О. В. Мацнева, нс,

Л. В. Ташматова, снс, к. с.-х. н.,

Т. М. Хромова, мнс,

В. В. Шахов, мнс

ФГБНУ ВНИИСПК, Россия, Орловская область, Орловский район, п/о Жилина
mazneva@vniispk.ru

УДК 634.75:631.533.3:57.085.2

DOI 10.31676/2073-4948-2019-56-28-34

ВВЕДЕНИЕ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Резюме. В статье представлены результаты исследований на этапе введения земляники в культуру с целью увеличения выхода стерильных жизнеспособных эксплантов. Цель исследования: определить влияние стерилизаторов на жизнеспособность эксплантов сортов земляники *in vitro*; установить благоприятные сроки введения в культуру. Выявлена высокая приживаемость эксплантов при изоляции в фазу активного роста (июнь). Наибольший выход стерильных и жизнеспособных эксплантов отмечали в варианте стерилизации 0,1% раствором сулемы (64,7-71,7%).

Ключевые слова: земляника, *in vitro*, срок введения, стерилизующий агент, жизнеспособность.

Summary. The results of studies at the stage of introduction of strawberries into the culture in order to increase the yield of sterile viable explants have been presented in the article. The purpose of research was to determine the influence of sterilizers on the viability of strawberry varieties' explants into *in vitro* culture; to establish favorable periods for introduction into the culture. The high survival rate of explants in isolation in the phase of active growth (June) was revealed. The highest yield of sterile and viable explants was noted in the variants of sterilization with 0.1% solution of sulema (64.7-71.7%).

Keywords: strawberry, *in vitro*, period of introduction, sterilizing agent, viability.

Введение

Применение биотехнологических методов оздоровления в сочетании с микроразмножением позволяет получать растения, свободные от вирусных и фитоплазменных заболеваний, нематод, клещей, грибных и бактериальных патогенов. Прием клонального микроразмножения земляники садовой применяется для быстрого и эффективного тиражирования отдельных форм и сортов из небольшого количества исходного материала, отбора *in vitro* на ранних стадиях развития, обмена растительным материалом без риска переноса карантинных объектов [1, 2]. Существует ряд проблем в данной технологии, в частности, недостаточный выход стерильного жизнеспособного материала из-за высокой контаминации и гибели эксплантов. Данный фактор снижает результативность и увеличивает сроки выхода оздоровленных

растений. Инициация культуры *in vitro* и ее стабилизация являются важными условиями успешного микроразмножения.

Освобождение эксплантов от сапрофитной микрофлоры достигается поверхностной стерилизацией различными препаратами с биоцидным действием. Они должны эффективно воздействовать на грибную и бактериальную инфекцию, не вызывая гибель растительных тканей. Для каждого вида растений оптимальный режим стерилизации, способствующий высокому выходу жизнеспособных эксплантов, определяется экспериментальным путем. Для стерилизации растительного материала земляники используют 0,01%-ный раствор мертиолята, 0,1%-ный раствор сулемы, 12- и 30%-ный раствор перекиси водорода, 0,5-5,0%-ный гипохлорит натрия, 70%-ный этиловый спирт [3, 4].

Важным аспектом микроклонального размножения являются сроки изоляции исходного материала с маточных растений и введения его в культуру *in vitro*. Способность эксплантов к регенерации определяется состоянием материнского растения в период изолирования. Землянику вводят в культуру в фазу активной вегетации растений (май-июнь) или осенью (сентябрь) [5, 6]. По мнению ряда исследователей, сезон вычленения меристем не оказывает существенного влияния на способность растений к регенерации [7, 8].

Несмотря на то, что технология клонального микроразмножения хорошо разработана для многих видов растений, она универсальна лишь в общих закономерностях и требует усовершенствования отдельных элементов.

Цель исследования: определить влияние стерилизаторов на жизнеспособность эксплантов сортов земляники *in vitro*; установить благоприятные сроки введения в культуру.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК в 2017-2018 гг. Объектами исследований служили сорта земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) отечественной и зарубежной селекции: Царица, Берегиня, Урожайная ЦГЛ (Россия), Florence (Флоренс) (Великобритания), Asia (Азия) и Marmolado (Мармелада) (Италия). Исходными эксплантами служили меристематические верхушки, взятые с неукорененных розеток в различные сроки вегетации: июнь – фаза активного роста, конец августа – затухание роста, октябрь – окончание роста.

Исследования проводили в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями [8, 9].

Перед стерилизацией розетки земляники освобождали от листьев и промывали в течение 2 минут в слабом растворе моющего средства «Sorti» (0,5 мл/л). Стерилизацию проводили по общепринятой схеме с использованием 0,1% сулемы или 0,01% мертиолята. Время экспозиции 10 минут.

Во время изоляции апексов для снятия отрицательного воздействия фенолов исходный материал находился в 0,3%-ном растворе аскорбиновой кислоты.

