

О.В. Мацнева

Л.В. Ташматова, кандидат сельскохозяйственных наук

Т.М. Хромова, кандидат биологических наук

В.В. Шахов, аспирант

Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур

РФ, 302530, Орловская обл., Орловский р-н, д. Жилина

E-mail: mazneva@vniispk.ru

УДК 634.75:581.143.6

DOI:10.30850/vrsn/2021/4/24-27

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Провели исследования по оптимизации отдельных элементов микроразмножения перспективных интродуцированных сортов земляники садовой для использования в системе производства оздоровленного посадочного материала. Объекты изучения: сорта земляники зарубежной селекции *Asia* (Азия), *Darselect* (Дарселект), *Siria* (Сирия), *Florens* (Флоренс), *Klery* (Клери), *Honeyoye* (Хоней), *Kimberly* (Кимберли). Работу провели в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК по общепринятым методикам. Оптимальный агент для обеспечения максимальной стерильности, сохранения высокой жизнеспособности и быстрой стабилизации вводимого материала земляники – 0,1 % раствор сулемы. Негативное воздействие окисленных фенолов устранили пересадкой экспланта на свежую питательную среду. Наиболее эффективным для генотипов следует считать введение в культуру *in vitro* при активизации ростовых процессов у розеток земляники после зимнего хранения, обеспечивающей быструю стабилизацию роста и размножения, что служит определяющим фактором интенсивного производства. Через два месяца культивирования наибольшим количеством эксплантов, способных к клонированию, характеризовались сорта земляники Азия (56,7 %), Сирия (52,9), Флоренс (45,1), наименьшим – Клери (19,0 %). При изоляции в фазах активного роста и его замедления способность к образованию дополнительных пазушных микропобегов была минимальной. Исключение составил сорт Азия, 33,2 % эксплантов которого сформировали дополнительные микророзетки. Полученные результаты могут быть использованы для разработки систем производства оздоровленного посадочного материала интродуцированных сортов земляники садовой с помощью биотехнологических подходов.

Ключевые слова: земляника садовая, интродуцированные сорта, стерилизующий агент, срок введения, клональное микро-размножение.

O.V. Matsneva

L.V. Tashmatova, PhD in Agricultural sciences

T.M. Khromova, PhD in Biological sciences

V.V. Shakhov, PhD student

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding

RF, 302530, Orlovskaya obl. Orlovskij r-n, d. Zhilina

E-mail: mazneva@vniispk.ru

OPTIMIZATION OF MICROPROPAGATION ELEMENTS OF INTRODUCED VARIETIES OF GARDEN STRAWBERRY IN AN *IN VITRO* SYSTEM

The purpose of this research is optimization of individual elements of micropropagation of promising introduced varieties of strawberry for use in the production system of healthy planting material. Objects of research are strawberry varieties of foreign selection *Asia*, *Darselect*, *Siria*, *Florens*, *Klery*, *Honeyoye*, *Kimberly*. The research was carried out in the laboratory of biotechnology of the FGBNU VNI-ISPК according to generally accepted methods. The optimal sterilizing agent for ensuring maximum sterility, maintaining high viability and rapid stabilization of the introduced strawberry material was 0.1 % sulema solution. Elimination of the negative impact of oxidized phenols was achieved by transplanting to a fresh nutrient medium. Introduction into the culture *in vitro* with the activation of growth processes in strawberry rosettes after winter storage should be considered the most effective for the studied genotypes, which provides rapid stabilization of growth and reproduction, which is the determining factor of intensive production. Varieties of strawberries *Asia* (56.7 %), *Siria* (52.9 %), *Florens* (45.1 %) were characterized by the largest number of explants capable of cloning after two months of cultivation, the least is the variety *Klery* (19.0 %). The ability to form additional axillary micro-shoots was minimal when isolated in the active growth phase and the growth decay phase. The exception was the *Asia* variety, 33.2 % of which explants formed additional microrosettes. The results obtained can be used for the development of systems for the production of healthy planting material of introduced varieties of garden strawberries using biotechnological approaches.

Key words: garden strawberries, introduced varieties, sterilizing agent, time of introduction, clonal micro-propagation.

