

СЕКЦИЯ 1. БИОТЕХНОЛОГИИ В ОРГАНИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ОЗДОРОВЛЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ САДОВЫХ КУЛЬТУР И ВИНОГРАДА

УДК 634.75:58.085

DOI 10.30679/2587-9847-2021-33-9-14

РАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Карпушина М.В., канд. с.-х. наук, Винтер М.А., канд. с.-х. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»

(Краснодар, Россия)

markarp@yandex.ru

Реферат. Производство посадочного материала земляники с использованием метода клонального микроразмножения растений является перспективным, современным и уже широко используемым в мире. В статье представлены результаты оценки потенциала микроразмножения сортов земляники садовой селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ Нелли, Кемия и сортов итальянской селекции Альба, Клери, Джоли в культуре *in vitro*. Исходным материалом для введения служили апексы с растущих розеток земляники. В ходе исследований установлены благоприятные сроки введения в культуру, подобрана оптимальная концентрация 6-Бензиламинопурина (6-БАП). Изоляция эксплантов проводилась со второй декады июня по конец августа. Высокая приживаемость отмечена у сортов Альба, Нелли, Кемия – 83,3-93,7 % при введении эксплантов в культуру *in vitro* во второй декаде августа. У сортов Джоли и Клери приживаемость составила в этот период – 65-74 %. На этапе пролиферации в питательную среду добавляли 6-БАП (0; 0,5; 1,0 и 1,5 мг/л), установлено, что для повышения эффективности микроразмножения данных сортов земляники целесообразно вводить в среду 6-БАП в количестве 1,0 мг/л. При повышении концентрации 6-БАП до 1,5 мг/л возрастает количество витрифицированных побегов. В целом, оценка потенциала размножения сортов земляники садовой в условиях *in vitro* показала, что сорт Нелли имеет наиболее высокий потенциал размножения. К третьему субкультивированию при добавлении 6-БАП (1,0 мг/л), количество побегов достигало 8,7-12,6 штук на один эксплант, у сортов Кемия, Джоли, Альба и Клери 9,2-10,6 шт. На этапе ризогенеза исследуемых сортов, добавление ауксинов в среду не потребовалось, поскольку корнеобразование у растений-регенерантов началось самостоятельно. У сорта Нелли процент корнеобразования составил 95 %, у сорта Кемия – 98 %, у сорта Альба, Клери и Джоли – 82-93 %.

Ключевые слова: земляника садовая, микроразмножение, введение в культуру *in vitro*, мультипликация, БАП

Summary. The production of strawberry planting material using the method of clonal micropropagation is promising, modern and already widely used in the world. This article presents the results of assessing the micropropagation potential of garden strawberry varieties of FSBSI NCFSCHVW breeding – Nelly, Kemiya, and Italian varieties – Alba, Clery, Jolie into *in vitro* culture. Apexes from growing rosettes of strawberries were used as the starting material for the introduction. During the research, favorable terms of introduction into *in vitro* culture were established, the optimal concentration of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) was selected. The explants were isolated in the second decade of June, July and in end of August. High survival rate was noted in the varieties such as Alba, Nelly, Kemiya – 83.3-93.7 % with the introduction of explants into *in vitro* culture in the second decade of August. In varieties such as Jolie and Clery, survival rate during this period was 65-74 %. At the stage of proliferation, 6-BAP (0; 0.5; 1.0 and 1.5 mg/l) was added to the culture medium; it was found that to increase the efficiency of micropropagation of these strawberry varieties, it is advisable to introduce 6-BAP into the medium in an amount of 1.0 mg/l. With an increase in the concentration of 6-BAP up to 1.5 mg/l the number of vitrified shoots increases. In general, the assessment of the multiplication potential of garden strawberry varieties *in vitro* showed that the Nelly variety has the highest multiplication potential. By the third subculturing, with the addition of 6-BAP (1.0 mg/l), the number of shoots reached up to 8.7-12.6 pieces per explant, in varieties Kemiya, Jolie, Alba and Clery – 9.2-10.6 pieces. At the stage of rhizogenesis of the studied varieties, the addition of auxins to the medium culture was not required, since root formation in regenerated plants began independently. The percentage of root formation in Nelly variety was 95 %, in Kemiya – 98 %, in Alba, Clery and Jolie varieties – 82-93 %.