Для введения эксплантов земляники использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга на фоне 6-БАП 0,5 мг/л. pH питательной среды 5,5-5,8. Для санации питательной среды и эксплантов от инфекции использовали антибиотик гентамицин в концентрации 0,5 мг/л, добавляя его в питательную среду перед автоклавированием.

Учет проводили через 4 недели культивирования. Учитывали количество инфицированных и неразвившихся эксплантов.

Результаты исследований

При введении земляники в культуру важно учитывать фазу вегетации исходного материала, особенности действия стерилизующих веществ, влияние генотипических особенностей сортов на дальнейшую регенерацию в условиях *in vitro*. При изоляции апексов отмечали интенсивное выделение фенольных соединений и сильное окрашивание питательной среды в месте соприкосновения с эксплантом. Замачивание исходного материала в 0,3%-ном растворе аскорбиновой кислоты не предотвращало выделение фенолов в питательную среду, однако при пересадке эксплантов на свежую питательную среду повторного окисления фенольных соединений не наблюдалось. Апексы имели зеленую окраску и сохраняли жизнеспособность.

Инфицированность эксплантов по срокам изоляции была достаточно высокой и составила в среднем по сортам 28,2% в фазу активного роста, 21,0% в фазу снижения ростовой активности и 43,0% в фазу окончания роста. У отдельных сортов отмечалась значительная гибель эксплантов: при позднелетнем сроке введения в культуру *in vitro* – Урожайная ЦГЛ (53%), Мармелада (39%); при осеннем – Азия (41%), Царица (39%). В октябре уровень контаминации эксплантов превышал значения показателей других сроков изоляции (табл. 1).

Таблица 1.

Показатели контаминации эксплантов земляники при стерилизации 0,01%-ным раствором мертиолята, %

Сорт	Активный рост (июнь)		Затухание роста (август)		Окончание роста (октябрь)	
	контаминация	некроз	контаминация	некроз	контаминация	некроз
Царица	13	8	15	30	38	39
Берегиня	17	22	30	10	27	22

Окончание табл. 1.

Сорт	Активный рост (июнь)		Затухание роста (август)		Окончание роста (октябрь)	
	контаминация	некроз	контаминация	некроз	контаминация	некроз
Урожайная ЦГЛ	16	27	18	53	67	27
Азия	29	14	18	16	30	41
Флоренс	43	24	32	10	45	9
Мармелада	51	6	13	39	47	20
Среднее значение	28,2	16,8	21,0	26,3	43,0	26,3

При использовании в качестве стерилизующего агента 0,1%-ного раствора сулемы показатели инфицированности и гибели эксплантов были относительно низкими (табл. 2).

Таблица 2.

Показатели контаминации эксплантов земляники при стерилизации 0,1%-ным раствором сулемы, %

Сорт	Активный рост (июнь)		Затухание роста (август)		Окончание роста (октябрь)	
	контаминация	некроз	контаминация	некроз	контаминация	некроз
Царица	0	4	10	10	6	6
Берегиня	8	12	21	27	11	0
Урожайная ЦГЛ	13	16	20	36	11	4
Азия	26	9	16	18	5	5
Флоренс	42	26	18	16	17	13
Мармелада	9	15	2	18	5	5
Среднее значение	16,3	13,7	14,5	20,8	9,2	5,5

При введении эксплантов изученных сортов в культуру контаминация в среднем составила: в июне – 16,3, в августе – 14,5, в октябре – 9,2%. Доля неразвившихся эксплантов составила 13,7, 20,8, 5,5% соответственно. Самая высокая инфицированность отмечена у сортов Флоренс (42%) и Азия (26%) – в фазу активного роста.

В целом по вариантам опытов более низкая приживаемость была отмечена при стерилизации исходного материала земляники 0,01% раствором мертиолята. Данный агент оказывал более жесткое воздействие на растительные ткани, вызывая гибель части эксплантов. Стерилизация 0,1% раствором

сулемы проходила более эффективно и мягко, не вызывая значительного некроза растительных тканей.

Проведенные исследования показали различную регенерационную способность эксплантов, изолированных в разные сроки вегетации. Это объясняется различным морфофизиологическим состоянием исходного растительного материала в разные периоды вегетации. Оптимальным сроком введения земляники в культуру *in vitro* можно считать фазу активного роста, когда приживаемость эксплантов была высокой (табл. 3). Полученные результаты согласуются с литературными данными [5, 10].

Таблица 3.

Жизнеспособность эксплантов земляники в различные сроки введения в культуру *in vitro*, %

Сорт	Активный рост (июнь)		Затухание роста (август)		Окончание роста (октябрь)	
	мертиолят	сулема	мертиолят	сулема	мертиолят	сулема
Царица	79	96	55	80	23	88
Берегиня	61	90	60	52	51	89
Урожайная ЦГЛ	57	71	29	44	6	85
Азия	57	65	66	66	29	90
Флоренс	33	32	58	66	46	70
Мармелада	43	76	52	80	33	88
Среднее значение	55,0	71,7	53,3	64,7	31,3	85,0

Через 3-4 недели после изоляции в июне микрорастения успешно развивались, имели интенсивно зеленый цвет. Через два месяца субкультивирования начинали образовываться небольшие конгломераты микрорастений. Через 5 месяцев после введения часть микророзеток была готова для пересадки на среду укоренения.