Сортимент земляники пополняется значительным количеством новых высокопродуктивных коммерческих сортов, требующих изучения и совершенствования технологии *in vitro* с учетом генотипических особенностей. [1] Поэтому актуальна разработка эффективных и воспроизводимых систем регенерации растений в системе *in vitro* на всех

этапах культивирования. Оптимизация существующих и разработка новых приемов клонального микроразмножения земляники *Fragaria* × *ananassa* Duch. – традиционные вопросы исследований отечественных и зарубежных авторов. [3, 4, 6] Изучаемые проблемы: оптимизация сроков введения исходного материала в культуру; подбор каче-

ственных стерилизующих агентов; разработка схем стерилизации исходного материала; составление эффективных модификаций питательных сред на всех этапах *in vitro* с учетом генотипа; влияние вида и концентрации регуляторов роста на размножение исследуемых объектов; ингибирование деления и роста клеток эксплантов на этапе инициации продуктами окисления фенолов. [2, 5, 7–10]

Цель работы – оптимизировать отдельные элементы микроразмножения интродуцированных сортов земляники садовой для использования в системе производства оздоровленного посадочного материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2016–2020 годах на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК. Объекты изучения – сорта земляники *Fragaria × ananassa* Duch. зарубежной селекции: *Asia* (Азия), *Darselect* (Дарселект), *Siria* (Сирия), *Florens* (Флоренс), *Klery* (Клери), *Honeoye* (Хоней), *Kimberly* (Кимберли).

Исходный материал для выделения апексов и введения их в культуру *in vitro* – неукорененные розетки земляники, летом – розетки с вегетирующих растений. Материал для зимнего использования заготавливали в конце октября и хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 3°C.

Опыт проводили в феврале (активизация ростовых процессов у розеток после зимнего хранения), июне (фаза активного роста), конце августа (затухание роста).

Основные стерилизующие агенты: 12 % перекись водорода (H_2O_2), 0,01 % раствор мертиолята ($C_5H_9HgNaO_2S$), 0,1 % раствор сулемы ($HgCl_2$), 0,2 % раствор нитрата серебра ($AgNO_3$).

Экспланты вводили на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС), фон – 6-БАП 0,5 мг/л, пассировали на МС с БАП 0,8 мг/л.

Лабораторные исследования выполняли по методическим рекомендациям, обработку экспериментальных данных – по Б.А. Доспехову. [1-3]

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе разрабатывали методику по стерилизации растительного материала земляники, обеспечивающую получение активно растущей культуры *in vitro*, свободной от внешней и внутренней инфекции (табл. 1).

Все стерилизующие агенты обеспечивали высокий выход жизнеспособных эксплантов при обработке.

Максимальная контаминация отмечена при стерилизации растительного материала земляники растворами перекиси водорода и мертиолята. Наименьшее повреждение растительных тканей эксплантов отмечено при обработке растворами перекиси водорода и нитрата серебра. Самое большое количество стерильных жизнеспособных эксплантов получено при санации растворами – 0,1 % сулемы и 0,2 % нитрата серебра, но последний вызывал потемнение покровных тканей растительных объектов, не затрагивая тканей апекса.

Таблица 1.
Результативность использования стерилизаторов при инициации эксплантов земляники *in vitro*

Стерилизующий агент, концентрация	Экспозиция, мин.	Некроз	Контаминация	Жизнеспособность
H_2O_2 , 12%	5	1,7	19,3	79,0
$C_5H_9HgNaO_2S$, 0,01%	10	7,5	17,6	74,9
$HgCl_2$, 0,1%	10	8,1	7,0	84,9
$AgNO_3$, 0,2%	2	4,2	7,3	88,5

