

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СУНИЦІ САДОВОЇ (*FRAGARIA ANANASSA DUCH.*) СОРТУ АЛІНА В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

О. В. СУБІН, аспірант*

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

Вивчали можливість мікроклонального розмноження суниці садової (*Fragaria Ananassa Duch.*) і вплив регуляторів росту на регенераційну здатність мікророзеток в умовах *in vitro*. Встановлено, що найбільший коефіцієнт розмноження для клонів С3 і С4 сорту Аліна склав 4,9 та 7,7 відповідно за вирощування на середовищі MS доповненого 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелової кислоти.

Fragaria Ananassa Duch*, мікроклональне розмноження, *in vitro

Суниця садова – традиційна ягідна культура для споживачів, яку культивують більш, ніж у 60 країнах світу на загальній площі 254,5 тис. га [6]. Суниця є основною ягідною культурою завдяки значним смаковим якостям, ранньому досягненню, високій скороплідності, здатності її поживних речовин легко засвоюватись і представляє велику цінність, як продукт дієтичного харчування [3, 10]. Суниця садова дуже пластична культура. За високого рівня агротехніки її можна вирощувати в різних природно-кліматичних умовах, а в закритому ґрунті з'являється можливість позасезонного отримання товарного урожаю [9].

Специфіка сучасного стану ягідництва в Україні полягає в тому, що більшість площ під суницею знаходиться на присадибних ділянках, малих фермерських господарствах, а також у розплідниках, які досить складно контролювати на предмет фітосанітарної безпеки. Масова неконтрольована торгівля посадковим матеріалом сприяє розширенню видового складу патогенів та шкідників. Це призводить також до того, що розповсюдження вірусних захворювань набуває комплексного характеру і в майбутньому, може набути загрозливих масштабів. Одним із шляхів вирішення проблеми оздоровлення посадкового матеріалу від фітопатогенів є метод мікроклонального розмноження в умовах *in vitro*. Крім того, даний метод дозволяє значно прискорити процес

*Науковий керівник - доктор біологічних наук, проф., академік НААН
України Мельничук М. Д.

розмноження та отримати якісний, генетично однорідний посадковий матеріал [6].

Метод мікроклонального розмноження суниці садової використовується з початку 60-х років [2, 5]. Для вирощування ізолятів суниці садової різними авторами були використані рідкі та агаризовані середовища Мурасіге-Скуга з різними модифікаціями. Проте, дані різних авторів не завжди узгоджуються між собою. Суперечливий характер носять і результати досліджень, отримані під час вивчення впливу різноманітних стимуляторів росту на морфогенез ізолятів суниці садової.

Мета дослідження – вивчення особливостей морфогенезу ізольованих мікророзеток суниці садової в залежності від складу живильного середовища.

Матеріали і методи дослідження. В якості вихідного матеріалу використовували рослини суниці садової (*Fragaria Ananassa Duch.*) сорту Аліна клонів С3 та С4, а саме частини активно ростучих сланких пагонів, зокрема молоді розетки. Стерилізацію експлантатів проводили в 0,1% розчині сулеми (HgCl_2). Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [5].

Експлантати поміщали на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) [1]. В дослідженнях використано 6 варіантів з додаванням різних комбінацій і концентрацій ауксинів, цитокінінів та гіберелінів : варіант №1 – 0,5 мг/л БАП (*6-Бензиламінопурин*), варіант №2 – 1,0 мг/л БАП, варіант №3 – 1,5 мг/л БАП, варіант №4 – 0,5 мг/л БАП та 0,75 мг/л ІМК (*β -індолілмасляна кислота*), варіант №5 – 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелова кислота, варіант №6 – 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІМК.

Культивування проводили у термальній кімнаті за температури + 25-26°C, відносній вологості повітря 70-75%, освітленості 2,0 - 3,0 клк та за 14-годинного фотоперіоду [7, 8].

Для індукції ризогенезу використовували три варіанти живильних середовищ: 1 варіант – безгормональне живильне середовище MS, 2 варіант – $\frac{1}{2}$ MS з додаванням активованого вугілля, 3 варіант – $\frac{1}{2}$ MS з додаванням 0,5 мг/л ІМК.

Для адаптації рослин-регенерантів до умов *in vivo* використовували торфвий субстрат і субстрат з використанням торфу, перліту та піску у співвідношенні 3:1:1. В обох випадках ефективність адаптації склала понад 90%.

Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакету аналізу MS Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Робота проводилась в декілька етапів. Першим етапом є стерилізація експлантатів, яка слугує важливою передумовою проведення успішного мікроклонального розмноження. В якості стерилізуючого

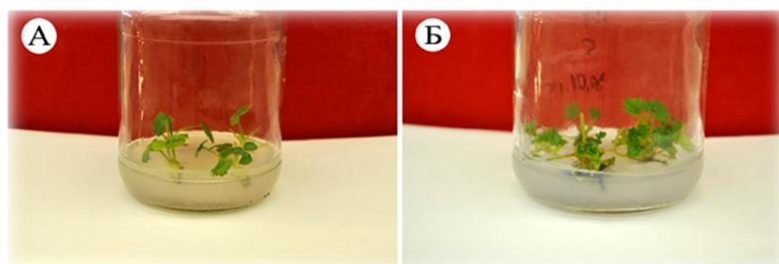
агента використовували 0,1 %-ий розчин сулеми. Стерилізацію проводили поетапно: спочатку експлантати промивали 20 хв. у мильному розчині, постійно перемішуючи, потім у стерильних умовах експлантати занурювали на 30 с в 70 % етиловий спирт з подальшим перенесенням на 10 хв. в 0,1 % HgCl₂ та відмиванням в трьох порціях дистильованої води по 10 хв. у кожній.

З метою розробки методики власне мікроклонального розмноження суниці садової сорту Аліна було досліджено вплив різних регуляторів росту на процеси росту експлантатів в культурі *in vitro*. Нами були використані 6 варіантів модифікованого середовища MS з різними концентраціями та композиціями ауксинів, цитокінінів та гіберелінів (табл. 1).

1. Коефіцієнт розмноження мікророзеток суниці садової з використанням різної концентрації фітогормонів в умовах *in vitro*

№ варіанту	Аліна клон С3						Аліна клон С4					
	0,5 БАП	1,0 БА П	1,5 БА П	0,5 БА П 0,75 ІМК	1,0 БАП 1,0 ІМК, 0,1 гіб	1,0 БА П 0,1 ІМК	0,5 БА П	1,0 БА П	1,5 БА П	0,5 БА П 0,75 ІМК	1,0 БАП 1,0 ІМК, 0,1 гіб	1,0 БАП 0,1 ІМК
1	2	3	4	2	5	5	5	4	5	5	7	8
2	3	3	4	2	5	4	4	7	5	2	8	6
3	2	2	2	2	5	4	5	5	5	2	10	8
4	5	2	3	5	8	5	2	4	7	3	5	5
5	4	4	3	3	5	5	9	2	4	5	4	8
6	4	3	3	4	5	5	8	6	6	4	8	7
7	2	3	2	4	4	3	6	5	3	2	9	9
8	2	2	2	5	5	5	7	6	3	2	7	8
9	5	4	5	2	6	5	6	2	5	4	5	7
10	3	3	2	3	5	6	5	4	5	3	8	9
11	5	3	4	3	4	5	4	5	4	4	10	5
12	4	2	2	3	4	5	5	4	6	6	6	7
13	5	3	2	2	4	5	6	3	6	4	7	5
14	3	3	2	2	4	4	4	4	5	4	10	7
15	2	2	3	2	5	4	6	3	5	5	11	4
Σ	3,4	2,8	2,87	2,9	4,9	4,7	5,5	4,3	4,9	3,7	7,7	6,9

З представлених даних таблиці 1 можна зробити висновок, що найбільш оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження суниці садової клонів С3 та С4 є варіант №5: 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелова кислота (рис. 1).



**Рис. 1. Початковий етап морфогенезу пагонів суниці садової на середовищі MS + 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелова кислота:
А – Аліна клон С3, Б – Аліна клон С4.**

При цьому спостерігався значний ріст експлантатів і коефіцієнт розмноження складав: С3 – 4,9, С4 – 7,7. (Рис.2).



Рис. 2. Власне мікроклональне розмноження суниці садової сорту Аліна в культурі *in vitro*: А – клон С3, Б – клон С4.