Key words: garden strawberry, micropropagation, introduction into *in vitro* culture, multiplication, BAP

Введение. Земляника является наиболее популярной ягодной культурой во всем мире, благодаря своему вкусу, аромату, антиоксидантной способности, обусловленной высоким наличием антоцианов, витаминов, флавоноидов и других питательных веществ [1, 2]. Выращивание земляники значительно увеличилось за последнее время, что объясняется ее рентабельностью при производстве и высоким потребительским спросом.

В Северо-Кавказском регионе общая площадь насаждений земляники составляет более 15 тыс. га [3]. Традиционно посадочный материал земляники получают вегетативным способом, укорененными розетками. Применение метода клонального микроразмножения *in vitro* обеспечивает альтернативную возможность увеличения производства посадочного материала земляники, свободного от вредоносных организмов, передающихся от материнского растения при вегетативном размножении розетками [4, 5].

Совершенствованием метода клонального микроразмножения земляники садовой *in vitro* занимаются уже много лет. В литературных источниках имеется достаточно большое количество данных о составах питательных сред, влиянии регуляторов роста на эффективность размножения, протоколы стерилизации эксплантов и др. [2, 4, 6-10] Однако, сортимент земляники садовой постоянно обновляется, создаются новые сорта, генотипические реакции которых на условия *in vitro* еще не известны.

В связи с этим, целью наших исследований была оптимизация этапов клонального микроразмножения сортов земляники садовой и оценка их потенциала размножения в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследований.

Объектами исследований были сорта земляники садовой селекции ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»: Нелли, Кемия и сорта итальянской селекции Альба, Клери, Джоли. Исследования проводились в лаборатории вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ в 2019-2020 гг.

Сорт Нелли – среднепозднего срока созревания, урожайность 15-20 т/га. Достоинствами сорта являются высокий уровень адаптации к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды, устойчивость к мучнистой росе и вертициллезному увяданию, зимостойкость, высокие товарные качества ягод.

Сорт Кемия – сорт позднего срока созревания, сочетающий высокую адаптивность, крупноплодность, привлекательность ягод, технологичность, высокую устойчивость к грибным болезням. Урожайность 15-20 т/га [11].

Сорт Альба – один из наиболее раннеспелых, крупноплодных и продуктивных, урожайность – 80 ц/га. Размер ягод крупный, средняя масса – 25-30 г, максимальная масса достигает 46 г.

Сорт Клери – раннего срока созревания, средняя масса ягод 23-30 г, самые крупные имеют вес 40-45 г. Сорт отличается довольно стабильным плодоношением и высокой урожайностью (до 290 ц/га). С одного куста получают в среднем 1–1,5 кг плодов, иногда и до 2 кг урожая.

Сорт Джоли – является одной из самых перспективных новинок ягодного рынка. Урожайность составляет 0,8 кг с куста. Масса ягод в среднем 22-34 г, максимальная – до 50-55 г [12].

Исследования проводили по общепринятым методикам [13]. Экспланты из растущих розеток земляники были использованы в качестве исходного материала, стерилизацию которого проводили по схеме: предварительная подготовка и основная обработка. Подготовленные сегменты в течение 30 минут промывали под проточной водопроводной водой. Основная обработка эксплантов проводилась раствором NaOCl, в концентрации 1,5 % в течение 5 мин., с последующей 3-х кратной промывкой бидистиллированной водой по 5 минут. Экспланты вычленили в асептических условиях в ламинарных боксах марки

БАВнп-01- «Ламинар-С»-1,2 и высаживали в пробирки с питательной средой. Введение в культуру проводили в три срока: вторая декада июня, июля и августа. В качестве основы для питательной среды использовали среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [14]. На этапе введения: безгормональная среда МС, на этапе пролиферации с добавлением 6-БАП (0, 0,5; 1,0; 1,5 мг/л), на этапе укоренения среда ½ МСс добавлением сахарозы 20 г/л, без ауксинов. После введения в культуру экспланты помещали в темноту на 3-5 суток. Культивировали растения при 16- часовом фотопериоде (свет / темнота 16/8 ч) при температуре 25 ± 2 °С и освещенности 2500-3000 люкс.