Таблица 2.
Показатели развития эксплантов земляники на первом пассаже

Сорт	Стерилизатор	Балл	Количество листьев	Коэффициент размножения	Высота растений, мм
Дарселект	$HgCl_2$	3,9	3,6	3,2±0,4	7,1±0,3
	$AgNO_3$	3,2	2,5	2,2±0,4	5,5±0,3
Сирия	$HgCl_2$	4,2	3,8	1,8±0,1	7,4±0,3
	$AgNO_3$	3,9	3,3	1,7±0,1	6,9±0,3
Клери	$HgCl_2$	4,1	3,0	2,3±0,3	6,4±0,2
	$AgNO_3$	4,0	3,5	1,9±0,1	6,3±0,1
Хоней	$HgCl_2$	4,2	5,2	2,8±0,3	6,7±0,3
	$AgNO_3$	3,3	2,4	1,4±0,1	5,6±0,2
Флоренс	$HgCl_2$	4,1	3,2	3,7±0,6	6,7±0,4
	$AgNO_3$	3,9	2,9	2,3±0,2	6,1±0,3
Кимберли	$HgCl_2$	4,5	3,0	3,3±0,3	6,7±0,2
	$AgNO_3$	3,8	2,6	2,4±0,3	6,7±0,4
Азия	$HgCl_2$	4,0	4,8	3,2±0,3	8,4±0,3
	$AgNO_3$	3,8	4,6	2,0±0,2	7,8±0,5

Дальнейшие наблюдения показали разный морфогенный ответ эксплантов на применение наиболее эффективных стерилизаторов $HgCl_2$ и $AgNO_3$ (табл. 2).

Через два месяца лучшие показатели роста и развития были у эксплантов земляники, введенных с использованием 0,1 % раствора сулемы, что связано с более быстрой стабилизацией культуры после применения реагента. Микрорастения всех исследуемых сортов имели большее количество листьев дополнительных микророзеток.

Одна из проблем на этапе инициации морфогенеза у земляники – угнетение роста продуктами фенольного окисления, что часто приводит к гибели экспланта или снижению регенерационной способности. Замачивание исходного растительного материала после стерилизации до момента введения в 0,3 % растворе аскорбиновой кислоты не снижало токсического воздействия полифенолов. Во все сроки инициации наблюдали потемнение базальной части экспланта и питательной среды. Окисление снимали пересадкой экспланта на свежую питательную среду через 16...18 ч.

Для большинства плодовых и ягодных культур наилучшее время введения в культуру *in vitro* меристемных тканей – начало активного роста. В отличие от других растений, земляника не имеет ярко выраженного периода покоя, поэтому розетки закладывали на зимнее хранение до введения в *in vitro* с началом роста.

Таблица 3.
Регенерационная способность экплантов земляники различных сроков введения, %

Сорт	Срок введения	Регенерировало через два месяца		
		всего	образовало розетку	способных к клонированию
<i>Дарселект</i>	Февраль	68,5	35,0	30,9
	Июнь	78,1	36,6	5,6
	Август	79,4	27,5	7,4
<i>Сирия</i>	Февраль	94,1	79,4	52,9
	Июнь	90,2	38,5	10,7
	Август	77,4	52,0	9,8
<i>Клери</i>	Февраль	77,8	69,6	19,0
	Июнь	71,3	12,6	1,3
	Август	66,4	31,0	12,4
<i>Хоней</i>	Февраль	82,7	51,7	34,6
	Июнь	62,3	8,9	6,8
	Август	93,0	34,8	15,9
<i>Флоренс</i>	Февраль	87,0	72,3	45,1
	Июнь	76,8	30,9	3,1
	Август	83,0	23,3	3,5
<i>Кимберли</i>	Февраль	76,7	58,2	38,0
	Июнь	71,5	20,2	9,3
	Август	81,5	49,5	9,3
<i>Азия</i>	Февраль	86,3	67,8	56,7
	Июнь	82,3	36,3	3,4
	Август	85,1	44,2	33,2

