

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Агробіотехнологічний факультет
Спеціальність 201 “ Агрономія ”

Допускається до захисту
завідувач кафедри землеробства,
агрохімії та ґрунтознавства
доктор с-г наук, професор _____ Л.М. Карпук
29 жовтня 2024 року

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

**ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У РОЗСАДНИЦТВІ
СУНИЦІ САДОВОЇ (*FRAGARIA ANANASSA* DUCN.) В УМОВАХ
ТОВ “ АГРОФІРМИ “ БЛАГОДАТНЕ ” ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ**

Виконав: Мацкевич Юрій Вячеславович _____

Науковий керівник: кандидат с-г наук, доцент, Л.М. Філіпова _____

Рецензент: доктор с-г наук, професор Л.М.Карпук _____

Я, Мацкевич Юрій Вячеславович засвідчую, що кваліфікаційну роботу виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності

Біла Церква – 2024

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Агробіотехнологічний факультет
Спеціальність 201 “ Агрономія ”

Затверджую
гарант ОП 201 «Агрономія»
доктор с-г наук, професор
_____ М.Б.Грабовський
29 жовтня 2024 року

ЗАВДАННЯ
на кваліфікаційну роботу здобувачу
Мацкевичу Юрію Вячеславовичу
прізвище, ім'я та по батькові

Тема: Застосування біотехнологічних методів у розсадництві суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в умовах ТОВ “ Агрофірми “ Благодатне ” Черкаської області

Затверджено наказом ректора № 48/С від 07 лютого 2024 р.

Термін здачі студентом готової кваліфікаційної роботи до 04.11. 2024 р.

Перелік питань, що розробляються в роботі. Вихідні дані: огляд наукової літератури по безвірусному розсадництві суниці садової; обґрунтування необхідності розробки нових технологій в розсадництві суниці садової; дослідження детермінант онтогенезу суниці садової в асептичних умовах; удосконалення за результатами досліджень протокол мікроклонального розмноження суниці садової; сформулювати рекомендації для впровадження у виробництво суниці садової.

Календарний план виконання роботи

Етап виконання	Дата виконання етапу	Відмітки про виконання
Огляд літератури	до 06.09. 2024	виконано
Методична частина	до 17.09. 2024	виконано
Дослідницька частина	до 23.10.2024	виконано
Оформлення роботи	до 31.10. 2024	виконано
Перевірка на плагіат	до 25.10. 2024	виконано
Подання на рецензування	до 31.10. 2024	виконано
Попередній розгляд на кафедрі	28.10. 2024	виконано

Керівник кваліфікаційної роботи _____ доцент Л.М.Філіпова

Здобувач _____ Ю.В.Мацкевич

Дата отримання завдання «03» вересня 2023 р.

РЕФЕРАТ

Мацкевич Юрій Вячеславович. Застосування біотехнологічних методів у розсадництві суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в умовах ТОВ “Агрофірми “Благодатне” Черкаської області

Досліджено детермінанти вегетативного розмноження суниці садової мікроклональними методами: *in vitro* та фотоавтотрофний.

Використано методичні підходи, методи проведення досліджень із вегетативного розмноження в контрольованих умовах. З дотриманням принципу єдиної логічної відміни, виявлено особливості трофічної та фітогормональної детермінації онтогенезу рослин суниці садової, час вегетативного періоду життєвого циклу.

На середовищах різних за складом мінеральних нутрієнтів з’ясовано трофічну регуляцію морфогенезу регенерантів.

Зроблено висновки, щодо удосконалення технології мікроклонального розмноження суниці садової в розсадництві.

Одержані результати можуть бути використані в ТОВ “Агрофірма “Благодатне” та інших господарствах, що займаються розсадництвом та вирощуванням органічної ягоди.

Кваліфікаційна робота магістра містить 58 сторінок, 1 таблицю, 20 рисунків, список використаних джерел із 62 найменувань.

Ключові слова: вегетативне розмноження, живлення, фітогормони, розсадництво, суниця садова, детермінанти, експлант, регенерація, *in vitro*.

ANNOTATION

Matskevych Yuriy Vyacheslavovych Application of Biotechnological Methods in Strawberry Seedling Production (*Fragaria ananassa* Duch.) in the Conditions of the "Agrofirma "Blagodatne" in Cherkasy Region

Fragaria ananassa Duch. (Garden Strawberry) is a stable leader in the berry market. The widespread occurrence of viroids, viruses, phytoplasmas, and bacteria using conventional propagation methods and on industrial plantations limits stable productivity in production with minimal pesticide load. Reducing the lifespan of plantations, variety replacement, and variety renewal is possible by transitioning to biotechnological methods in seedling production. This will enhance quality and increase the scale of strawberry planting material production. Therefore, creating industrial protocols for microclonal propagation technologies of this crop is a pressing issue.

The research aims to develop a modern commercial protocol for obtaining genetically uniform planting material free from pathogens. Experiments were conducted in the Tevitta (LLC "Blagodatne") in the Cherkasy region with Alba and Present varieties. The sequence of experiments occurred in four stages of microclonal propagation: 1) obtaining aseptic culture; 2) multiplication; 3) induction of rhizogenesis; 4) post-aseptic adaptation. The principle of "step by step" was adhered to throughout each stage and the technological process as a whole. That is, the best variant of the previous experiment served as a control in the subsequent experiment.

Decontaminants were selected to obtain aseptic culture from meristem and bud primary explants, and trophic and hormonal determinants were studied. At the multiplication stage, the characteristics of the influence of mineral and organic determinants on the rates of multiplication were revealed: multiplication coefficient and the period between cuttings. Among the compared variants, the best combination of hormones was BAP 0.2 mg/l and kinetin 0.8 mg/l. The multiplication rate increased with the addition of Gibb plus ($GA_4 + GA_7$) at a rate of 0.1 ml/l.

The addition to the medium (BAP 0.2 mg/l, kinetin 0.3 mg/l, adenine 0.5 mg/l) during the in vitro donor explant cultivation contributed to the growth of rhizogenesis

indicators in the offspring. Rhizogenesis, when comparing variants with 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0% sucrose, was better on the medium with 4% of this carbohydrate (40 g/l).

Based on experimental data, the advantages of using post-aseptic adaptation via photoautotrophic method were substantiated. The master's qualification work contains 58 pages, 1 table, 20 figures, and a list of references consisting of 62 titles.

Keywords: vegetative propagation, nutrition, phytohormones, seedling production, strawberry, determinants, explant, regeneration, in vitro

АБТФБНА

ЗМІСТ

ВСТУП	8
НАРОДНОГОСПОДАРСЬКЕ ЗНАЧЕННЯ, БІОЛОГІЧНІ	
Розділ 1	ОСОБЛИВОСТІ ТА РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (огляд літератури)
1.1.	Суниця садова цінна комерційна культура 11
1.2.	Біологічні особливості <i>Fragaria × ananassa</i> 12
1.3.	Розмноження 12
1.4.	Переваги безвірусного розсадництва 14
1.5.	Біотехнологічні складові в системі безвірусного садівництва суниці садової 16
Розділ 2	МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ
2.1.	Основні локації дослідної роботи 18
2.2.	Етапи досліджень 19
2.3.	Особливості асептичного культивування 23
2.4.	Характеристика сортів суниці садової залучених в дослідження 25
2.5.	Статистичні особливості досліджень 26
Розділ 3	УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ СКЛАДОВИХ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ
3.1.	Вплив стану материнських рослин на ефективність деконтамінації та морфогенезу первинних експлантів 27
3.2.	Живильне середовище, як сумарний трофічний детермінант онтогенезу експлантів 32
3.3.	Гіберелові кислоти, як фітогормональні детермінанти на етапі мультиплікації 38
3.4.	Застосування різних хелатуючих агентів Fe 41

3.5.	Розвиток рослин in vitro на етапі мультиплікації на різних за вмістом мінеральної частини середовищах	41
3.6.	Забезпечення сталої швидкості мультиплікації чергуванням живильних середовищ	44
3.7.	Індукція ризогенезу	45
3.8.	Фотоавтотрофний метод мікроклонального розмноження: мультиплікація і постасептична адаптація одночасно	48
	Висновки та пропозиції	50
	Список використаних джерел	52

ВСТУП

Суниця садова займає стабільно лідируючі позиції серед ягідник культур, як за рівнем споживання, так і посадковими площами. Ринок суниці в різних проявах, тобто свіжа заморожена та продукти переробки доволі насичений і жваво реагує на нові якісні пропозиції, як елемент конкурентної переваги. Значні площі суниці сприятливі для появи нових штамів, клонів патогенів. В комерційному органічному вирощуванні суниці для мінімізації пестицидного навантаження використовують плантації з коротким терміном експлуатації, зокрема і їх однорічний варіант. Наприклад, в серпні висаджується із ущільненою схемою розміщення рослин плантація, а в наступному році збирається урожай і насадження дискують та переорють. Такий короткий період вирощування зменшує кількість патогенних мікроорганізмів та забезпечує отримання продукції з вищими товарними показниками, так як перший урожай має більшу за розмірами і кращими смаковими якостями ягоди [1]. Таким чином, для забезпечення якісним садивним матеріалом в збільшених комерційних масштабах з реагуванням на динаміку ринку актуальним є розробка протоколів розмноження нових сортів суниці.

Для вирішення цього питання було поставлено завдання розробити основи сучасного протоколу вирощування вільного від патогенів і збудників хвороб садивного матеріалу з урахуванням біологічних особливостей нових сортів.

Об'єкт дослідження - технологічний процес вирощування садивного матеріалу суниці садової з використанням біотехнологічних методів.

Предмет дослідження - детермінанти онтогенезу рослинних об'єктів.

Новизна та практичне значення отриманих результатів:

1. Розширено знання стосовно природних фітогормональних та трофічних детермінантів в розсадництві суниці садової.
2. Вперше в Україні розроблено комплексну технологію мікроклонального розмноження нових сортів суниці садової із елементами контрольованого фотоавтотрофного живлення.

3. Регламент технологічного процесу впроваджено в умовах тм Тевітта ТОВ «Агрофірма «Благодатне» Черкаської області.

Апробація результатів досліджень. Отримані результати представлені в: статті у фаховому виданні - 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 №2 2023 рік.

У виданні, індексованому у наукометричній базі Scopus Matskevych V., Yukhnovskyi V., Filipova L., Kravchenko N., Tupchii O, **Matskevych Yu.** (2024). Photoautotrophic microclonal propagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) variety Delniwa. Folia Forestalia Polonica, Series A - Forestry. 66(3). 183-194.

та на 6 конференціях:

1. **Мацкевич Ю.В.**, Філіпова Л.М. Особливості розсадництва в органічному ягідництві на прикладі вирощування суниці садової у ТМ Тевітта // «Інноваційні технології в агрономії, землеустрої, лісовому та садово-парковому господарстві»: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції магістрантів і молодих дослідників, 16 листопада 2023 року. – Біла Церква: БНАУ. С. 33-35.

2. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., **Мацкевич Ю. В.** Системи фотоавтотрофного мікроклонального розмноження як моделі фітомікроклімату // Міжнародної науково-практичної конференції «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту» Біла Церква, 26 жовтня 2023 року с. 25-27.

3. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Кравченко Н. В., **Мацкевич Ю. В.** Біотехнологічні методи в екологізації технологій вирощування суниці тм ТЕВІТТА вирощування суниці тм Тевітта // Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоєкології та фітомеліорації: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 21 вересня 2023 р.). – Біла Церква: БНАУ, 2023. с. 74-76.

4. Мацкевич В.В., Воробйов В.І., **Мацкевич Ю.В.** Детермінація онтогенезу *Fragaria ananassa* сахарозою та гіберелінами *in vitro* // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання агротехнологій» присвяченій 100-річчю професора І. М. Карасюка (м. Умань, 23 листопада 2023 р.) / Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін. Умань : Уманського НУС, 2023. 155 с.

5. Синельник Г.О., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., **Мацкевич Ю.В.** Фотоавтотрофне мікроклональне розмноження малини з використанням живців *in vivo*. Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку: матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 28 березня 2024 р.). Біла Церква: БНАУ, 2024. С. 207-209.

6. Стукало Т. В. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., **Мацкевич Ю. В.** Фотоавтотрофне мікроклональне розмноження малини. Сучасні технологічні аспекти виробництва зерна та переробки сільськогосподарської продукції: матеріали Міжнародної наукової конференції з нагоди 100-річчя від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора Григорія Родіоновича Пікуша (20–21 березня 2024 р., м. Дніпро). Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2024. С. 314-316.

РОЗДІЛ 1. НАРОДНОГОСПОДАРСЬКЕ ЗНАЧЕННЯ, БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (огляд літератури)

1.1. Суниця садова цінна комерційна культура

Суниця садова є лідером на ягідному ринку навіть не зважаючи на постійне зростання обсягів виробництва ягід лохини. Окрім високих продовольчих властивостей, суниця має профілактично-лікувальні та загальнозміцнюючі властивості і застосовується у фітотерапії. Культура масово вирощується, як на присадибних ділянках для власного споживання та реалізації на ринку свіжої ягоди, так і на масштабних комерційних насадженнях. Станом на 2005 рік суницю вирощували на 5 тис га із збором в 30 тис. т.. А в 2010 році Україна суницю вирощувала на плантаціях загальною площею понад 8,6-8,8 тис. га. Збір 57,2 тис тон [2]. Згідно із статистичними даними журналу ягідник «... що з 2020 по 2022 рік площа насаджень суниці садової в Україні зменшилася з 8600 до 7100 га, а в 2023 році скоріше всього був антирекорд – менше як 7000 га. Перша причина такої ситуації – війна і все, що з нею пов'язано. А друга – відсутність сертифікованих саджанців власного виробництва, адже в країні практично не залишилось офіційних розсадників суниці: одні закрились, інші залишились на тимчасово окупованій території» цитата за [3].