Укорененные растения адаптировали к условиям *ex vitro* после 4-6 недель укоренения. Растения высаживали в минипарники, содержащие стерилизованную почвенно-торфяную смесь, перлит и вермикулит (3:1:1), проливали ½ раствором макросолей МС и содержали в фитотроне 16-часовом фотопериоде, температуре 22 ± 2 °С при освещенности 6000 люкс. Процент адаптированных растений регистрировали через 20 дней после пересадки.

Обсуждение результатов. Успешность размножения культуры в условиях *in vitro*, определяется многими факторами: культура, тип экспланта, период изоляции культуры, степень контаминации, выделения фенолов и т.д. [3]. В ходе работы нами изучались особенности размножения 5 сортов земляники. Изоляцию эксплантов земляники в культуру *in vitro*, проводили в три срока: июнь, июль и август (рис.1).

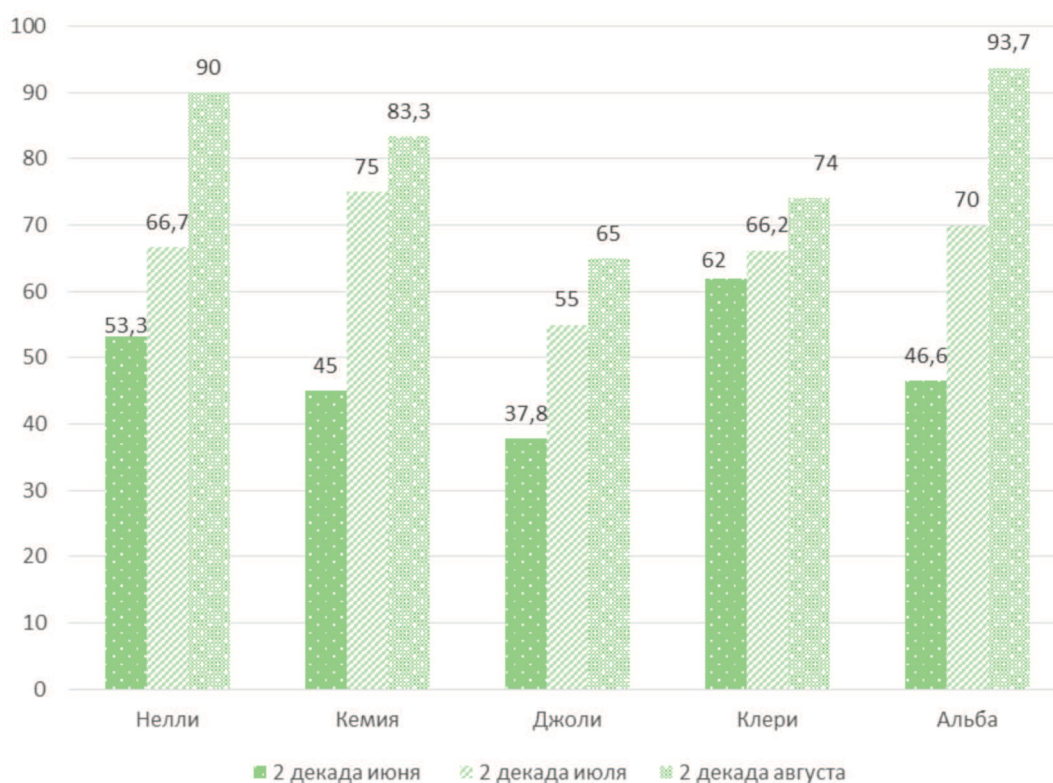


Рис. 1. Эффективность введения эксплантов земляники *in vitro* в зависимости от сроков инициации