Таблица 4.
Влияние сроков введения на пролиферацию микророзеток земляники

Сорт	Срок введения	Балл развития	Коэффициент размножения, шт./экплант	Высота растений, мм
<i>Дарселект</i>	Февраль	4,5	3,2±0,4	7,1±0,3
	Июнь	3,0	2,3±0,4	7,0±0,4
	Август	2,7	1,2±0,1	5,3±0,3
<i>Сирия</i>	Февраль	4,2	1,8±0,1	7,4±0,3
	Июнь	4,5	3,3±0,1	7,2±0,4
	Август	2,8	1,3±0,1	5,7±0,6
<i>Клери</i>	Февраль	4,1	2,3±0,3	6,4±0,2
	Июнь	1,8	1,2±0,1	6,3±0,3
	Август	2,4	1,5±0,1	6,9±0,4
<i>Хоней</i>	Февраль	4,6	3,0±0,4	9,5±0,5
	Июнь	2,9	2,2±0,2	5,8±0,3
	Август	3,1	1,5±0,1	6,3±0,3
<i>Флоренс</i>	Февраль	4,5	4,4±0,6	8,0±,5
	Июнь	1,8	1,1±0,1	5,6±0,2
	Август	2,8	1,4±0,2	5,6±0,1
<i>Кимберли</i>	Февраль	4,6	3,5±0,7	12,6±0,8
	Июнь	3,2	1,9±,3	5,9±0,2
	Август	3,0	1,6±0,1	5,6±0,2
<i>Азия</i>	Февраль	4,6	2,4±0,2	10,6±0,6
	Июнь	3,3	1,3±0,1	7,6±0,3
	Август	4,4	2,0±0,2	8,2±0,4

Исследовали влияние сроков введения экплантов сортов земляники на интенсивность регенерации и способность к клонированию (табл. 3).

Через 4 нед. после введения все исследуемые генотипы имели высокую регенерационную спо-

собность независимо от срока изоляции, через 8 нед. количество экплантов, способных к клонированию, не зависело от общего уровня регенерации. Физиологическое состояние экплантов на момент введения – фактор быстрой стабилизации культуры. Наибольшее количество дополнительных розеток сформировали экпланты, введенные в феврале после хранения (начало роста), при активном делении клеток меристемы. Через два месяца после зимнего введения наибольшим количеством экплантов, способных к клонированию, характеризовались сорта земляники: *Азия* (56,7%), *Сирия* (52,9%), *Флоренс* (45,1), наименьшим – *Клери* (19,0%). В летние периоды изоляции способность к образованию дополнительных пазушных микропобегов была минимальной. Исключение составил сорт *Азия*, 33,2% экплантов которого сформировали дополнительные микророзетки.

На этапе микроразмножения *in vitro*, через 8 нед. культивирования, наиболее высокая пролиферативная активность была у экплантов позднелетнего срока введения (табл. 4).

Таким образом, оптимальный агент для обеспечения максимальной стерильности, сохранения высокой жизнеспособности и быстрой стабилизации вводимого материала земляники – 0,1% раствор сулемы. Наиболее эффективно для генотипов – введение в культуру *in vitro* при активизации ростовых процессов у розеток земляники после зимнего хранения, обеспечивающей быструю стабилизацию роста и размножения, что служит определяющим фактором интенсивного производства.

На этапе микроразмножения сортов проявились генотипические различия в интенсивности регенерационных процессов в зависимости от срока изоляции меристем.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Атрощенко, Г.П. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники/ Г.П. Атрощенко, В.В. Костицын, А.А. Наделюев// С-Пб: СПбГАУ, 2001. – 13 с.
- Джигадло, Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами/ Е.Н. Джигадло, М.И. Джигадло, Л.В. Гольшкина. – Орел: ВНИИСПК, 2005. – 162 с.
- Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта/ Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
- Козлова, И.И. Сорта земляники, отвечающие современным стандартам качества/ И.И. Козлова// Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – Т. 38. – Ч. 1. – С. 200–207.
- Кухарчик, Н.В. Получение посадочного материала плодовых и ягодных растений *in vitro*/ Н.В. Кухарчик// Наука и инновации. – 2019. – № 6 (196). – С. 17–21.
- Матушкина, О.В. Технологические аспекты размножения земляники *in vitro*/ О.В. Матушкина, И.Н. Пронина// Селекция и сортоведение садовых культур. – 2019. – Т. 6. – № 1. – С. 74–77.
- Муратова, С.А. Клональное микроразмножение растений – перспективный метод современного питомниководства/ С.А. Муратова // Мат. конф. «Пути повышения продуктивности агроценозов», Мичуринск. – 2015. – С. 367–373.