На межі XX-XXI відбувся скачок індустріальних, інноваційних технологій. В розвинутих країнах зростає купівельна спроможність населення. І споживачі в т.ч. готові купувати суницю за більші кошти але високої якості. Це зокрема, смакові якості, форма і колір, транспортабельність. Відбувається все частіше сортооновлення та сортозаміна, тобто, часте оновлення плантацій. Зокрема, для зменшення пестицидного навантаження для органічного виробництва застосовують ущільнені однорічні плантації із щорічним перезакладанням новим садивним матеріалом на інших плантаціях [1].

1.2. Біологічні особливості *Fragaria* × *ananassa*

Еволюційно кожен ботанічний вид рослин пристосовувався до умов їх поширення. Це зокрема стосується його вимог до кількісного і якісного вмісту елементів живлення, рН та інших показників. Культивуючи той чи інший вид, сорт аграрій, біотехнолог враховує біологічні особливості для отримання максимальних параметрів індивідуального циклу рослини згідно технологічних потреб [4, 5, 6]. Вважають, що *Fragaria* × *ananassa* в XVIII столітті у Голландії виникла як гібрид [7].

Це багаторічна трав'яниста рослина, розмножується насінням (переважно в селекційному процесі), вегетативно: поділом куща, вусами, тобто тонкими повзучими стеблами з видовженими міжвузлями та редукованими листками, що здатні вкорінюватися.

Для суниці добрими є легкосуглинкові, багаті на елементи живлення з високим вмістом гумусу ґрунту за слабо кислої реакції ґрунтового розчину (рН 6,0 - 6,5) та забезпечені вологою.

1.3. Розмноження

Насіннєве. Представники роду *Fragaria* розмножуються насінням та вегетативно. Для вирощування рослин з ботанічного насіння його розміщують на поверхні ґрунту не засипаючи. Це пов'язано із малими розмірами насінин [8]. Для отримання дружних сходів насіння попередньо статифікують низькими позитивними температурами у вологому субстраті 30-40 днів [9, 10]. Насіннєве розмноження застосовується для лісових суниць (*Fragaria vesca* L.) та в селекційних цілях.

Вегетативне. Звичайне вегетативне розмноження проводять поділом куща та укоріненням вусів. У виробничих умовах маточні рослини підтримують в умовах фітосанітарної ізоляції. Ізольовані з них вуса укорінюють в умовах закритого ґрунту. В більшості сортів з маточної рослини у звичайних умовах отримують до десятка вусів, найміцніші перші 2-3 [11, 12]. Тм Тевітта оздоровлені біотехнологічними методами маточні рослини висаджує на грядки в тунелях, отримує з цих рослин вуса (рис. 1.1.), які вкорінюють в касетах [12, 13].



Рис. 1.1. Укорінені вуса, тм Тевітта (Фото Мацкевич Ю.В.)

1.4. Переваги безвірусного розсадництва

Попри високу цінність суниці садової, сортооновлення й сортозаміна високоякісним садивним матеріалом стримується тим, що за звичайного вегетативного розмноження передаються збудники небезпечних хвороб: бактерії, фітоплазми, віруси та віроїди. Основна причина цього антропогенна. Агробіоценози є нестійкими до абіотичних і біотичних факторів, що сприяє швидкій природній “ селекції ” фітопатогенів. Згідно тривалої діагностики лабораторно-виробничого комплексу Фармер ЮА [14], на українських плантаціях масовими є 16 фітопатогенних мікроорганізмів: віруси - 9 видів; гриби - 4 види; одна бактерія та одна фітоплазма. Відділ вірусології, оздоровлення і розмноження плодових і ягідних культур Інститут садівництва Національної академії аграрних наук України на суниці найчастіше виявляє такі [цитата за 15, 16] «...збудники: : 1. Вірус зморшкуватості 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 (ApMV)».

Грибну та бактеріальну інфекцію стримують та контролюють профілактичними та викорінюючими обробками, що не можна у випадку із віроїдами, вірусами та фітоплазмами [17]. Однією із причин цього є те, що останні менші за клітину і є внутрішньоклітинними паразитами. В боротьбі з вірусами, можна говорити, “ що не можливо знищити вірус, не знищивши клітину, господаря ” [18]. Розвиток суспільства, в тому числі транспорту та логістики сприяє збільшенню кількості видів патогенів в окремих регіонах шляхом трафіку їх з інших держав, материків. Так, в Європі з'явилися фітоплазми, які раніше не зустрічалися: *Cydonia* Mill., *Fragaria* L., *Malus* Mill., *Prunus* L., *Pyrus* L., *Ribes* L., *Rubus* L. і *Vitis* L. [16, 19, 20].

Збільшенню інфекційного навантаження сприяє й те, що майже всі патогени суниці садової, є поліфагами, тобто можуть харчуватися,

розмножуватися на інших культурах (бур'янах, рослинах сусідніх полів, лісопосадок, садів...). Так фітоплазма жовтяниці айстр уражує окрім суниці айстри, моркву, селеру [21].

За своїм систематичним положенням, будовою фітоплазми умовно займають проміжне положення між вірусами та бактеріями. Тобто, менші за бактерії, але мають хоч і примітивну, однак клітинну будову. Якщо для вірусів характерно ураження переважно при вегетативному розмноженні та комахами переносниками, то фітоплазми уражують й при дорощуванні садивного матеріалу [22].

Фітоплазми в суницях, як внутріклітинний паразит зумовлює вигляд та специфічні ознаки уражених господарів. Це, зокрема і утворення філодіїв (перетворення частин квітки у фотоасимілюючі органи), появу червоного забарвлення листя, гіпертрофірованих сім'янок [23], нетипове розростання пагонів. Все це збільшує привабливість уражених рослин для комах переносників фітоплазм [16, 17]. Такі рослини переважно не здатні до утворення ягід, розмноження і гинуть [24].

Вірусам не властива клітинна організація. Складаються із нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) та захисної оболонки (капсид), у віроїдів останній відсутній [4, 5]. Переносяться при механічних пошкодженнях. Це зокрема під час заходів догляду, вегетативного ділення маточних рослин та комахами переносниками.

Отримати вільний від вказаних вище патогенів звичайними технологіями вегетативного розмноження складно, тому сучасне розсадництво суниці садової, як і більшості культур базується на біотехнологічних методах діагностики, оздоровлення та розмноження [5, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 59].

Виробництво вільного від збудників хвороб садивного матеріалу можливо лише за комплексного застосування діагностики материнських рослин та вегетативних ліній дочірніх рослин, застосування меристемнотканевого методу та дотримання фітосанітарного стану при адаптації [5, 16, 25].

1.5. Біотехнологічні складові в системі безвірусного садівництва суниці садової

Так, як суниця садова в Європі є основною ягідною культурою її розсадництво та товарне вирощування регламентується низкою нормативних документів. Це, зокрема стандарти Європейської і Середземноморської організації з карантину та захисту рослин (EPPO). Наша держава з 1994 року є членом цієї організації [30, 31]. Більшість схем сертифікації вирощування садивного матеріалу відповідає стандартам EPPO.

Відповідно існують такі категорії садивного матеріалу: вихідний матеріал (Candidateplant); добазовий (ядерний) матеріал (Nuclear stock / SEE / SPP); базовий матеріал (Propagation stock / SE1-SE2-EE / CP1-CP2 / Foundation stock); сертифікований матеріал (NaktuinbouwElite – ‘E’ / Certificato / A-grade / Certifiedstock); стандартний матеріал (CAC / Approved Health). Основою для створення найвищої категорії є оздоровлені рослини *in vitro*.

Біотехнологічні методи в окремому застосуванні є малоефективними або не ефективними для боротьби чи запобіганню наявності збудників хвороб в садивному матеріалу [4, 5, 16].

Тм Тевітта (ТОВ «Агрофірма «Благодатне», агрохолдинг ЛНЗ) тобто внесені до Єдиного реєстру України виробників садивного матеріалу, та має ліцензії на ряд сортів суниці садової, малини, ожини [60, 61].

В цілому складовою такої системи є:

1. відбір за господарськоцінними ознаками, генетичною константністю;
2. діагностика донорів експлантів;
3. підготовка донорів первинних експлантів;
4. ізоляція меристемних експлантів;
5. МКР (отримання асептичної культури, мультиплікація, індукція ризогенезу, постасептична адаптація);
6. тестування меристемних ліній на якість оздоровлення та генетичну константність;

7. залучення безвірусного матеріалу в розмноження в ізолюованих умовах закритого ґрунту [25, 32, 33].

Отже, не зважаючи на існування відпрацьованих технологій за появи нових сортів, нових потреб ринку, дослідження, як окремих компонентів, так і усього технологічного ланцюга потребують подальшого вивчення та удосконалення.

АБТОБНАУ

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Основні локації дослідної роботи

Дослідження за темою кваліфікаційної магістерської роботи проводилися із залученням лабораторії мікроклонального розмноження тм Тевітта (ТОВ «Агрофірма «Благодатне», агрохолдинг ЛНЗ) (рис.2.1, 2.2) та з використанням інформаційних інтернет-ресурсів.



Рис. 2.1. Ламінарна (операційна) кімната (зверху) та фрагменти культивацийних кімнат

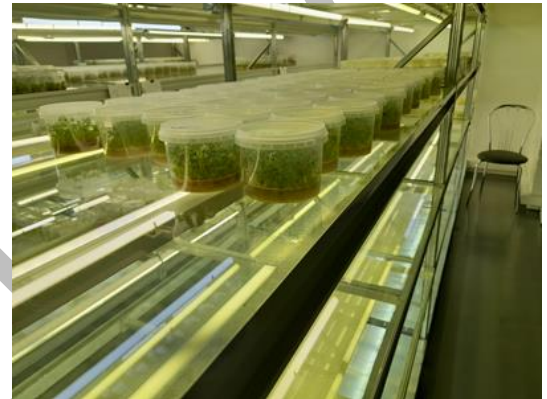
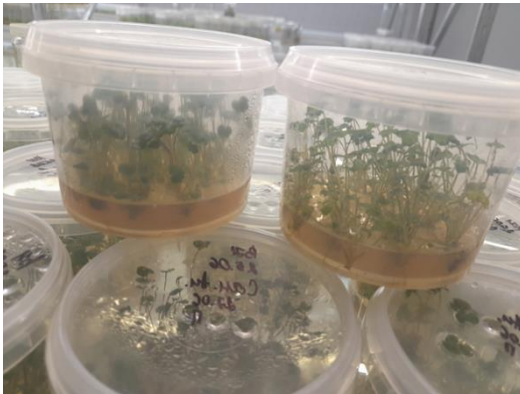


Рис. 2.2. Лабораторія МКР

2.2. Етапи досліджень

Серія експериментальних дослідів, аналізу інформаційних ресурсів, аналізу власних експериментальних даних проведено згідно послідовності етапів мікроклонального розмноження:

- 0 підготовка донорів первинних експлантів;
- 1 отримання асептичної морфогенної культури;
- 2 мультиплікація *in vitro*;
- 3 індукція коренеутворення;
- 4 постасептична адаптація.

Як в межах окремого етапу, так і усього технологічного процесу дотримувалися принципу “steep by steep”. Тобто кращий варіант попереднього дослідів був контролем в наступному.

Депозитарій. Підготовка маточних рослин та ізоляція первинних експлантів для їх деконтамінації проводилася в умовах депозитарію – це ізольоване приміщення з контрольованими параметрами (вологість, температура, освітлення) із заходами унеможливлення проникнення, розмноження векторів переносу інфекції. Рослини в депозитарій відбиралися за результатами аналізів на генетичну константність та наявність збудників хвороб. Для цього зразки під шифрами надавалися в три незалежні лабораторії. Рослини висаджували в 10 л контейнери (рис. 2.3.). Освітлення в депозитарію штучне, розсіяне 4000 люкс. В приміщення проводили фунгіцидні, бактерицидні та інсектицидні обробки та заходи біологічного захисту [34].



Рис. 2.3. Початок культивування маточних рослин суниці садової в депозитарії

Вуса рослин із депозитарію використовували для ізоляції меристем. Підготовчі етапи полягали в обробці фунгіцидом Превікур Енерджі 840 SL, РК (Магнікур Енерджі 840 SL, РК). Діюча речовина пропамокарб гідрохлорид 530 г/л, фосетил алюмінію 310 г/л . Виробник Байєр (Bayer).

Для запобігання самоінтоксикацією продуктами окиснення фенолів додавали антиоксиданти: полівініл піролідон (1г/л); аскорбінова кислота (3 мг/л).

Деконтамінація. Для звільнення рослинного матеріалу з якого безпосередньо вищеплювалися первинні експланти (стеблові живці, меристеми) його занурювали в один з розчинів антисептиків: гіпохлорит натрію; сулема; препарат Бланідас 300.