Влияние генотипа проявлялось во все сроки введения. В фазу активного роста наибольшее количество стерильных жизнеспособных эксплантов было получено у сорта Царица: 96% от введенных в культуру при стерилизации сулемой и 79% при использовании мертиолята; сорта Берегиня (90 и 61% соответственно вариантам обработки). Сорт Флоренс показал низкую приживаемость в обоих вариантах стерилизации (32 и 33%).

В августе вегетативный рост исходных растений земляники замедляется. Приживаемость эксплантов некоторых сортов значительно снизилась. При введении сорта Царица получено 80% стерильных жизнеспособных эксплантов при обработке 0,1%-ным раствором сулемы и 55% – при обработке 0,01%-ным раствором мертиолята; при введении сорта Мармелада – 80 и

52% соответственно вариантам обработки. У сорта Флоренс наблюдали увеличение числа стерильных жизнеспособных эксплантов до 66 (сулема) и 58% (мертиолят).

В целом развитие эксплантов, введенных в июне, было более интенсивным, чем введенных в августе.

При осеннем введении в культуру с использованием 0,1%-ного раствора сулемы наблюдался высокий выход стерильных жизнеспособных эксплантов (70-90%). Наблюдения за их дальнейшим развитием показало, что при равных условиях культивирования с эксплантами, введенными в июне и августе, уровень дальнейшей регенерации был низким. Отмечался сильный рост примордиального листа и замирание точки роста. Стадии розетки достигли 33% от числа жизнеспособных эксплантов сорта Берегиня, 36 – сорта Мармелада, 49 – сорта Азия, 42 – сорта Флоренс, 76 – сорта Царица, 52% – сорта Урожайная ЦГЛ.

Выводы

Оптимальным стерилизующим агентом для обеспечения стерильности и сохранения высокой жизнеспособности вводимых эксплантов является раствор сулемы в концентрации 0,1%. Получено в среднем 64,7-71,7% эксплантов.

Изоляция апексов в различные сроки вегетации показала преимущество введения в фазу активного роста исходных растений (июнь), когда меристема обладает наибольшей регенерационной способностью.

Отмечено существенное влияние генотипа (сортовых особенностей) на показатели приживаемости эксплантов при введении в культуру *in vitro*.

Список использованной литературы

1. Наделюев А. Л. Совершенствование технологии производства оздоровленного посадочного материала земляники в Ленинградской области: автореф. дисс. ... к. с.-х. наук. – СПб, 2002. – 16 с.
2. Сковородников Д. Н., Леонова Н. В., Андропова Н. В. Влияние состава питательной среды на эффективность размножения земляники садовой *in vitro* // Вестник ОрелГАУ, 2013 – №1(13). – С. 89-92.
3. Мацнева О. В., Ташматова Л. В., Шахов В. В. Эффективность применения стерилизующих агентов для эксплантов земляники // Селекция и сорторазведение садовых культур, 2018. – Т. 5. – № 1. – С. 71-73.
4. Навальнева И. А., Буковцева И. С. Анализ качества стерилизующих агентов и их влияние на объекты микроразмножения в условиях *in vitro* на примере земляники садовой (*Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne) // Актуальные вопросы современной науки: Мат. II Междунар. науч. конф. – СПб, 2012. – С. 30-33.

5. Атрощенко Г. П., Костицын В. В., Наделюев А. Л. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. – СПб: СПбГАУ, 2001. – 13 с.
6. Кухарчик Н. В., Кастрицкая М. С., Семенас С. Э., Колбанова Е. В., Красинская Т. А. и др. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro* / Под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Мн: Беларуская навука, 2016. – 235 с.
7. Высоцкий В. А. Выращивание оздоровленного посадочного материала земляники // Садоводство и виноградарство, 2000. – №1. – С. 14-16.
8. Джигадло Е. Н., Джигадло М. И., Голышкина Л. В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Под ред. Е. Н. Джигадло. – Орел: ВНИИСПК, 2005. – 49 с.
9. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
10. Матушкина О. В., Пронина И. И. Регенерационная способность земляники в культуре изолированной ткани // Плодоводство и ягодоводство России, 2012. – Т. 32, ч. 1. – С. 274-279.

O. V. Matsneva, L. V. Tashmatova, T. M. Khromova, V. V. Shakhov

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding,
Russia, Orel oblast, Orel district, p/o Zhilina

THE INTRODUCTION OF STRAWBERRY VARIETIES INTO *IN VITRO* CULTURE