По результатам опыта лучшим сроком для введения в культуру *in vitro* сортов земляники является позднелетний период. Наиболее высокая приживаемость эксплантов *in vitro* у сортов отмечена при введении во второй декада августа. Максимальный выход регенерировавших эксплантов составил у сорта Альба – 93,7 %, Нелли – 90 %, Кемия – 83,3

%, Клери – 74 %, Джоли – 65 %. При отборе эксплантов в начале периода усообразования приживаемость эксплантов более низкая и варьирует в пределах 37,8-62,0 % (рис. 1).

Для повышения побегообразования земляники на этапе мультипликации в питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) вводили 6-БАП с различной концентрацией (0; 0,5; 1,0 и 1,5 мг/л) с целью определения оптимального количества цитокинина для качественного побегообразования (табл.).

Таблица – Коэффициенты размножения земляники Кемия и Нелли в зависимости от количества субкультивирований

Сорт	Концентрация, мг/л	Номер пассажа		
		1	2	3
Кемия	6-БАП 0	2,05	2,9	2,45
	6-БАП 0,5	4,95	6,3	7,9
	6-БАП 1,0	5,9	9,2	8,7
	6-БАП 1,5	9,8	10,7	12,7
	<i>HCP</i>	<i>0,8074</i>	<i>0,8830</i>	<i>0,8082</i>
Нелли	6-БАП 0	3,1	3,9	3,3
	6-БАП 0,5	8,3	10,1	9,8
	6-БАП 1,0	10,6	11,4	12,6
	6-БАП 1,5	11,5	11,1	10,8
	<i>HCP</i>	<i>0,9335</i>	<i>0,8616</i>	<i>0,8279</i>

Максимальное количество побегов, в среднем, образуется к третьему пассажиру 9,6-12,7 шт. на среде с 6-БАП 1,5 мг/л. Однако, в этом варианте, несмотря на образование большого количество побегов, большая часть которых была обводнёнными или мелкими.

Проведенный анализ показал, что рост наиболее качественных побегов земляники происходит на средах с 6-БАП в количестве 0,5-1,0 мг/л.

На среде с 6-БАП 0,5 мг/л образуется от 7,4-8,7 побегов у сортов Альба, Джоли, Кемия и до 9,8 побегов у сортов Клери и Нелли. На среде с 6-БАП 1,0 мг/л из одного экспланта можно получить от 9,2 до 12,6 побегов.

Однако, сортовые особенности земляники, помимо концентрации цитокинина и количества субкультивирований, также оказывают влияние на уровень пролиферации побегов в условиях *in vitro*. По данным О.В. Матушкиной, И.Н. Прониной (2012) в условиях *in vitro* высокий уровень побегообразования имеют сорта земляники Сударушка (12,8-13,2 шт./эксплант), Эльсанта (9,3-11,8 шт./эксплант), Камаросса (7,2-9,6 шт./эксплант) [5, 15].

По данным авторов, изучаемых сортов, Яковенко В.В. и др., сорт Нелли в условиях маточника имеет высокую усообразовательную способность (более 50 розеток с маточного куста), сорт Кемия – среднюю (не более 30 розеток).

Последовательное субкультивирование земляники в течение трех пассажей показали, что сорт Нелли в условиях *in vitro* также имеет высокое побегообразование до 12,6 побегов из одного экспланта. У сортов Альба, Джоли Клери и Кемия образуется от 9,2 до 10,6 побегов на эксплант.