Після обробки антисептиками рослинний матеріал тричі промивали в автоклавному дистилаті. Потім стерильні джерела експлантів (шматки вусів з бруньками) переносили в стерильні чашки Петрі.

Для висадки стеблових живців відокремлювали частину пагона, що утворює вус, із брунькою і переносили на живильне середовище. Вищеплення меристемних експлантів розміром 0,15 - 0,20 мм проводили під біокулярним мікроскопом з підсвічуванням ST60-24B2 зі збільшенням 1:40.

На етапі мультиплікації маточні рослини живцювали (поділом куща, відокремленням вус) на середовищі збагачені речовинами з цитокініновою активністю (бензил амінопурин, кінетин, аденін). Для індукції ризогенезу живцювання проводилося на середовища збагачені синтетичними ауксинами (індолілмасляна та індолілоцтові кислоти).

Постасептичну адаптацію проводили у звичайних вологих камерах (рис. 2.4.) та фотоавтотрофних біореакторах (рис. 2.5., 2.6.).

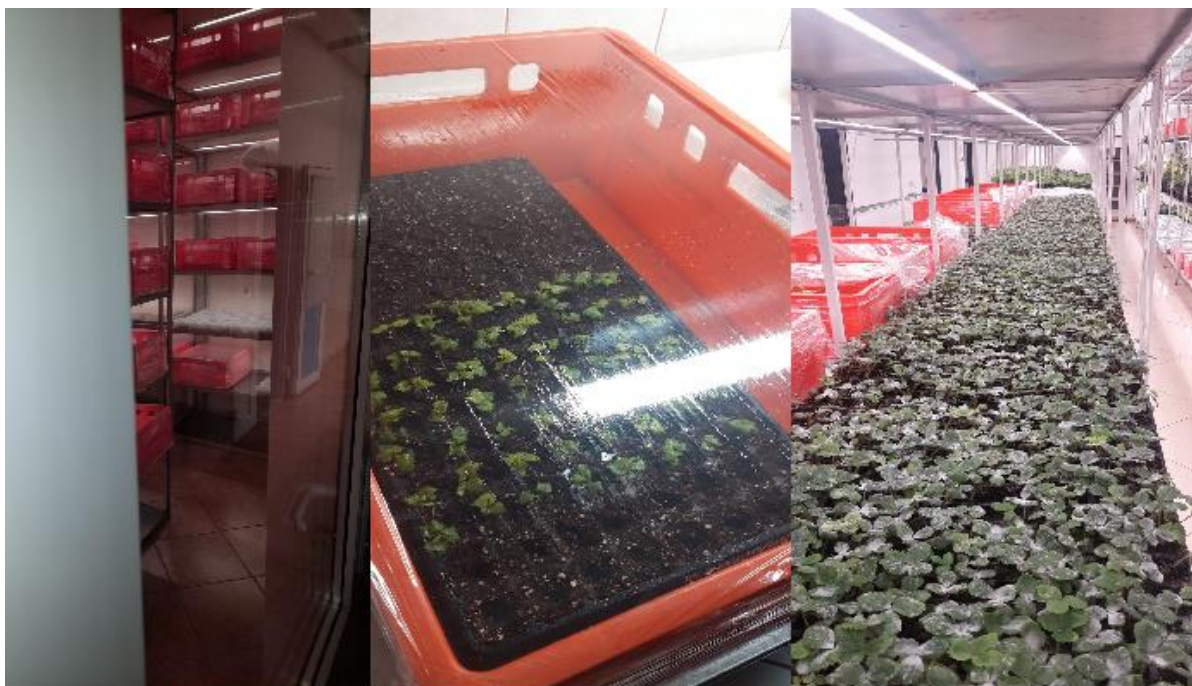


Рис. 2.4. Постасептичне дорошування суніці садової у вологих камерах

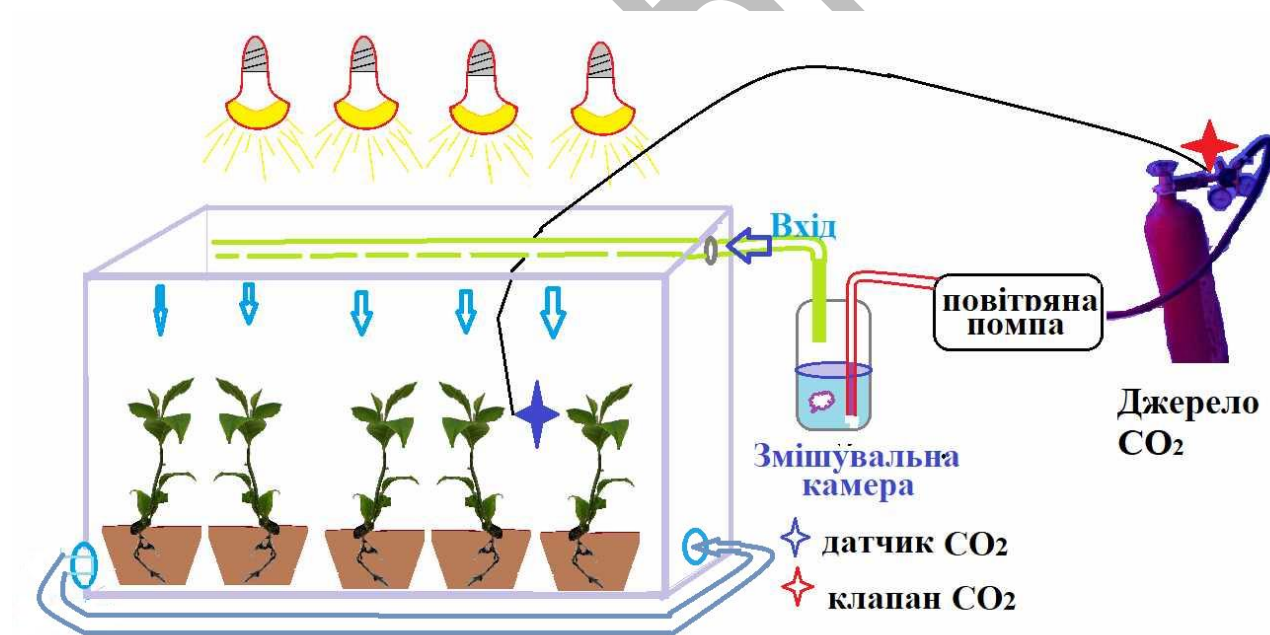


Рис. 2.5. Логічна схема роботи біореактора



Рис. 2.6. Особливості будови біореактора

2.3. Особливості асептичного культивування

Культивування проводилося згідно методик розроблених В.В. Мацкевичем та колегами [5, 6]. Ємності. Рослинні об'єкти (меристемні експланти, живці) висаджували в скляні банки загальним об'ємом 200 мл закриті прозорими поліпропіленовими кришками твіст-офф 66 мм стійкими до автоклавування (рис. 2.7.). Вміст живильного середовища 30 мл.



Рис. 2.7. Культуральні ємності

Мікроклімат. Фотоперіод 16 годин на добу світло, 8 годин темнота. Інтенсивність освітлення 2400 люкс. Спектр холодний білий. Температура 24 ± 2 °C. Вологість 70-80 %. Вентиляція - повний обмін усього об'єму повітря протягом доби з використанням системи надлишкового тиску, тобто за добу в приміщення нагнітався рівний або дещо більший об'єм свіжого фільтрованого повітря, який дорівнює об'єму культивування кімнат.

Штучні живильні середовища. В дослідженнях використано три прописи живильних середовищ (MS - за прописом Мурасіге і Скуга, як контроль; № 1 та № 2 власні розробки), які відрізнялися між собою за макросолями, солями заліза та кальцію (рис. 2.8.).



Рис. 2.8. Мінеральна компонента штучних живильних середовищ, мг/л

Органічна складова та мікросолі для усіх прописів, окрім дослідів з гормонами були незмінними. Як загущувач використовували агар. Екзогенним джерелом вуглеводів була сахароза. Середовище автоклаували при тиску 1,1 ам. Кислотність (рН) встановлювали до автоклавування за допомогою розчинів КОН та НСІ та контролювали рН- метром з точністю до 0,01 (рис. 2.9.).



Рис. 2.9. Контроль рН штучного живильного середовища

2.4. Характеристика сортів суниці садової залучених в дослідження

Розсадник тм Тевітта внесений до Єдиного реєстру України виробників садивного матеріалу. За ліцензіями вирощує садивний матеріал суниці садової, малини, ожини [35, 36]. В досліді використано рослини двох сортів суниці садової: Альба, Презент, які відрізнялися за низкою біологічних особливостей, зокрема скоростиглості.

Сорт Альба ранній, крупноплідний, створений в Італії. Поширений на європейських плантаціях. Стійкий до хвороб кореневої системи. Придатний для вирощування як у теплицях так і відкритому ґрунті.

Сорт Презент української селекції, середньопізннього строку досягання. Рослини середньорослі, стійкі до плямистостей листя і сірої гнилі ягід. Використання універсальне [2].

2.5. Статистичні особливості досліджень

В досліджах дотримувалися принципу єдиної логічної відміни. Повторність дослідів чотирикратна в просторі і трикратна в часі. За одне біологічне повторення брали:

- на етапі введення в асептичні умови 50 первинних експлантів;
- на етапах мультиплікації, індукції одна культуральна ємність із 5 регенерантами, як результат бралось середнє по 5 рослинах;
- на етапі постасептичної адаптації одна теплична касета із 64 комірками.

Достовірність даних визначали за розрахунками середньоарифметичного відхилення.

РОЗДІЛ 3. УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ СКЛАДОВИХ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ¹

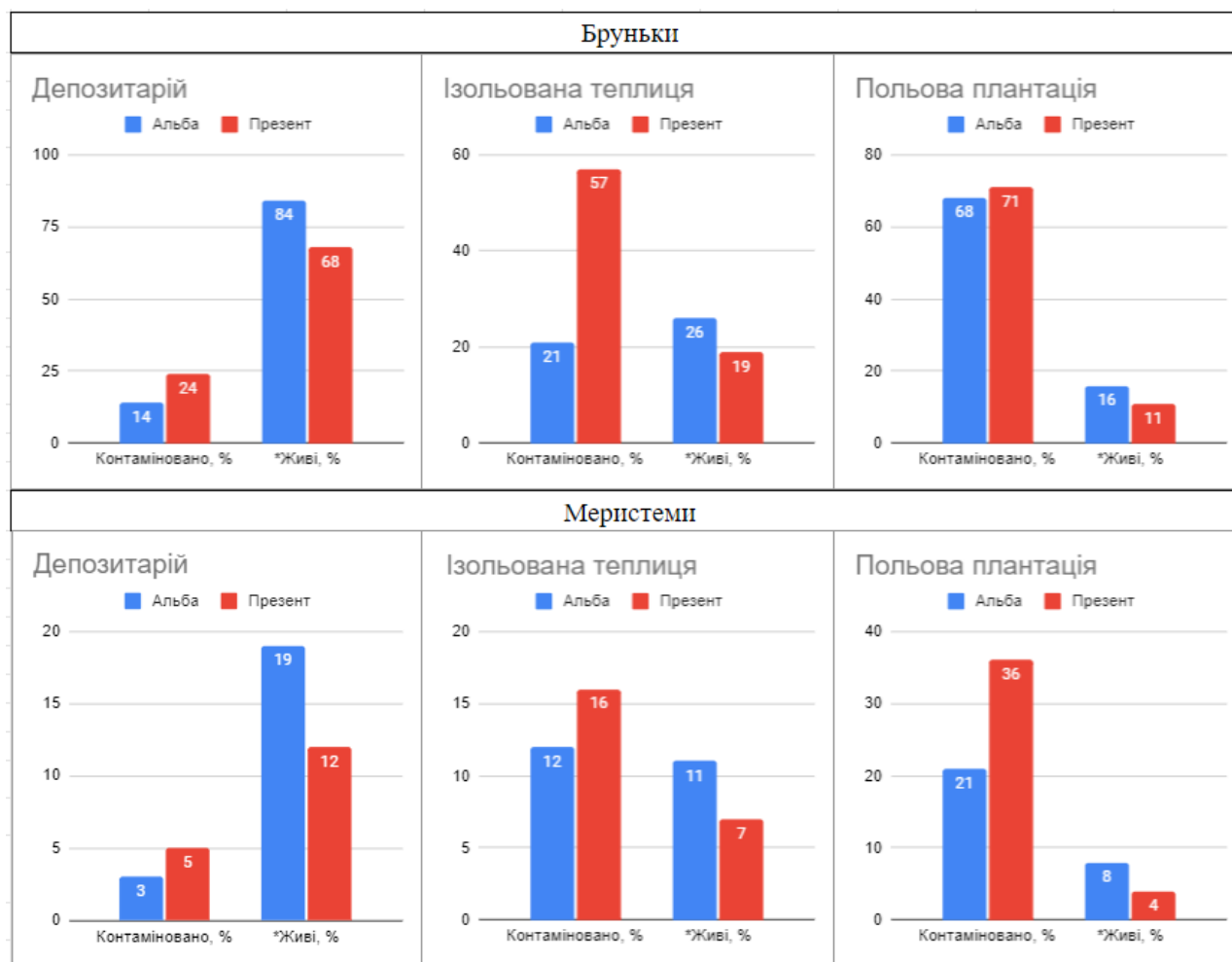
3.1. Вплив стану материнських рослин на ефективність деконтамінації та морфогенезу первинних експлантів

Умови вирощування донорів, вік, час, заходи запобігання та контролю мікробіологічних контамінантів впливають, як на морфогенез так і забрудненість первинних експлантів (стеблові живці, меристеми) [1, 6, 16]. Мікроорганізми, які контамінують первинні експланти в природі можуть навіть і не завдавати прямої шкоди рослинам. Однак потрапляючи на штучне живильне середовище, інтенсивно розмножуються, змінюють склад, консистенцію середовища додають токсичних продуктів метаболізму. Тому збудники хвороб і контамінанти не завжди одне і теж. Проте, на першому етапі без звільнення від одних і других ефективно мікроклональне розмноження не можливе [4, 5, 37, 38]. Від контамінантів первинний рослинний матеріал (сегменти пагону) звільняють застосовуючи контактні антисептики, а в окремих випадках, при наявності ендогенної мікрофлори застосовують системні фунгіциди або антибіотики [39]. Для звільнення від фітопатогенів (віруси, віроїди та ін.) одних заходів деконтамінації не достатньо. В цьому випадку застосовують поєднання сучасних діагностичних заходів (ПЛР аналіз) та культивування меристем [5, 25, 37].

