation and Acclimatization of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Variety ‘Aroma. *Agronomy*. no. 12, 968 p. DOI: 10.3390/agronomy12040968

16. Quiroz, Karla, Berrios, Miguel, Carrasco, Basilio, Retamales, Jorge, Caligari, Peter, Garcia-Gonzales, Rolando. (2017). Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biological Research*. 50 p. DOI: 10.1186/s40659-017-0125-8.

17. Matskevych, V.V., Filipova, L.M., Oleshko, O.H. (2022). *Fiziolohiia ta biotekhnolohiia roslyn: pidruchnyk* [Physiology and biotechnology of plants]. Bila Tserkva, BNAU, 427 p.

18. Miller, P.W., Belkengren, R.O. (1963). Elimination of yellow edge, crinkle and vein banding viruses and certain other virus complexes from strawberries by excision and culturing of apical meristems. *Plant Dis. Rep.* no. 47, pp. 298–300.

19. Adams, A.N. (1972). An improved medium for strawberry meristem culture. *J. Hort. Sci.* no. 47, pp. 263–264.

20. Nishi, S., Oosawa, K. (1973). Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agr. Res. Quart.* no. 7, pp. 189–194.

21. Torres, K.C. (1989). *Tissue Culture of Strawberry (Fragaria)*. In: *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/978-1-4615-9756-8\_9

22. Nehra, N.S., Kartha, K.K., Stushnoff, C. (1994). Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. *Euphytica*. no. 76, pp. 107–115. DOI: 10.1007/BF0024027

23. Cameron, J.S., Hancock, J.F., Nourse, T.M. (1985). The field performance of strawberry nursery stock produced originally from runners or micropropagation. *Adv. Strawberry Prod.* no. 4, pp. 56–58.

24. Nemtseva, Yu. (2022). *Stalo vidomo, yaku tekhnolohiia vyroshchuvannia polunytsi vykorystovuie Tevitta* [It became known what technology of growing strawberries is used by Tevitta]. Available at: <https://>

kurkul.com/news/31477-stalo-vidomo-yaku-tehnologiyu-viroschuvannya-polunitsi-vikoristovuyete-vitta

25. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* no. 15, pp. 473–497.

26. Matskevych, V.V. (2020). Mikroklonalne rozmnozhenia vydiv roslyn in vitro ta yikh postaseptychna adaptatsiia: dys. ... d-ra s.-g. nauk: 06.01.05 [Microclonal propagation of plant species in vitro and their postaseptic adaptation: dissertation of the Doctor of Agricultural Sciences: 06.01.05]. Sumy, 478 p.

27. Matskevych, V.V., Podhaietskyi, A.A., Filipova, L.M. (2019). Mikroklonalne rozmnozhenia okremykh vydiv roslyn (protokoly tekhnolohii): naukovopraktychnyi posibnyk [Microclonal propagation of certain plant species (technology protocols)]. Bila Tserkva, BNAU, 85 p.

28. Regulyator rostu roslyn GIBB PLYUS [Plant growth regulator GIBB PLUS]. Available at: <https://agrarii-razom.com.ua/preparations/gibb-plyus-gibb-plus>

29. Tashmatova, L.V., Matsneva, O.V., Khromova, T.M., Shakhov, V.V. (2021). Optimization of individual elements of clonal micro-propagation of fruit and berry crops in the production system of healthy planting material. E3S Web Conf. The Role of Biotechnology in Obtaining Pure Virus-free Material. Vol. 254. DOI: 10.1051/e3sconf/202125404001

30. Terek, O.I., Patsula, O.I. (2011). Rist i rozvytok roslyn: navch. posibn [Growth and development of plants]. Lviv, LNU after name Ivana Franka, 328 p.

31. Matskevych, V.V., Podhaietskyi, A.A. (2015). Osoblyvosti vykorystannia formy i kilkosti zaliza za vyroshchuvannya in vitro ozhyny i malyny [Peculiarities of using the form and amount of iron for in vitro cultivation of blackberries and raspberries]. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Ahronomiia i biolohiia* [Bulletin of the Sumy National Agrarian University. Agronomy and biology]. Issue 9 (30), pp. 46–51.

### Development of individual elements of a protocol for sustainable growth and propagation of garden strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) under aseptic conditions

Matskevych V., Filipova L., Matskevych Yu.

Garden strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) is one of the most valuable fruits the demand for which in the food market is consistently high. One of the limiting factors for achieving consistently high-quality strawberry yields is the presence of diseases caused by bacteria, phytoplasmas, viruses, and viroids. In order to intensify the technology of garden strawberries cultivation, the problem of production in significant volumes of genetically constant material free from pathogens is essential. Biotechnological methods are currently relevant technologies that allow mass production of planting material with high phytosanitary and genetic quality. The purpose of the study is to update the protocol for microclonal propagation of garden strawberries to obtain virus-free planting material. The research was conducted in the micropropagation laboratory of LLC «Blahodatne» (Tevitta™) Cherkasy region, Ukraine using the «Alba» and «Present» strawberry cultivars. A series of experiments were conducted according to the «step by step» principle on two types of explants: buds and meristems.

The determinants for obtaining aseptic cultures from bud and meristem explants were investigated. The trophic influence was studied in media with different mineral content (at the multiplication stage) and sucrose concentrations during rhizogenesis.

Among the phytohormonal determinants during the multiplication stage, the best combination among those investigated was the use of substances with cytokinin activity consisting of BAP at 0.2 mg/l and kinetin at 0.8 mg/l. The addition of 0.1 ml/l of «Gibb plus preparation» (GK4 + GK7) was effective for the reproduction rate increasing. Growing of donor explants in media with BAP at 0.2 mg/l, kinetin at 0.3 mg/l, and adenine at 0.5 mg/l, compared to the control (BAP at 1.0 mg/l) improved rhizogenesis in regenerants. The highest root formation rates were observed in the variant with 4 % of sucrose (40 g/l).

**Key words:** propagation; microclonal propagation; aseptic culture; trophic and hormonal determination.



Copyright: Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Мацкевич Ю.В. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ORCID iD:

Мацкевич В.В.

Філіпова Л.М.

Мацкевич Ю.В.

<https://orcid.org/0000-0002-9314-8033>

<https://orcid.org/0000-0002-7447-5418>

<https://orcid.org/0009-0008-4464-5958>