8. Bhatia, P. Improving the quality of in vitro culture shoots of tomato/ P. Bhatia, N. Achwath// *Biotechnology*. – 2008. – V. 7. – P. 188–193.
9. Bisvas, M.K. // Multiple Shoots Regeneration of Strawberry under various color Illuminations/ M.K. Bisvas, M. Hossain, M.B. Ahmed et al.// *American – Eurasian Journal of Scientific Research*. – 2007. – V. 2. – P. 133–135.
10. Madumali, H.K.S. Effect of BAP and IBA on Shoot Regeneration of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through Runner Tip Culture/ H.K.S. Madumali, P.D. Abeythilakarathna, T.H. Seran// *Sri Lanka Journal of Food and Agriculture*. – 2019. – V. 5 (1). – P. 41–48.
11. Moradi, K. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures/ K. Moradi, M. Otrshy, M.R. Asimi// *Journal of Agricultural Technology*. – 2011. – V. 7 (6). – P. 1755–1763.
12. Munir, M. In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars/ M. Munir, S. Iqbal, I.U.D. Baloch, A.A. Khakwani // *Journal of Applied Horticulture*. – 2015. – V. 17 (3). – P. 192–198.
13. Rattanpal, H.S. Micropropagation of strawberry through meristem culture/ H.S. Rattanpal, M.I.S. Gill, A.K. Sangwan // *Acta Horticulturae*. – 2011. – V. 860. – P. 149–153.
4. Kozlova, I.I. Sorta zemlyaniki, otvetchayushchie sovremennym standartam kachestva/ I.I. Kozlova// *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*. – 2014. – T. 38. – Ch. 1. – S. 200–207.
5. Kuharchik, N.V. Poluchenie posadochnogo materiala plodovyh i yagodnyh rastenij in vitro/ N.V. Kuharchik// *Nauka i innovacii*. – 2019. – № 6 (196). – S. 17–21.
6. Matushkina, O.V. Tekhnologicheskie aspekty razmnozheniya zemlyaniki in vitro/ O.V. Matushkina, I.N. Pronina// *Selekcija i sortorazvedenie sadovyh kul'tur*. – 2019. – T. 6. – № 1. – S. 74–77.
7. Muratova, S.A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij – perspektivnyj metod sovremennogo pitomnikovodstva/ S.A. Muratova// *Mat. konf. «Puti povysheniya produktivnosti agrocenozov»*, Michurinsk. – 2015. – S. 367–373.
8. Bhatia, P. Improving the quality of in vitro culture shoots of tomato/ P. Bhatia, N. Achwath// *Biotechnology*. – 2008. – V. 7. – P. 188–193.
9. Bisvas, M.K. // Multiple Shoots Regeneration of Strawberry under various color Illuminations/ M.K. Bisvas, M. Hossain, M.B. Ahmed// *American – Eurasian Journal of Scientific Research*. – 2007. – V. 2. – P. 133–135.
10. Madumali, H.K.S. Effect of BAP and IBA on Shoot Regeneration of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through Runner Tip Culture/ H.K.S. Madumali, P.D. Abeythilakarathna, T.H. Seran// *Sri Lanka Journal of Food and Agriculture*. – 2019. – V. 5 (1). – P. 41–48.
11. Moradi, K. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures/ K. Moradi, M. Otrshy, M.R. Asimi// *Journal of Agricultural Technology*. – 2011. – V. 7 (6). – P. 1755–1763.
12. Munir, M. In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars/ M. Munir, S. Iqbal, I.U.D. Baloch, A.A. Khakwani // *Journal of Applied Horticulture*. – 2015. – V. 17 (3). – P. 192–198.
13. Rattanpal, H.S. Micropropagation of strawberry through meristem culture/ H.S. Rattanpal, M.I.S. Gill, A.K. Sangwan // *Acta Horticulturae*. – 2011. – V. 860. – P. 149–153.

LIST OF SOURCES

1. Atroshchenko, G.P. Rekomendacii po proizvodstvu ozdorovlennogo posadochnogo materiala zemlyaniki/ G.P. Atroshchenko, V.V. Kosticyn, A.A. Nadelyuev// S-Pb: SPbGAU, 2001. – 13 s.
2. Dzhigadlo, E.N. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, yagodnymi i dekorativnymi kul'turami/ E.N. Dzhigadlo, M.I. Dzhigadlo, L.V. Golyshkina. – Orel: VNIISPK, 2005. – 162 s.
3. Dospekhov, B.A. Metodika polevogo opyta/ B.A. Dospekhov. – M.: Agropromizdat, 1985. – 351 s.