Нами досліджено ефективність підготовки донорів експлантів на “нульовому етапі” на відсоток деконтамінованих первинних експлантів (пагонових сегментів) та їх морфогенну активність (рис. 3.1.). Деконтамінацію проводили вичленяючи із пагона, що формував вуса, сегменти довжиною 1,5 - 2,0 см із брунькою. В якості донорів використано три варіанти рослин, які росли

¹За частиною представлених результатів в цьому розділі автором дипломної роботи Мацкевич Ю.В. у співавторстві опублікована стаття у фаховому виданні: 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.]

в таких умовах: відкритий ґрунт (поле); закритий ґрунт (плівкова теплиця); депозитарій.



* кількість живих експлантів серед деконтамінованих

Рис. 3.1. Вплив умов вирощування донорів експлантів на їх контамінування та приживлюваність, % (час вичленення 11.01.2023)

Встановили відмінності, як по варіантах підготовки донорів, так і сортові особливості. Варіант із забором первинних експлантів з польових умов на нашу думку виявився не технологічним. Це зокрема, пов'язано із малим, порівняно з іншими варіантами відсотком первинних експлантів які виживали. В сорту Альба живими залишалися 16 % а сорту Презент 11 % бруньок. Кількість меристемних експлантів була ще меншою: 8 і 4 % відповідно. Причини такого низького показника приживання первинних експлантів є порівняно жорсткіші умови донорів експлантів. Це факторонестатичні освітлення, температура,

вологість, вітер, шкідники і т. ін. Зокрема, за інтенсивного освітлення в рослинах синтезується підвищена кількість фенолоподібних речовин, які при окисненні, наприклад, при травмах пов'язаних і вичлененням експлантів перетворюються до токсичних хінонів. В природі це є захисною реакцією, але в замкнутій культуральній ємності стають фітотоксичними для рослинних об'єктів [40, 41]. В закритому ґрунті, теплиці кількість сонячної радіації значно менша, а у випадку депозитарію використовується лише штучне освітлення. Таким чином, відносна кількість сонячної радіації може впливати через метаболізм на приживання первинних експлантів.

Неможливість створити закриті умови для трансферу інфекційних векторів, контамінантів проявилася й на кількості забруднених, як патогенної так і деструктивною мікрофлорою. Остання руйнувала штучне живильне середовище, насичувала його своїми метаболітами (про що свідчило зміна його забарвлення, структури, консистенції), які також пригнічували розвиток рослинних об'єктів в більшості випадків до їх загибелі. Для брунькових експлантів по сорту Альба кількість контамінованих становила із донорів вирощених в депозитарії 14 % при 21 % серед експлантів із тепличних донорів та 68 з польових донорів (рис. 3.2.). В сорту Презент тенденція така ж: 24, 57, 71. Слід відмітити, що на відсоток контамінованих первинних експлантів впливали й біологічні особливості сортів в дослідженнях. В сорту Альба по усіх варіантах кількість контамінованих первинних експлантів була меншою.

Поряд з фактором (умовами) вирощування донорів важливим є й тип первинного експланта, тобто брунька та меристема. З точки зору анатомії рослин, меристема є частиною бруньки. А саме, верхівкою конусу наростання. Саме менший розмір меристем, відсутність плазмодесм забезпечує менший вміст в ній, як контамінуючої, так і патогенної мікрофлори [6, 27, 42].

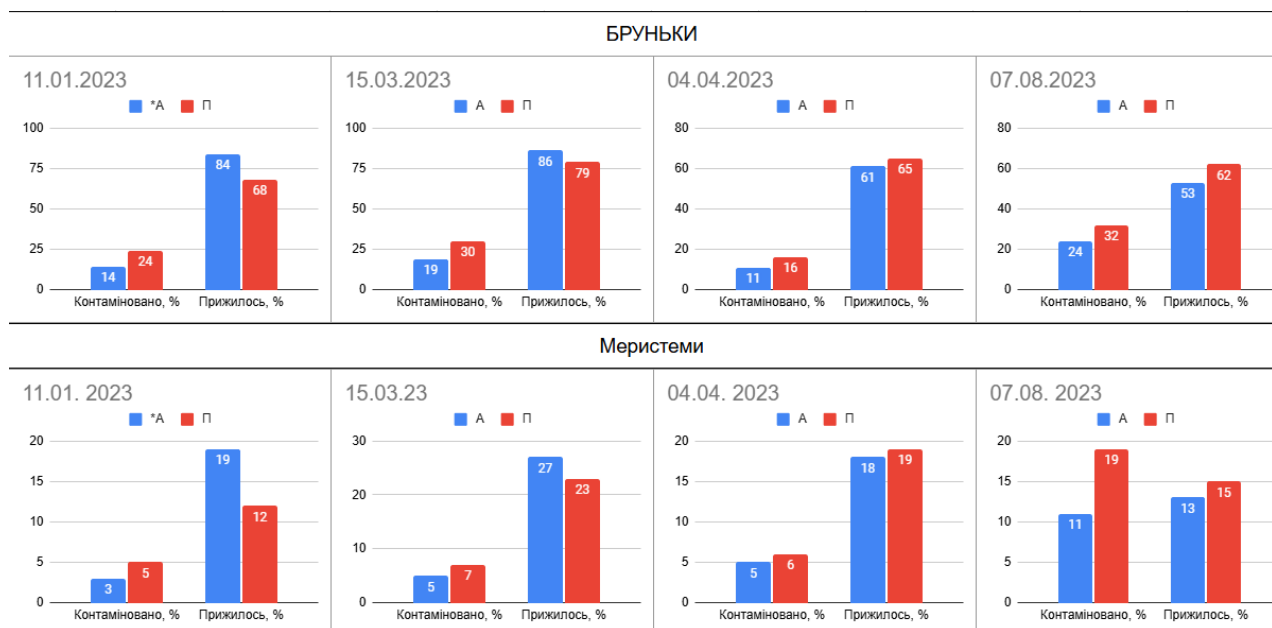


Рис. 3.2. Контамінування та приживлюваність первинних експлантів залежно від часу вегетації донорних материнських рослин, %

Також на вихід вільних від контамінантів впливали вид антисептика. Серед порівнюваних найкращі показники отримані за деконтамінуючої обробки препаратом Бланідас 300 (рис. 3.3.), що співпадає із результатами досліджень інших авторів [47, 48, 49].



Рис. 3.3. Кількість живих та деконтамінованих експлантів залежно від антисептика, %

Однорічний пагін вищих рослин проходить 12 етапів органогенезу за Ф.М. Куперман [6]. У виробничих умовах за ВВСН ріст і розвиток поділяють на 10 фаз, кожна з яких включає 10 підфаз. Всього 100 підфаз [43]. З переходом з однієї фази, підфази відбуваються фізіолого-біохімічні, морфоанатомічні зміни. Це, зокрема зміна в метаболізмі, накопиченні і активації / декапітації ендогенних гормонів - головних детермінантів онтогенезу [6, 44, 45]. Саме гормони і їх поєднання, як ендогенних так і екзогенних (синтетичних) детермінує онтогенез первинних експлантів на етапі *in vivo* - *in vitro*. Для вивчення впливу часу розвитку маточних рослин суниці вичлення експлантів проведено в такі варіанти за календарним часом: 11.01. 2023; 15.03.23; 04.04. 2023; 07.08. 2023. Так, як раніше на інших культурах було встановлено, що при ізоляції з донорів, які знаходяться в стані спокою, високий відсоток контамінованих і майже відсутні морфогенні експланти [46], то нами такий варіант був відхилений.

Найбільша кількість, як меристем них, так і брунькових первинних експлантів прижилось при їх ізоляції в березні (15.03.23). По контамінуванні між варіантами чіткої залежності не встановлено. Найнижчі, на нашу думку технологічно не прийнятні, показники були на варіанті із вичлененням первинних експлантів в серпні. Встановлено вплив також сорту на досліджувані показники. Сорт Альба порівняно із сортом Презент за перших термінів ізоляції (11 січня та 15 березня) мав вищі показники морфогенезу. Первинні експланти сорту Презент порівняно із сортом Альба на варіантах ізоляції в квітні та серпні переважали за показником регенерації. Первинні експланти по усіх чотирьох варіантах ізоляції містили після обробки антисептиком по сорту Презент були більш інфіковані.

3.2. Живильне середовище, як сумарний трофічний детермінант онтогенезу експлантів

Трофічна детермінація індивідуального розвитку, окремого органу чи цілісного організму визначає, які якісні та кількісні зміни. Зокрема, це стосується й особливостей метаболізму, його змін на переході *in vivo* - *in vitro* [5, 6, 48]. Зміни умов існування біологічного об'єкта індукують переформатування його метаболізму [44, 45]. Зокрема відбувається зміна автотрофного і гетеротрофного живлення за міксотрофної системи живлення [50]. Вплив трофічного живлення *in vitro* умовно можна розділити на детермінування кількістю і якістю: 1) мінеральних компонентів; 2) органічних компонентів (джерела вуглеводневого живлення, амінокислоти, вітаміни...). З досвіду низки дослідників на етапах адаптації кращими є протоколи із порівняно нижчим вмістом нутрієнтів [5, 6, 51].

На етапах адаптації до *in vitro* тобто отримання певинної “пробіркової” культури та мультиплікації в якості контролю використали мінеральну основу середовища Мурасіге і Скуга [52]. В якості середовища із низьким вмістом використано середовище “№ 1” розроблене для ківі із низьким вмістом мінеральних компонентів [53]. Як середовище з високим вмістом мінеральної

частини однак зі зміненим їх співвідношенням використано середовище “№ 2”, яке за своїм складом близьке до середовищ, які використовуються для мікроклонального розмноження картоплі, павловнії та низки інших культур [29, 54, 55]. Органічна компонента усіх сортів була константною: цитокінін - бензиламінопурин (БАП) 1,0 мг/л; ауксин індолілмасляна кислота (ІМК) 0,1 мг/л; цукор, агар, амінокислоти вітаміни з однаковим вмістом. На ці три варіанти живильних середовищ висаджували бруньки та меристеми (рис. 3.4)

Необхідність використання одночасно двох видів первинних експлантів викликана низкою факторів. Бруньки порівняно з меристемами швидше регенерують. Регенераційний процес брунькових експлантів відбувається прямим морфогенезом, тобто менша ймовірність мутацій, які можуть бути за непрямого морфогенезу, тобто утворення калюсів. Також на варіанті з бруньковими експлантами відбувається швидше старт мультиплікації. Швидший старт дозволяє почати, як власне множення, так і відпрацювання елементів технології, зокрема трофічних та гормональних детермінант відповідно геному біологічного об'єкта *in vitro*. А вже потім на відпрацьованому протоколі проводити масові роботи з використання в якості основних первинних експлантів меристем. Можливий варіант і використання брунькових експлантів в якості первинних за умови досконалого аналізу і відсутності за його результатами інфекції в донорних рослин [4, 5, 16, 55]. “Меристемний шлях” хоч і триваліший та менший за виходом регенерантів, однак з використанням діагностики оздоровлює навіть хворий матеріал. Це не можливо при ізоляції бруньок із рослин, що містять інфекцію.

Оскільки геном як бруньок так і меристем однаковий то й отримані трофічні детермінантні закономірності будуть в більшості випадків однаковими [5, 44]. Висаджуючи вичлені із маточних рослин, які росли в депозитарії бруньки та меристеми дослідили вплив різних за мінеральним складом живильних середовищ на такі показники: вихід живих експлантів; кількість (у відсотках) експлантів в яких був прямий морфогенез; кількість в яких регенерація

відбувалася через процеси дедифернціації (калюсоутворення) та подальшої ініціації, дефуринціації та проліферації бруньок *de novo*.

На ці показники впливали: 2 типи первинних експлантів (бруньки і меристеми); 3 середовища (MS, №1, №2); 2 сорти (Альба, Презент). Порівнюючи бруньки і меристеми встановлено відмінність в кількості живих експлантів. Залежно від середовища й сорту з бруньок отримано 79-94 % вижило при 23-47 % виживання з меристею. По обох типах експлантів більше виживало на середовищі № 1. Це середовище із найнижчим вмістом мінеральних речовин. Експлантам сорту Альба порівняно із сортом Презент властивий більший відсоток виживання. На середовищі № 1 відмічено більшу кількість експлантів, які розвивалися шляхом прямого морфогенезу.