Було виявлено, що зі збільшенням концентрації цитокінінів (В2: 1,0 мг/л БАП В3: 1,5 мг/л БАП) у експлантатів клону С3 значно знижувався коефіцієнт розмноження (2,8) порівняно з іншими варіантами середовищ. Слід зазначити, що розмноження рослин клону С3 відбувалося більш повільно в порівняно із клоном С4. Для експлантатів клону С4 мінімальний коефіцієнт розмноження виявився у варіанті № 4 (0,5 мг/л БАП та 0,75 мг/л ІМК) і склав 3,7.

Третім етапом нашої роботи був процес укорінення рослин-регенерантів. За Р. Г. Бутенко індукцію ризогенезу можна викликати декількома шляхами: культивування пагонів або рослин-регенерантів на середовищі з невеликою кількістю ауксинів, розведення в 2 рази мінерального складу безгормонального живильного середовища MS, обгортання нижньої частини пробірок фольгою або додавання в живильне середовище активованого вугілля, враховуючи пригнічувальну дію на процес коренеутворення високої інтенсивності

світла [4]. В наших дослідженнях для ризогенезу були використані пагони з двома-трьома трійчастими листками, які культивувалися на різних варіантах живильних середовищ (табл. 2).

2. Вплив компонентів живильного середовища на індукцію ризогенезу рослин-регенерантів суниці садової

Живильне середовище	Аліна клон С3		Аліна клон С4	
	Утворення коренів від висаджених, %	Середня довжина коренів, мм	Утворення коренів від висаджених, %	Середня довжина коренів, мм
MS	30	28 ±0,2	42	34±0,2
½ MS + активоване вугілля	90	76±0,5	98	94±0,5
½ MS + 0,5 ІМК	70	45±0,2	85	52±0,2

З представлених даних (табл. 2.) можна бачити, що за використання живильного середовища, доповненого активованим вугіллям, найбільший відсоток утворення коренів рослинами-регенерантами складав для клону С3 90 %, для клону С4 – 98 %, з довжиною коренів відповідно 76±0,5 мм та 94±0,5 мм. Дещо нижчі результати були отримані за використання середовища ½ MS + 0,5 ІМК. При цьому відсоток ризогенезу для клону С3 складав 70 %, для клону С4 – 85 %. Найнижчими показниками коренеутворення характеризувалося безгормональне середовище MS: клон С3 – 30 %, клон С4 – 42 %. За культивування на середовищі ½ MS з додаванням активованого вугілля протягом 3-4 тижнів формувалися корені та наростала вегетативна маса (рис. 3). Отримані рослини-регенеранти були придатні для подальшої адаптації.

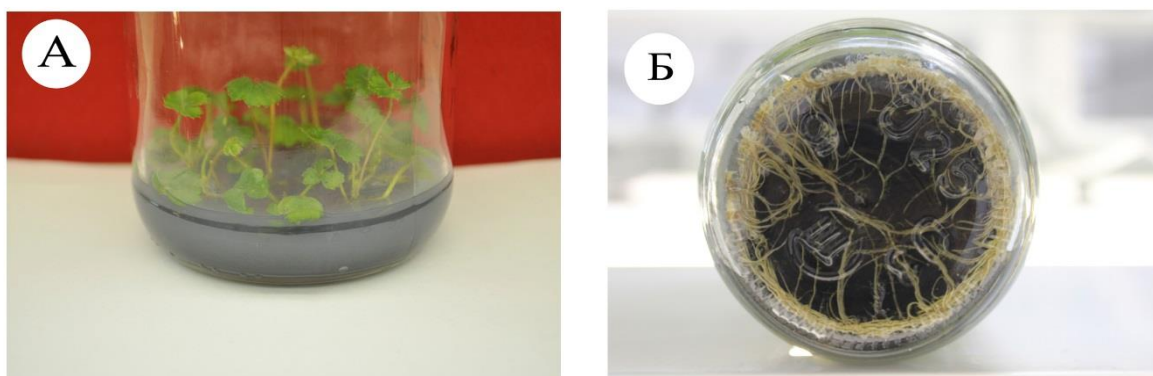


Рис. 3. Коренеутворення рослин регенерантів сорту Аліна на середовищі ½ MS + активоване вугілля: А – Клон С3, Б – Клон С4.