Корнеобразование у микрорастений земляники проводили на среде Мурасиге-Скуга. Использование ауксинов на этапе ризогенеза не потребовалось. На этапе предшествующему укоренению у микрорастений земляники началось самопроизвольное корнеобразование. Формирование корней началось спустя 8-10 дней и через 3-4 недели на

безгормональной среде растения были готовы к пересадке в нестерильные условия (рис. 2). У сорта Нелли процент корнеобразования составил 95 %, у сорта Кемия – 98 %. У сорта Альба, Клери и Джоли – 82-93 %

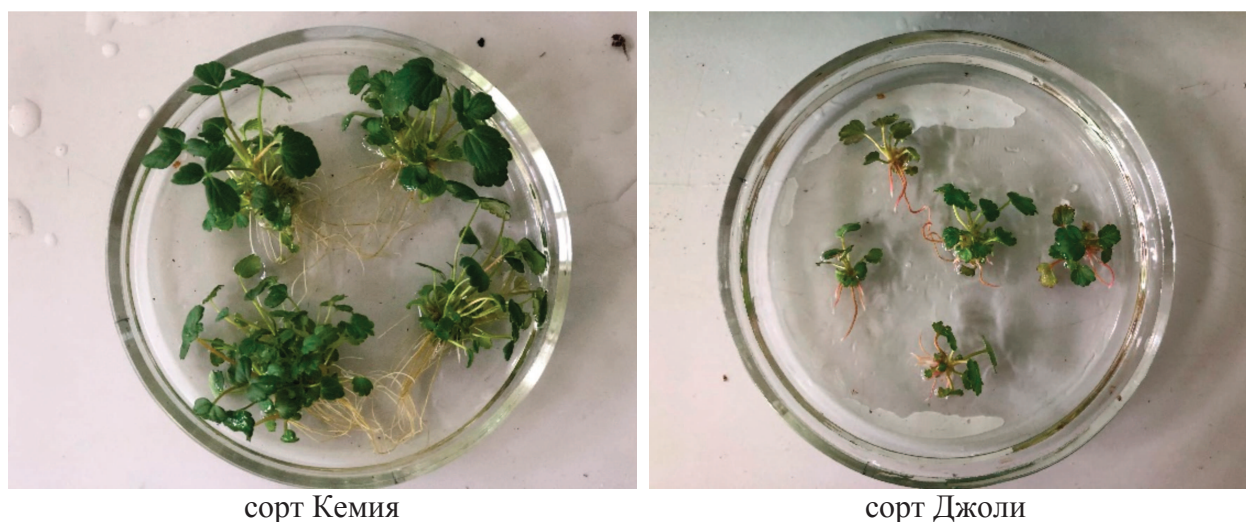


Рис. 2. Корнеобразование земляники на безгормональной питательной среде МС

Перевод растений из условий *in vitro* в нестерильные условия является одним из ответственных этапов в процессе клонального микроразмножения. Земляника является одной из тех культур, которая обладает высокой адаптивностью и стрессоустойчивостью при переводе из условий *in vitro* в условия *ex vitro*. В среднем количество адаптированных растений составило 80 – 95 % (рис. 3).

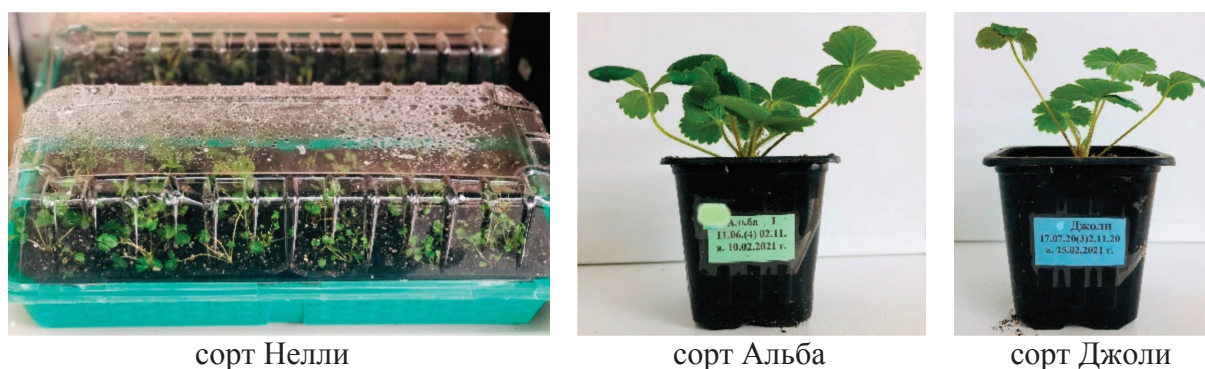


Рис. 3. Адаптация и доращивание растений земляники

Через 1-1,5 месяца адаптированные растения пересаживали в емкости объемом 150-200 мл (рис. 3). После 2-х месяцев доращивания в теплице у растений земляники, в зависимости от сортовых особенностей, начинается процесс усообразования.