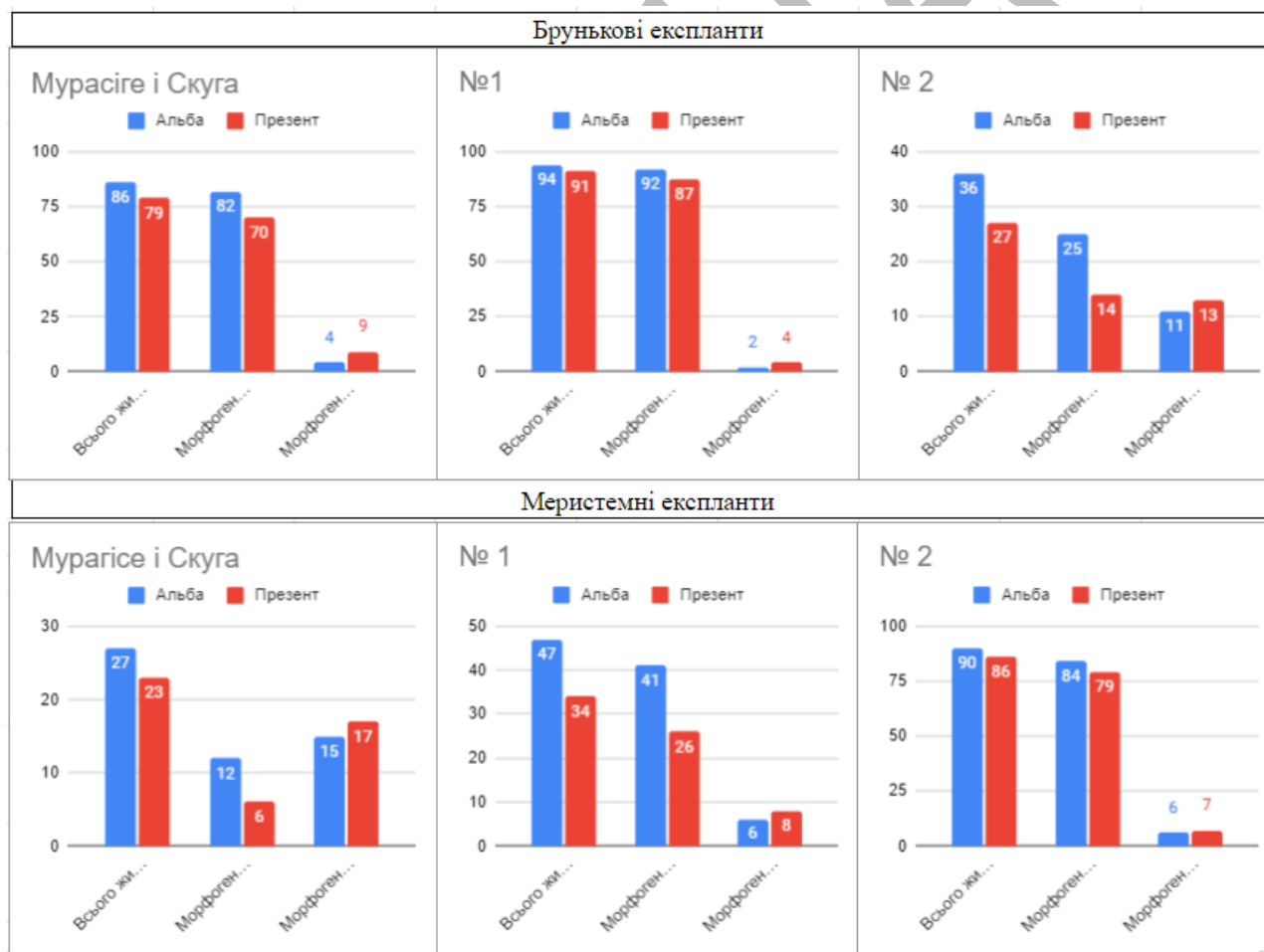


Рис. 3.4. Трофічна детермінація морфогенезу первинних експлантів, % (ізоляція донорів в березні)

Отже, в подальшому для первинних експлантів використовували середовище № 1.

Морфогенез детермінується не лише особливостями метаболізації тих чи інших нутрієнтних складових. Фітогормони в рівнях організації життєдіяльності організмів знаходяться вище трофічних детермінантів [44, 46]. Вони на відміну від нутрієнтних, первинних метаболітів не є будівельним матеріалом або джерелами енергії. Водночас гормони є вторинними метаболітами і їх синтез, утворення активних, зв'язаних чи запасних форм та деактивація значно залежать від обміну речовин [6, 45]. Природні гормони із-за їх високої вартості рідко застосовують в масштабному мікроклональному розмноженні. В комерційних цілях застосовують синтетичні аналоги, або речовини з подібною активністю [44, 56, 57].

Для розробки протоколу на етапі отримання стабільної морфогенності первинних експлантів випробувано синтетичні речовини з цитокініненовою активністю: БАП (бензиламінопурин); кінетин; аденін, як попередник природного цитокініну з якого рослинний організм синтезує ендогенний цитокінін [6, 56]. В живильне середовище додавали речовини за наступною схемою (рис. 3.5.):

- бензиламінопури (БАП) в кількості один міліграм на літр живильного середовища (1,0 мг/л);
- кінетин 1,0 мг/л;
- аденін, 1,0 мг/л
- БАП 0,33 мг/л + кінетин 0,33 мг/л + аденін, 0,33 мг/л.

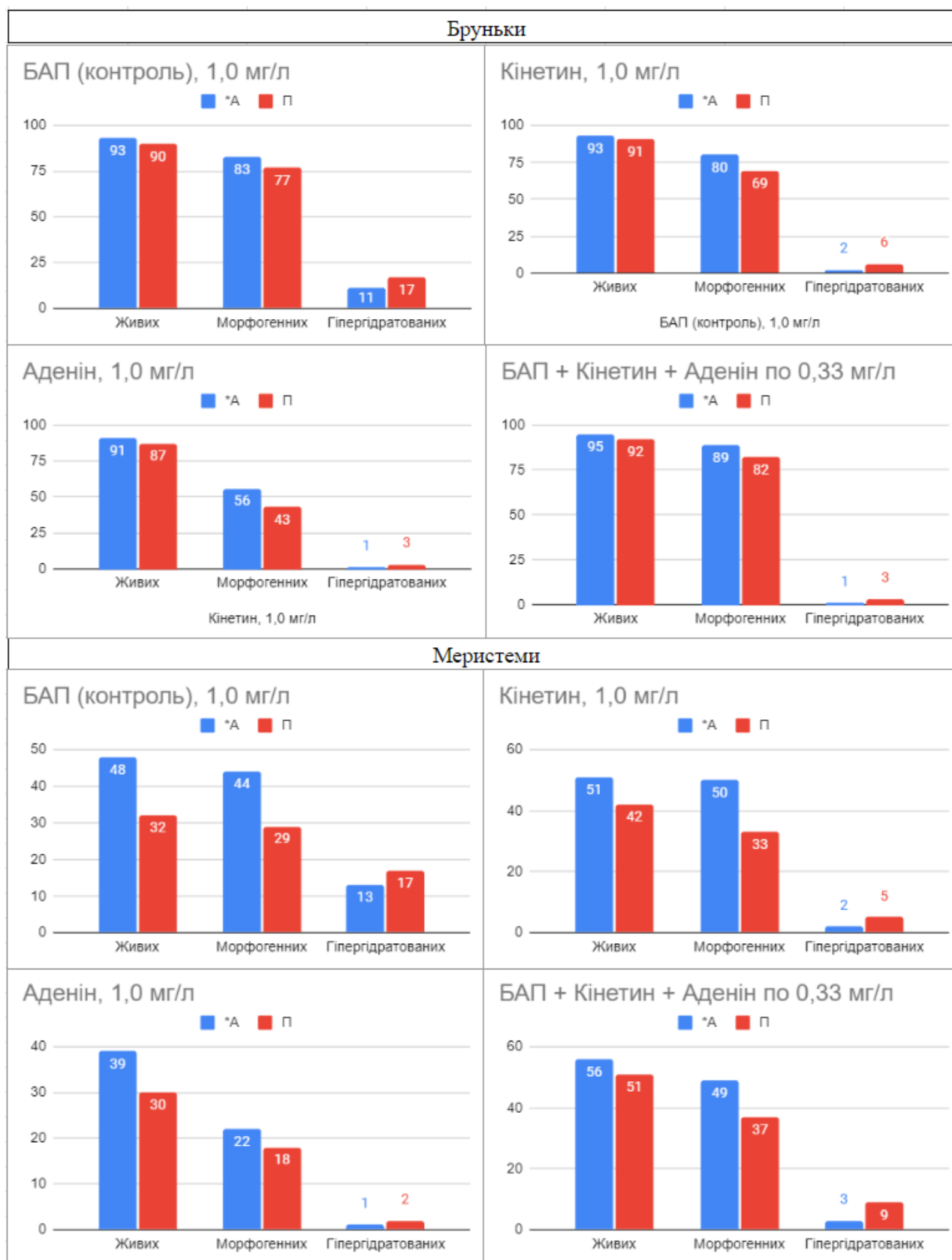


Рис. 3.5. Фітогормональна детермінація синтетичними речовинами із цитокініновою активністю при культивуванні експлантів за прописом середовища № 1 з фоновим додавання ауксину ІМК в кількості 0,1 мг на один літр

Порівнюючи приживлюваність брунькових експлантів не встановили суттєвих відмінностей стосовно їх приживлюваності. 90-95 % бруньок приживалось. На приживлюваність меристем суттєво впливали синтетичні речовини з цитокініноюю активністю. Найвищий показник приживлюваності встановлено за сумісного додавання трьох речовин. По сорту Альба приживлюваність меристемних експлантів в середньому становила 57 %. В сорту Презент приживалося менше меристем - 49 %. Решта варіантів мали лише один із синтетичних цитокінінів і на таких середовищах приживалося менше меристем. З меристем сорту Альба на варіантах із одним з видів цитокініну приживлюваність становила 44-48 %, а з меристем сорту Презент приживалося 29-33 %. По окремих варіантах різниця по сортах була близькою 5 %, тобто на рівні статистичної помилки.

Вищий відсоток приживання бруньок порівняно із меристемами пов'язаний перш за все з розмірами цих біологічних об'єктів. Бруньки, як більші об'єкти містили порівняно більшу кількість ендогенних нутрієнтів та біологічно-активних речовин, в т.ч. й фітогормонів. Також, співвідношення об'єму експланту і раневих поверхонь було меншим в брунькових експлантів.

Кращі показники регенерації (більша приживлюваності, більша кількість морфогенних експлантів та менший відсоток експлантів із гіпергідратованими тканинами) із сумішшю речовин з цитокініноюю активністю на нашу думку ґрунтуються на тому, що гормони одного й того ж класу але в різній формі не однаково детермінують процеси життєдіяльності [6, 44, 46, 58].

Надлишок екзогенних гормонів може проявляти фітотоксичний вплив. Однією з ознак фітотоксичності є патологічна підвищена проникність рослинних клітин для молекул H_2O , що є причиною надмірної гіпергідратації, тобто надлишку води (надлишкова обводненість) [5, 6, 17]. Саме на варіанті із композицією фітогормонів (з 1/3 концентрації кожного) показник гіпергідратації був найнижчим.

Найвищі показники морфогенного потенціалу були на варіанті з композицією з трьох речовин та на варіанті з БАП (1,0 мг/л). Найнижчий

показник гіпергідратації (надмірної обводненості) відмічено в додаванні композиції речовин з цитокіновою активністю в однакових складових (0,333).

За кількістю експланти, як брунькові, так і меристемні були найбільш морфогенними на середовищі з додаванням бензиламінопурину.

На варіанті із експлантами сорту Альба кількість морфогенних бруньок становила 83 %, а меристем 44 %. В експлантів сорту презент цей показник був нижчим: в брунькових - 77 %; в меристемних 29 %. Попри високу морфогенність експлантів на цьому варіанті відмічено й найвищий показник надмірної обводненості тканин (гіпергідратація або іншими словами вітрифікація).

3.3. Гіберелові кислоти, як фітогормональні детермінанти на етапі мультиплікації

Окрім трофічної досліджено фітогормональну детермінацію закладання міжвузль, тобто коефіцієнту розмноження при живцюванні одновузловими живцями (рис. 3.6.) При першому застосуванні під час живцювання гіберелінів значно збільшився коефіцієнт розмноження, тобто кількість технологічно придатних до поділу експлантів. Це відбулося в наслідок детермінації пробудження більшої порівняно із безгібереліновим середовищем пазушних бруньок та закладання вусів з одним двома додатковими міжвузлями (рис. 3.7.).

В регенерантів сорту Альба коефіцієнт при додаванні ГК₃ збільшився із 3,1 до 3,9.