Важливим етапом у мікроклональному розмноженні є процес адаптації рослин-регенерантів та висадження їх в субстрат. В якості субстрату було використано торф та суміш торф:перліт:пісок у співвідношенні 3:1:1 (табл. 3.).

3. Приживлюваність рослин регенерантів суниці садової в субстратах

Субстрат	Кількість висаджених рослин, шт	Приживлюваність рослин	
		шт.	%
Торф	30	27	90±0,1
Торф:Перліт:Пісок 3:1:1	30	28	93±0,3

Для отримання якісного однорідного матеріалу проводилось відсортювання рослин-регенерантів. Проводилось вкорочення коренів до 30-40 мм для того, щоб запобігти заломленню коренів та подальшому їх загниванню. Висаджені на субстрат рослини утримували у вологій камері протягом 10-14 днів за температури 25 °С з поступовим зниженням вологості. Протягом періоду адаптації проводили профілактичну обробку фунгіцидами біологічного походження. Через 4-5 тижнів у рослин формувались 3-4 листки та мичкувата коренева система. Ефективність адаптації на обох субстратах складала понад 90 %.

Висновки. Проведено і оптимізовано методику мікроклонального розмноження суниці садової сорту Аліна клонів С3 та С4. В якості стерилізуючого агента використано 0,1%-ий розчин сулеми. Встановлено, що найбільш оптимальним середовищем є MS + 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелова кислота. Коефіцієнт розмноження – відповідно 4,9 і 7,7 клон С3 та клон С4. Найбільший відсоток ризогенезу склав 90 % - клон С3 та 94 % - клон С4 на середовищі ½ MS + активоване вугілля. Адаптація до умов *in vivo* проводилась на торф'яному субстраті та субстраті з використанням торфу: перліту:піску у співвідношенні 3:1:1, ефективність адаптації складала понад 90 %.

Список літератури

1. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum.*–1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
2. Quak F. Plant cell tissue and organ culture 33 / F. Quak // Ed. J. Reinert J. R. S. Bajaj. Berlin etc.:Springer-Verlag. –1977.– P. 598-618.
3. Samir C. Debnath, Strawberry culture *in vitro*. Applications in genetic transformation and biotechnology / Samir C. Debnath, Jaime A. Teixeira da

Silva // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. –2007. – P.1-12.

4. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБк – Пресс, 1999 – 259 с.

5. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.

6. Копылов В. И. Земляника: [Пособие] / В. И. Копылов – Симферополь: Поли ПРЕСС, 2007. – 368 с.

7. Мельничук М. Д. Біотехнологія в агросфері. / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко // Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Київ, 2014. – 247 с.

8. Мельничук М.Д Біотехнологія отримання високоякісного садивного матеріалу суниці (*FRAGARIA ANANASSA DUCH.*): науково-методичні рекомендації / А. А. Клюваденко, А. Ф. Ліханов, А. М. Силаєва, М. М. Спірочкіна – Київ: 2014. – 56 с.

9. Самойленко Н. А. Пути совершенствования промышленного возделывания земляники садовой в Северном Причерноморье : автореф. ... дис. д-ра с.-х. наук : 06.01.07 / Самойленко Николай Александрович. – М., 2003. – 23 с.

10. Яновський Ю. П. Ягідництво: [Навч. посібник] / Ю. П. Яновський, В. В. Воєводін, О. М. Лапа, Є. В. Чепернатий. – Київ, 2009. – 216 с.

*Изучали возможность микроклонального размножения земляники садовой (*Fragaria Ananassa Duch.*) и влияние регуляторов роста на регенерационные способности микророзеток в условиях *in vitro*. Установлено, что наибольший коэффициент размножения для клонов С3 и С4 сорта Алина составил 4,9 и 7,7 соответственно при выращивании на среде MS с добавлением 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ИМК, 0,1 мг/л гибберелловой кислоты.*

Fragaria Ananassa Duch, микроклональное размножение, *in vitro*

*The possibility of *in vitro* micropropagation of strawberry (*Fragaria Ananassa Duch.*) and the impact of growth regulators on the regenerative capacity of microrosettes was explored. The highest propagation coefficient have been found for the clones C3 and C4 of variety Alina with using nutrient medium MS supplemented with 1.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l IBA, 0.1 mg/l gibberellic acid was 4.9 and 7.7 respectively.*

Fragaria Ananassa Duch, microclonal propagation, *in vitro*