Выводы. Введение эксплантов земляники садовой сортов Альба, Джоли, Кемия, Клери и Нелли в культуру *in vitro* более эффективно проводить в позднелетний период, во второй декаде августа. Тогда приживаемость эксплантов составляет у сортов Альба, Нелли и Кемия 83,3–93,7 %, у сортов Джоли и Клери – 65-74 %. На этапе мультипликации побегов добавлять 6-БАП в количестве 1,0 мг/л. При этом от одного экспланта можно получить от 9,2 побегов до 12,6 побегов. При повышении концентрации 6-БАП до 1,5 мг/л возрастает

количество витрифицированных побегов. У сорта Нелли отмечен высокий потенциал размножения в культуре *in vitro* (12,6 побегов с экспланта). На этапе ризогенеза у растений-регенерантов формирование корней проходит на половинной среде Мурасиге-Скуга, без добавления ауксинов. Корни образуются у 95-98 % растений. Укоренившиеся растения рекомендуется адаптировать в субстрате, состоящем из почвенно-торфяной смеси, перлита и вермикулита в соотношении 3:1:1.

Литература

1. Global consumption of strawberries increases annually [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.freshplaza.com/article/2196666/global-consumption-of-strawberries-increases-annually/> (дата обращения: 20.05.2021)
2. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Орлова Н.Ю., Шахов В.В. Микрклональное размножение земляники садовой. Селекция и сорторазведение садовых культур. 2017. Т. 4. № 1-2. С. 93-96.
3. Козий И. Производство ягод в России в цифрах. // Ягоды России. №1 2020. С. 3-4.
4. Moradi K., Otroshy M., Azimi M.R Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures // Journal of Agricultural Technology. 2011. Vol. 7(6). P. 1755-1763.
5. Mahmoud K. Ben, Najar A., Jedid E., Jema, Jemmali A. Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of new sciences, Agroculture and Biotechnology, 2017. V. 47 (2), P. 2564-2676.
6. Ara M.T., Karim R., Karim M.R., Ahmad Sh., Islam R., Hossain M. Effects of different hormones on *in vitro* regeneration of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) // International Journal of Biosciences (IJB). 2012. Vol. 2, No. 10(1). P. 86-92.
7. Kay Thi Oo, Kyaw Swar Oo, YinYin Mon. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Journal of Scientific and Innovative Research; 2018. Vol. 7(3). P. 70-742.
8. Rusea I., Popescu A., Isac V., Hoza D. Micropropagation of strawberry cv Magic. Annals of the University of Craiova. XXIV (LX). 2020. P. 218-223.
9. Jan A., Bhat K.M., Bhat S.J.A., Mir M.A., Bhat M.A., Imtiyaz A., Rather J.A. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture. 2013. Vol.12 (39). P. 5749-5753.
10. Jhahra S., Dashora L.K., Singh J., Bhatnagar P., Kumar A., Arya C.K. In-vitro Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7. 2018. P. 3030-3035.
11. Яковенко В., Лапшин В.И. Сорта земляники для экологического изучения в зоне Северного Кавказа // Научные труды СКФНЦСВВ. Том 14. 2018, С. 147-154.
12. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://kubansad.ru/en/content/zemlyanika/> (дата обращения: 18.01.2021)
13. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005. 51с.
14. Murashige T and Skoog F A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. Vol. 15(3). P. 473-497.
15. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения земляники (методические рекомендации). Воронеж: Кварта, 2012. 20 с.