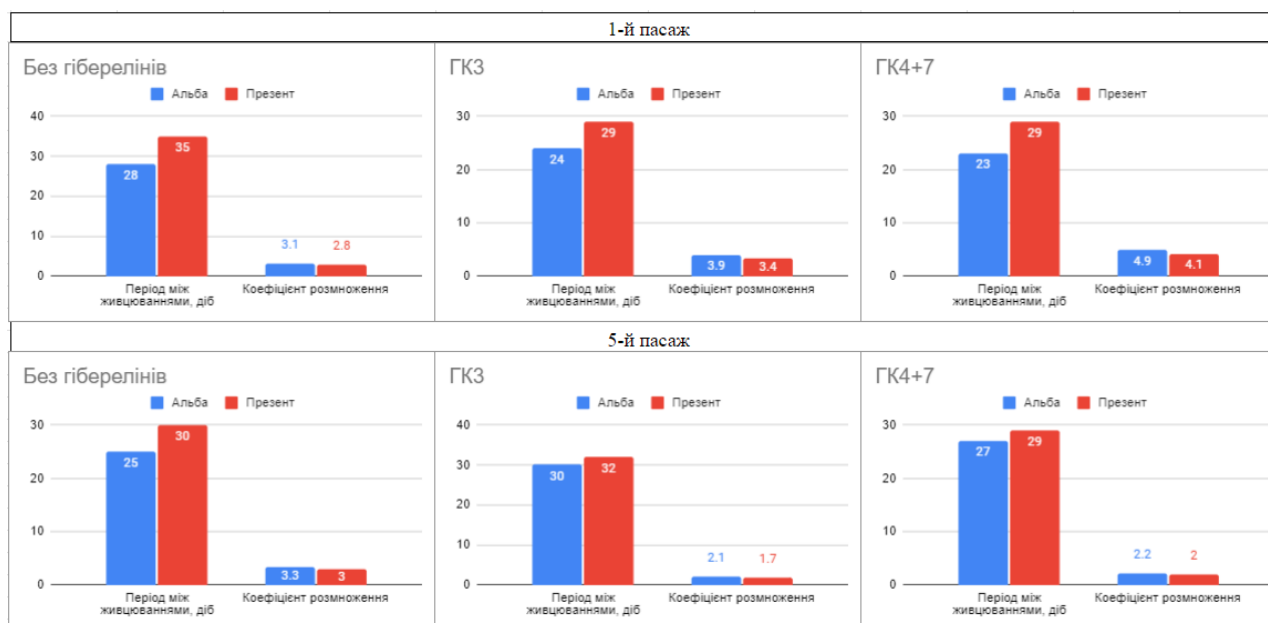


Рис. 3.6. Особливості морфогенезу первинних експлантів на різних живильних середовищах, % (БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0, ІМК 0,1)

При додаванні препарату із гібереліновою активністю Gibb plus (ГК₄₊₇) коефіцієнт зріс до 4,9. Таким чином встановлено різну ефективність на варіантах із гіберелінами ГК₃ та ГК₄ + ГК₇. Варіант ГК₄₊₇ виявився значно ефективнішим. Гіберелінові препарати по сорту Альба не впливали на тривалість періоду культивування, а по сорту Президент відмінено збільшення часу із 29 днів на безгібереліновому варіанті до 35 діб на середовищі із гіберелінами.



Рис. 3.7. **Формування вусів в регенерантів на середовищі із ГК 4+7 (препарат Gibb plus)** Фото Мацкевич Ю.В.

Детермінація морфогенної активності в тому числі й інтенсифікація утворення адвентивних бруньок. Це на нашу думку сприяє перерозподілу асимілянтів. Однак швидкість метаболізму і накопичення метаболітів є величини малодинамічними [6, 17]. Тому, якщо за першого додавання зростала кількість бруньок і відповідно коефіцієнт розмноження, то при наступних поділах, і зокрема п'ятому пасажі варіанти із гіберелінами поступалися безгібереліновому контролю.

3.4. Застосування різних хелатуючих агентів Fe

Досліджено вплив на онтогенез також хелатуючих агентів на прикладі хелатів іонів заліза. Встановили, що заміна класичного в прописах Fe + EDTA (Динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (інші назви: комплексон-III, трилон Б, хелатон III) на добриво Ferrilen 4.8 Orto-Orto (хелатуючий агент EDDHA) в такій кількості, щоб вміст Fe у живильному середовищі був еквівалентним контролю [26, 31].

Встановили, що за беззмінного культивування, як на контрольному варіанті так із добривом відбувається на п'ятому та наступних пасажах збільшення кількості гіпергідратованих регенерантів (EDTA) або з ознаками хлорозу (EDDHA). Тому в умовах лабораторії проводиться чергування середовищ з різними хелатуючими агентами іонів Fe.

3.5. Розвиток рослин *in vitro* на етапі мультиплікації на різних за вмістом мінеральної частини середовищах

Поряд із оздоровленням та збереженням у асептичних умовах *in vitro* мікроклональне розмноження застосовують завдяки незрівнянним із іншими методами темпами розмноження, тобто мультиплікацією. Швидкість мультиплікації визначається насамперед двома такими показниками: коефіцієнт розмноження, тобто на скільки експлантів можливий поділ материнської рослини; періодом між живцюваннями, тобто наскільки часто можна робити поділ маточних рослин.

В наших дослідженнях досліджено детермінанти вказаних технологічних вище особливостей суниці садової на етапі мультиплікації *in vitro* (рис. 3.8). Це трофічні та фітогормональні детермінанти. Різна трофічна детермінація відмічалася на трьох варіантах живильних середовищ, що відрізнялися за кількістю та співвідношенням мінеральних солей.

Також встановили детермінацію коефіцієнта розмноження та періоди між живцюваннями (пасажами) речовинами із гормональною активністю, зокрема з цитокініною.

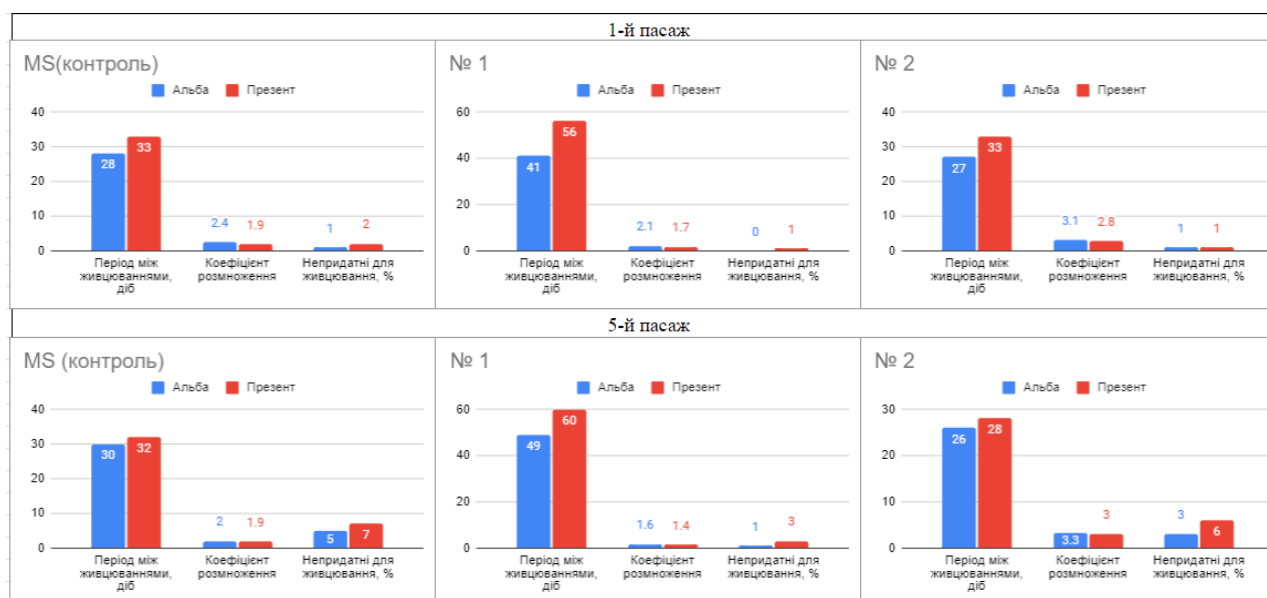


Рис. 3.8. Особливості морфогенезу первинних експлантів на різних живильних середовищах, % (БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденин 1,0, ІМК 0,1)

Рослини за швидкістю росту, тобто періодами між живцюваннями на середовищах MS і №2 не відрізнялися. Стану придатності до поділів (визначали за розмірами бруньок в пазухах бруньок і довжиною міжвузль) на цих варіантах середовищ рослини досягали по сорту Альба на 27-28 день на 33 день по сорту Презент.

За цей період у маточних рослин формувалися у розетці бруньки, донори живців після цього значно не збільшувалися в розмірах. Регенеранти майбутні маточні рослини на середовищі № 1 повільніше росли, мали порівняно менші розміри. У середньому період між повторними живцюваннями становив 41 день в сорту Альба та 56 днів в сорту Презент.

Як встановлено іншими дослідниками трофічні детермінанти мають ефект накопичення [4, 5, 6, 16, 17, 26, 28, 41]. Така ж тенденція встановлена й в нашій роботі. Після п'яти послідовних живцювань методом накладання різниця між середовищами за періодом повторного живцювання збільшилася. На контролі цей показник становив 30 днів в регенерантів сорту Альба та 32 дні в регенерантів сорту Презент, а за культивування на середовищі № 2 відповідно 26 і 28 діб.

Тобто за п'яти послідовних живцювань тривалість періоду між послідовними пасажам (переживцюваннями) скоротилася в маточних рослин сорту Альба із 27 до 26 днів та із 33 до днів в рослин сорту Презент. Водночас на середовищі № 1, що мало в дослідженні найменшу концентрацію мінеральних елементів живлення період між пасажам збільшився з 41 до 49 днів по сорту Альба та із 56 до 60 днів по сорту Презент.

Поряд з часом, який триває між живцюваннями важливим показником для швидкості мультиплікації є на скільки повноцінних експлантів (живців) можливо розділити маточну рослину. Варіант із середовищем № 2 відрізнявся серед порівнюваних найбільшим коефіцієнтом розмноження як по сортах так і по першому і п'ятому пасажах. В маточних рослин сорту Альба було за першого пасажу 3,1 повноцінних експлантів, а за п'ятого 3,4 при 2,4 і 2,0 відповідно на контрольному варіанті (MS). Маточні рослини сорту Презент на варіанті із середовищем № 2 відповідно за першого пасажу (живцювання) були донорами 2,8 експлантів і 3,0 експлантів за п'ятого пасажу при 1,9 і 1,9 на контролі.

При порівнянні трьох варіантів живильних середовищ найменший коефіцієнт розмноження був на варіанті із живильним середовищем № 1. На ньому в маточних рослин можливо було вичленити по сорту Альба 2,1 та 1,7 по сорту Презент повноцінних живцевих експлантів. На п'яте живцювання цей показник зменшився по сорту Альба до 1,6 і по сорту Презент до 1,4.

Окрім основних показників, які впливають на швидкість мультиплікації (коефіцієнт розмноження та період між живцюваннями) актуальним є відсоток браку, тобто маточних рослин, які не придатні для вичлення з них живцевих експлантів. Найбільш поширеним браком є рослини із гіпергідратованими тканинами, некротичним відмиранням верхівки та механічними пошкодженнями при роботі оператора. Перші два залежали в наших дослідженнях від живильного середовища та фітогормональних детермінант.

Як вказувалося в попередніх розділах середовище № 1 було більш ефективним на першому етапі МКР, тобто отриманні асептичної культури під час адаптації рослинних об'єктів до асептичних умов. А для етапу мультиплікації

досліджуваних сортів кращим було середовище № 2. Варіант із середовищем MS займав проміжне положення.

3.6. Забезпечення сталої швидкості мультиплікації чергуванням живильних середовищ

Онтогенез регенерантів (ріст, розвиток) відбувається ізольовано в культуральній ємності де життєвий цикл рослинного організму знаходиться в тісному взаємозв'язку із живильним середовищем без можливості трафіку трофічних елементів на віддалі від рослини, як це можливо у звичайних польових агрофітоценозах. Так само і рослинний об'єкт з часом змінює склад поживного середовища (щось поглинається, а щось виділяється). Тому, як дефіцит так і надлишок трофічних компонентів значно позначається на життєдіяльності організму [6, 42, 44]. Це є причиною порушення законів живлення і живильне середовище окрім містилися елементів живлення може впливати фітотоксично [46, 53]. Фітотоксичний ефект може за перших пасажів не проявлятися але накопичуватися [4]. Тому розробляються схеми живлення рослин *in vitro* із чергуванням “основного” та “розвантажувального” середовищ [6].

Нами окрім інших факторів впливу на коефіцієнт розмноження порівняно цей показник за різних схем чергування середовищ (рис. 3.9.):

- контроль, беззмінне вирощування на середовищі № 2 (№2 - №2 - №2 - №2.....№2);
- №2 і MS, тобто: основне №2, розвантажувальне MS (№2 - №2 - №2 - №2 - MS - №2 - №2 - №2 - №2 - MS - №2.....);
- №2 і №1, тобто: основне №2, розвантажувальне №1 (№2 - №2 - №2 - №2 - №1 - №2 - №2 - №2 - №2 - №1 - №2.....).

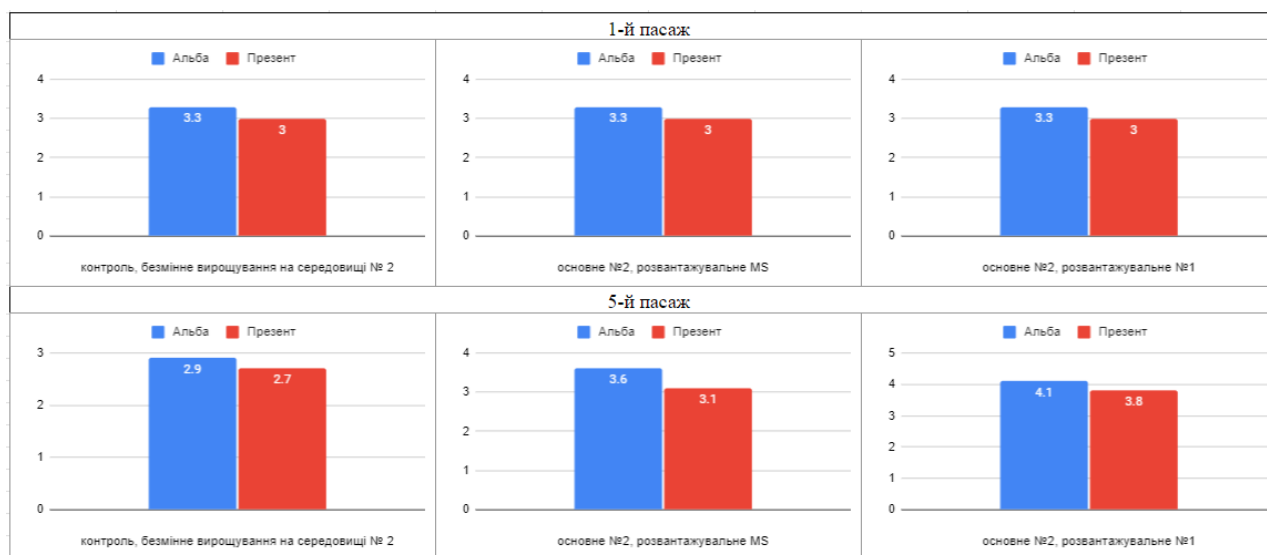


Рис. 3.9. Коефіцієнт розмноження за різних схем чергування живильних середовищ, % (БАП 0,2 Кінетин 1,0 Аденін 1,0, ІМК 0,1)

Таким чином, кількісна зміна мінеральних компонентів живлення, тобто зміна співвідношення мінеральних солей забезпечує сталий процес тривалої мультиплікації суниці садової.

3.7. Індукція ризогенезу

Стимулювання, детермінація формування розвинутої кореневої системи основне технологічне завдання третього етапу мікроклонального розмноження і цей процес залежить від дії декількох груп чинників. Насамперед, це трофічні детермінанти (кількість і співвідношення мінеральних компонентів) та речовини із фітогормональною активністю [5, 6].

Наприклад, відповідно правила Скуга-Мілера гормонами (ауксинами та цитокінінами) в різних співвідношеннях можливо детермінувати в експлантів один і чотирьох можливих шляхів онтогенезу: кущення; калюсогенез; ембріогенез; ризогенез.

На етапі мультиплікації відбувається активне пробудження бічних бруньок (кущення). Це відбувається за кількісного переважання в живильному середовищі цитокінінів над ауксинами. В цьому випадку зростає коефіцієнт

розмноження. Однак тривале таке вирощування може призводити до втрати здатності до ризогенезу.

Власне для формування коренів необхідна в живильному середовищі порівняно невелика кількість цитокінінів (0,1-0,5 мг/л) та підвищена кількість аукусинів (1,0-2,5 мг/л). Зміна співвідношення фітогормонів призводить до переформатування шляхів онтогенезу, насамперед морфогенетичних змін. Однак із-за здатності рослин відкладати гормони “про запас” перехід від однієї індукованої гормонами генетичної програми до іншої протягом одного пасажу не завжди відбувається повноцінно [5, 46]. Тобто накопичені на етапі мультиплікації гормони материнською рослиною впливають на коренеутворення в потомства [6, 46, 56]. Найчастіше, це надлишок речовин із цитокініноювою активністю [44].

Культивуючи донори експлантів (вихідні материнські рослини) на середовищах з різними комбінаціями речовин з цитокініноювою та процитокініноювою активністю (аденін є вихідною речовиною для синтезу рослиною ендогенних цитокінінів) встановили неоднакову їх післядію на ризогенез регенерованого потомства (рис. 3.10).

Серед порівнюваних варіантів культивування материнських рослин ризогенез в потомства краще відбувався при вирощуванні перших на комбінації трьох речовин в менших концентраціях: бензиламінопурин 0,2 мг/л, кінетин 0,3 мг/л та аденін 0,5 мг/л. Це пояснюється на нашу думку тим, що різні форми цитокінінів виконують не однакові функції. Це співпадає з роботами О.І. Терека та колег [44, 45, 51, 62] Також, за їх порівняно менших концентрацій із варіантом “БАП 1,0 мг/л” можлива менша фітотоксичність. Коренеутворення відмічено у 94 % регенерантів сорту Альба 89 % регенерантів в сорту Презент при 85 та 61 % на контролі відповідно по вказаних сортах. На варіанті із лише БАПом але у зменшеній кількості (0,2 мг/л) також виявлено вищі показники утворення коренів.

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.

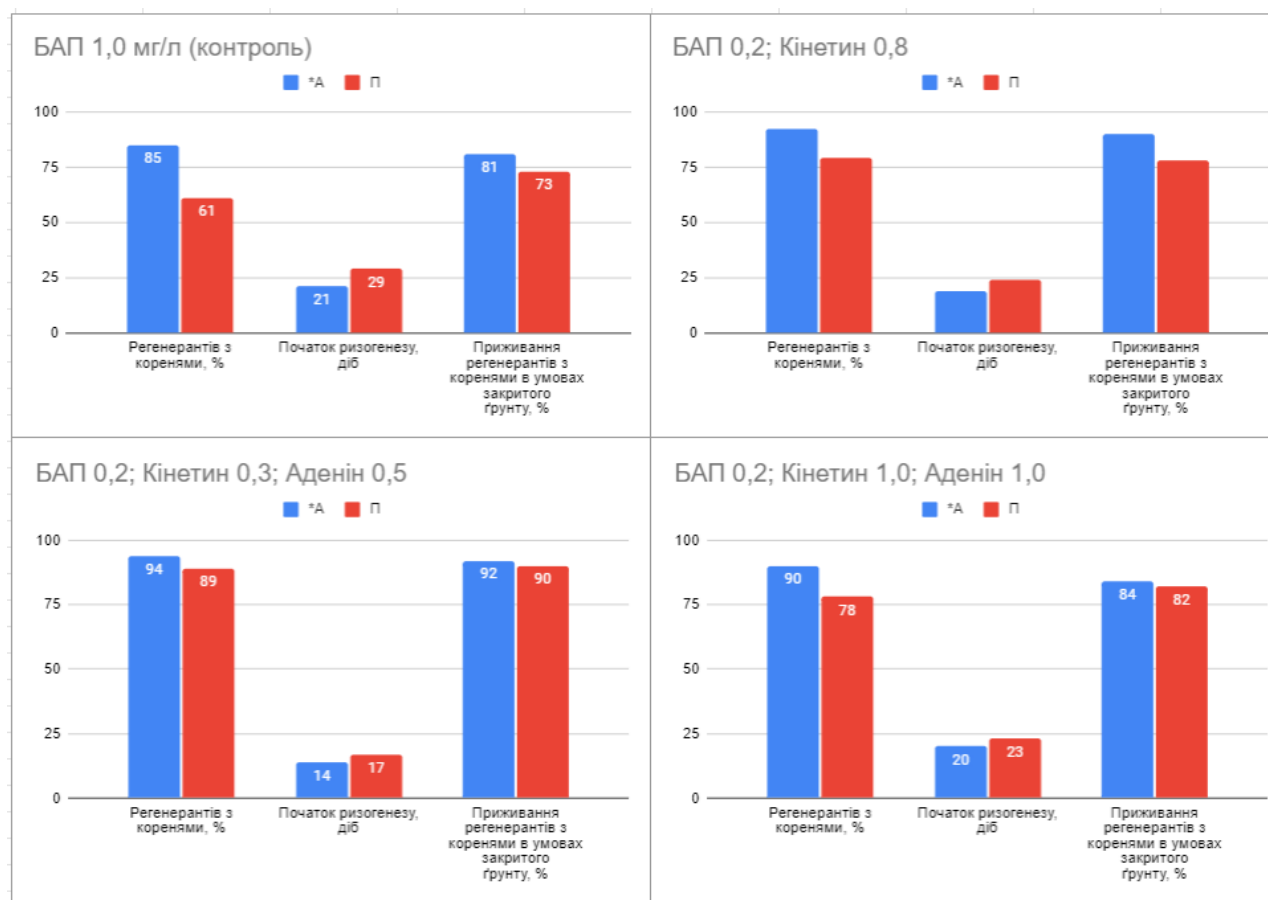


Рис. 3.10. Коренеутворення регенерантів залежно від комбінації речовин з цитокініноюю активність при вирощуванні материнських рослин, *Скороченням «А» відповідає сорт Альба, «П» – сорт Презент.

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.

3.8.Фотоавтотрофний метод мікроклонального розмноження: мультиплікація і постасептична адаптація одночасно

Побудова тіла рослини відбувається із залученням “будівельного матеріалу” та енергії, які утворюються при метаболізації первинних метаболітів [6]. Організми із автотрофним живленням використовуючи світлову енергію та мінеральні речовини (вода і вуглекислий газ) самі створюють найбільш поширений первинний метаболіт глюкози. Найчастіше першим її перетворенням може бути утворення дисахариду сахарози. Саме екзогенна сахароза найбільш поширена за асептичного вирощування рослин [5].

Використання екзогенної сахарози (тобто доданої зовні, в штучне живильне середовище) завдає ускладнення при розмноженні *in vitro*:

- обов’язковими мають бути заходи дотримання максимальної стерильності у виробничому процесі;
- адаптація на етапах: *in vivo* - *in vitro* - *ex vitro* - *in vivo*.

Альтернативою і/або доповненням класичному мікроклональному розмноженні є група фотоавтотрофних методів одночасного розмноження і адаптації.

Суть цих методів полягає в інтенсифікації синтезу організмом ендогенної сахарози, яка виступає будівельним матеріалом і джерелом енергії. В цьому випадку відпадає потреба в додаванні екзогенних вуглеводів (сахарози, глюкози) та дотримання умов надзвичайної асептики.

Біореактор в наших дослідженнях становив вологу камеру (контроль) але удосконалену в наступному згідно із [4, 50, 59]:

- збагачення повітря та контроль на вміст CO₂;
- збільшення інтенсивності освітлення до 11 000 люкс.

Збільшення надходження первинних метаболітів прискорює утворення клітин, тканин, органів. Нами порівняно швидкість утворення та довжину коренів *ex vitro* у звичайній вологій камері (контроль) та фотоавтотрофному біореакторі (див. розділ “методика...”). Встановили (таб.3.1.), що приріст нових коренів в довжину на контролі становив на 14 день спостережень становив в

сорту Альба 56,6 та в сорту Презент 48,7 мм при 4,4 та 2,1 в цих сортів на контролі відповідно.

Однією із основних якісних ознак успішної постасептичної адаптації це є формування (галуження) коренів другого та наступних порядків та утворення кореневих волосків. На контролі таке галуження відмічено на завершення другого тижня культивування (Альба на 12,2 день; Презент на 13,9 день). Водночас в біореакторі другий порядок коренів закладався на 3-4 день. Візуально також на цьому варіанті відмічено значне збільшення кількості кореневих волосків, однак із-за не можливості зробити детальні цитологічні дослідження цей облік не проводили.

Збільшення “компонентів фотоасиміляційного процесу” (CO_2 + енергія) вплинуло не лише зростання утворення продуктів фотосинтезу, що відображалось на збільшенні маси рослини в цілому, ризосфери, а і стимулювало збільшенню фотоасимілюючої поверхні. Якщо в сорту Альба на контролі маса листя становила 0,71 г то у біореакторі вона зростала до 3,9 г. Подібна закономірність відмічена й по сорту Презент.

Таблиця 3.1. Вплив технології постасептичної адаптації на розвиток суниці садової ex vitro на 14 день спостережень

Спосіб адаптації	Приріст довжини коренів, мм		Початок галуження коренів, днів		Маса фотоасимілюючого апарату, г	
	Альба	Презент	Альба	Презент	Альба	Презент
Волога камера (контроль)	4,4	2,1	12,02	13,9	0,71	0,65
Біореактор	56,6	48,7	3,4	3,9	3,9	3,6

Отже, застосування фотоавтотрофних біореакторів в розмноженні суниці садової є перспективною технологією в розсадництві цієї культури.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

За результатами отриманих експериментальних даних встановлено детермінанти онтогенезу суниці садової та розроблено рекомендації по удосконаленню технологічного процесу промислового мікроклонального розмноження в розсадництві цієї культури.

1. Брунькові експланти, порівняно із меристемними швидше регенерують рослини регенеранти. Проте їх застосування при введенні можливе з донорів, які є за результатами діагностики вільними від патогенів.

2. Вирощування донорів первинних експлантів в депозитарію підвищує приживлюваність рослинних об'єктів та ефективність деконтамінації.

3. Серед порівнюваних за приживлюваністю первинних експлантів кращим є середовище №1.

4. За показниками швидкості мультиплікації та ефективності коренеутворення серед порівнюваних середовищ є середовище №2.

5. Культивування донорів експлантів за останнього живцювання на етапі мультиплікації на середовищі із зменшеним вмістом цитокінінів підвищує ефективність коренеутворення в регенерованого потомства.

6. Ефективність ризогенезу зростає за додавання комбінації синтетичних аналогів ауксинів в порівнянні з їх застосуванням окремо.

7. При порівнянні середовищ із вмістом сахарози від 1 до 6 % кращим для коренеутворення є середовище із 4% (40 г/л).

Для впровадження у виробничий процес пропонуються наступні удосконалення протоколу технології мікроклонального розмноження суниці садової.

На підготовчому ("0 етапі") проводити діагностику донорів первинних експлантів та їх вирощування в умовах депозитарію.

Для покращення ефективності процесу регенерації на першому етапі мікроклонального розмноження первинних експлантів суниці садової використовувати середовище №1.

В якості деконтамінанта використовувати препарат Бланідас 300.

На етапі мультиплікації застосовують середовище №2 із додаванням БАПу 0,2 мг/л та кінетину 0,8 мг/л.

Для стабільного підтримання показників мультиплікації проводять чергування живильних середовищ за схемою “№2-№2-№2-№2-MS-№2-№2-№2-№2-MS-№2.....” На останньому живцюванні етапу мультиплікації комбінація речовин із цитокініноювою активністю наступна: аденін 0,5 мг/л, БАП 0,2 мг/л, кінетин 0,3 мг/л.

Для зняття ефекту накопичення фітоксичності цитокінінів рекомендується та підвищення інтенсивності мультиплікації раз на п'ять живцювання додавати в середовище препарат Gibb plus (ГК₄₊₇).

На етапі індукції ризогенезу кількість цитокінінів зменшують та додають ІМК 0,2 мг/л + ІОК 1,0 мг/л та додають 40 г/л сахарози.

Для постасептичної адаптації застосовувати біореактор з технологією фото автотрофного мікроклонального розмноження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мацкевич Ю.В., Філіпова Л.М. Особливості розсадництва в органічному ягідництві на прикладі вирощування суниці садової у ТМ Тевітта // «Інноваційні технології в агрономії, землеустрої, лісовому та садово-парковому господарстві»: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції магістрантів і молодих дослідників, 16 листопада 2023 року. – Біла Церква: БНАУ. С. 33-35.
2. Павлюк В. Суниця цілий рік – сорти і способи вирощування / Василь Павлюк. – Київ: ТОВ «Рема-Принт»,. 2013. – 72 с. 6.
3. А. Довганюк Суниця садова: що в тренді? Журнал «Ягідник» №5 (35) 2023 <http://www.jagodnik.info/sunytsya-sadova-shho-v-trendi/>
4. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Кравченко Н. В., Мацкевич Ю. В. Біотехнологічні методи в екологізації технологій вирощування суниці тм Тевітта // Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та фітомеліорації: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 21 вересня 2023 р.). – Біла Церква: БНАУ, 2023. с. 74-76
5. Мікроклональне розмноження рослин: навчально-методичний посібник / Мацкевич В.В., Кравченко Н.В., Подгасцький А.А. та ін. – Суми, 2023 – 215 с.
6. Мацкевич В.В. Фізіологія та біотехнологія рослин : підручник / Мацкевич В. В. Філіпова Л. М., Олешко О. Г. - Біла Церква : БНАУ, 2022. - 427 с.
7. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/701/sunici>
8. Павлова І. Суниця альпійська: з чого почати? <http://www.jagodnik.info/sunytsya-alpijska-z-chogo-pochaty/>
9. <https://nk-elit.com.ua/uk/node/1635>
10. <https://leto.ua/ua/article/klubnika-ot-semechka-do-urojaya-chast-1-stratifikatsiya>
11. <https://dpssc.gov.ua/fitosanitariia-kontrol-u-sferi-nasinnnytstva-ta-rozsadnytstva/aktualna-informatsiia/2326/rozmnozhenia-sadovoi-polunytsi-vusamy.ht>

12. <https://kurkul.com/spetsproekty/1424-sadimo-sunitsyu-frigo-kasetna-rozsada-chi-z-nasinnya--ekspertna-dumka>
13. http://www.jagodnik.info/wp-content/uploads/2022/04/Jagodnik_5_25-1_26_2022_VEB.pdf
14. Розсада суниці з маточників *in vitro*. URL: <https://farmer.ua/centr-posadkovogo-materialu/rozsada-sunici-z-matochnikiv-in-vitro/>
15. Ідентифікація збудників вірусних та інших хвороб плодових, ягідних, горіхоплідних культур і хмелю. URL: <https://labprice.ua/wp-content/uploads/2021/03/Patogeni-poslugi.pdf>
16. 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.
17. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Олешко О.Г. Екологічна патофізіологія рослин: навчальний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2024. 142 с.
18. Бойко А.Л. Основи екології та біофізики вірусів. К.: Фітосоціоцентр, 2003. - 164 с.
19. 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., NavasCortes 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.
20. Identyfikatsiia zbudnykiv 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>
21. Gardener. Fitopatohenni mikoplazmy – zbudnyky khvorob roslin [Phytopathogenic mycoplasmas are pathogens of plant diseases]. 2022. Available at: <https://fruit-grower.info/2022/12/13/fitopatohenni-mikoplazmi-zbudniki-hvorob-roslin/>

22. Оксана Бублик Фітоплазма може стати перешкодою для промислового вирощування горіхоплідних культур. AgroTimes <https://agrotimes.ua/ovochi-sad/fitoplazma-mozhe-stati-pereshkodoyu-dlya-promislovogo-viroshchuvannya-gorihoplidnih-kultur/>
23. 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.
24. 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.
25. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
26. Кушнір Г. П. Стан і перспективи клонального мікророзмноження рослин в Україні. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть / Г.П. Кушнір, Т.І., 2001. — 484–500 с.
27. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин: підручник / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах – Київ: Поліграфконсалдинг, 2003 - 520 с.
28. Подгаєцький А. А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія / А. А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А. А.Подгаєцький - Біла Церква: БНАУ, 2018. — 209 с.
29. Манушкіна Т.М. , Коваленко О.А., Хомут В.П., Коломієць Н.П. Клональне мікророзмноження павловнії *in vitro*// Аграрні інновації: № 17 (2023) с 173-177. <http://agrarian-innovations.izpr.ks.ua/index.php/agrarian/article/view/376>. DOI <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2023.17.24>
30. <http://fruit.org.ua/index.php/publikacii/151-sertifikatsijni-skhemi-viroshchuvannya-sadivnogo-materialu-sunitsi>
31. https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list
32. <https://farmer.ua/centr-posadkovogo-materialu/rozsada-sunici-z-matochnikiv-in-vitro/>

33. <https://www.profihort.com/2019/03/mikroklonalne-rozmnozhennya-yagidnix-i-plodovix-yakist-ta-innovaci%D1%97-narodzheni-u-laboratori%D1%97/>
34. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Синельник Г.О. Біометод захисту рослин як засіб екологізації технології *in vitro* // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біорізноманіття: теорія, практика та методичні аспекти вивчення у закладах освіти» (присвячено 110 річниці заснування Полтавського національного педагогічного університету імені В. Г. Короленка) 16 квітня 2024 р. с. 282-284
35. dict.ippi.org.ua/index.php?title=ДЕРЖАВНИЙ_РЕЄСТР_ВИРОБНИКІВ_НАСІННЯ_I_САДИВНОГО_МАТЕРІАЛУ&action=edit
36. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0595-03#Text>
37. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2010. 135 с.
38. Подгаєцький А. А., Кабанець В. М., Кравченко Н. В., Подгаєцький А. Ан., Мацкевич В. В., Бордун Р. М. Розмноження та оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі: навчальний посібник. Суми: ПБКФ Видавництво «МакДен», 2019. 164 с.
39. Подгаєцький А. А. Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів [Електронний ресурс] / А. А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А. Т. Врублевський // Вісник Сумського національного аграрного університету : науковий журнал. - Сер. "Агрономія і біологія" / Сумський національний аграрний університет. - Суми : СНАУ, 2016. - Вип. 9 (32). - С. 159-163.
40. Філіпова Л. Утворення регенерантами фенолподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослини / Л. Філіпова, В. Мацкевич // Вісник Львівського національного аграрного університету. Сер: Агрономія. – Львів : ЛНАУ, 2013.– № 17 (2). – С. 232-238
41. Podhaietskyi, A. A., et al. "Trofichni ta hormonalni determinanty ontogenezu *Actinidia chinensis* var, *deliciosa* (a. Chev.) *in vitro* na etapi multiplykatsii [Trophic

and hormonal determinants of the ontogenesis of *Actinidiachinensis* var, *deliciosa* (a. Chev.) *in vitro* at the stage of multiplication]." East European Scientific Journal 10.62 (2020): 17-24.

42. Мельничук М.Д. Біотехнологія в агросфері. Навч. посіб. / М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко. – Київ : НУБіП України, 2014. – 247 с.

43. Практикум із сільськогосподарської метеорології і кліматології / І.Д. Примак, І.П. Гамалій, Т.В. Колесник, Г.І. Демидась, О.І. Примак; За ред. І.Д. Примака. - В.: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2013. - 284 с.

44. Терек О. І. Ріст і розвиток рослин: навч. посібник / О. І. Терек, О. І. Пацула. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 328 с.

45. Біохімія рослин. Кобилецька М.С. Терек О.І. Видавництво: Львів; Рік видання: 2017; Сторінок: 270

46. Трофічні та фітогормональні детермінанти онтогенезу *in vitro* / О.В. Мацкевич, І.В. Кімейчук, В.В. Мацкевич, А.А. Павліченко // Вісник Сумського національного аграрного університету. Сер. Агрономія і біологія. – Вип. 2 (48). –2022. – С. 111–123.

47. Filipova L. Improvement of the elements of technology of micropropagation *Cornus mas* L. / L. Filipova, V. Matskevych // Агробіологія : зб-к наук. праць. – Біла Церква : БНАУ, 2017.– №2(135). – С. 11-16.

48. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Стадник А.П. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Hosta* // Агроекологічний журнал. 2012. Вип. 4. С. 81-88.

49. Стадник А.П., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Пасічник Т.В. Деконтамінація та первинне культивування експлантів *Agapanthus* sp. Агроекологічний журнал. 2015. № 2. С. 106-111.

50. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Мацкевич Ю. В. Системи фотоавтотрофного мікроклонального розмноження як моделі фітомікроклімату // Міжнародної науково-практичної конференції «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту» Біла Церква, 26 жовтня 2023 року с. 25-27

51. Денчіля-Сакаль, Г. М. Мікроклональне розмноження рослин *Trifolium pratense* L. [Текст] / Г. М. Денчіля-Сакаль, В. І. Ніколайчук, В. О. Терек // Науковий вісник Ужгородського університету: Серія: Біологія / редкол.: В.І. Ніколайчук (гол. ред.), В.Г. Рошко, В.О. Чумак та ін. – Ужгород: Вид-во УжНУ "Говерла", 2010. – Вип.28. - С. 90-93. - Бібліогр.: с. 93.
52. Murashige T. and Skoog F., *Physiol. Plant*, 15, 473 (1962).
53. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. – Біла Церква : БНАУ, 2018. – 209 с.
54. Павловнія: науково-практичний посібник / О.В. Мацкевич, Л.М. Філіпова, В.В. Мацкевич, В.В. Андрієвський. - Біла Церква: БНАУ, 2019. - 80 с.
55. Подгаєцький А. А., Кабанець В. М., Кравченко Н. В., Подгаєцький А.Ан., Мацкевич В. В., Бордун Р. М. Розмноження та оздоровлення насіннєвогоматеріалу картоплі: навчальний посібник. Суми: ПВКФ Видавництво «МакДен», 2019. 164с.
56. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. – Київ: Наш формат, 2017. – 200 с.
57. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокініни в онтогенезі й адаптації злаків // *Фізіологія рослин і генетика*, 2020, 52 (1), с. 3-30.
58. Войтенко Л. В. Фітогормони в онтогенезі судинних спорових рослин // *Вісник Харківського національного аграрного університету серія Біологія*, 2012, вип. 2 (26), с. 41-45
59. V. Matskevych, V. Yukhnovskyi, L. Filipova, N. Kravchenko, O. Tupchii, Y. Matskevych Photoautotrophic microclonal propagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) variety Delniwa *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*, 2024, Vol. 66 (3), 183–194 <https://www.ibles.pl/wp-content/uploads/2024/09/10.2478-ffp-2024-0014.pdf>
60. <https://www.pro-of.com.ua/svizhij-poglyad-u-yagidnictvi-novij-pidxid-do-viroshhuvannya-yagid/>
61. <https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin>

62. Кобилецька М.С., Романюк Н.Д., Пацула О.І., Терек О.І., Баранов В.І., Мамчур О.В. Фізіологія та біохімія рослин: підручник. Т. 1 – Львів: ЛНУ ім. І. Франка. – 2023. – 372 с.

АБТОБНАУ