С. А. Корнацкий, к.с.-х.н., доцент биотехнологической лаборатории
агробиотехнологического департамента
Аграрно-технологического института
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Россия, г. Москва,
vitolab@rambler.ru

УДК 634.75:635.037

DOI 10.31676/2073-4948-2019-59-25-32

ВОПРОСЫ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH.) ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

Реферат. Сорты земляники зарубежной селекции Дарселект, Кимберли, Азия, Флоренс перманентно культивировали *in vitro* на протяжении 5 лет или 56-60 пассажей. За период наблюдений не выявлено каких-либо отклонений фенотипических признаков и морфогенетических характеристик. Растения всех сортов после адаптации к нестерильным условиям в теплице были склонны к повышенной вегетативной продуктивности. По этому же показателю не выявлено различий у растений после 14 и 54 пассажей культивирования. Восстановление генеративной функции в обоих случаях происходило после прохождения периода покоя.

Ключевые слова: земляника, культивирование *in vitro*, клональное микроразмножение, адаптация, фенотипическая стабильность, вегетативная продуктивность, генеративная продуктивность

Summary. Varieties of strawberry of foreign breeding Darselekt, Kimberly, Asia, Florence permanently cultivated *in vitro* for 5 years or 56-60 passages. During the observation period, no deviations of phenotypic features and morpho-genetic characteristics were revealed. Plants of all varieties, after adapting to non-sterile conditions in the greenhouse, were prone to increased vegetative productivity. According to the same parameter, no differences in plants were revealed after 14 and 54 passages of cultivation. Restoration of the generative function in both cases occurred after the passage of the rest period.

Keywords: strawberry, *in vitro* cultivation, clonal micropropagation, adaptation, phenotypic stability, vegetative productivity, generative productivity

Введение

Земляника садовая — одна из самых востребованных ягодных культур. Достаточно давно известны приемы и способы ее возделывания, но для создания высокопродуктивных плантаций земляники требуется качественный и здоровый посадочный материал, который может быть выращен в специализированных маточных насаждениях. Считается, что для закладки маточников наиболее оправдано брать пробирочные растения, полученные методом

in vitro. В настоящее время метод успешно используется на практике в отношении большого числа вегетативно размножаемых растений, включая землянику [1]. Объективно потребность в таком подходе возникла потому, что традиционная схема размножения земляники наземными вегетативными органами ведет к массовому распространению ряда опасных патогенов — земляничного клеща, нескольких видов нематод, а также фитопатогенных вирусов.

Однако внедрение в производство биотехнологических методов повлекло за собой и новый ряд принципиальных проблем. Достаточно скоро в научной литературе стала появляться информация о том, что у растений, полученных *in vitro*, периодически наблюдаются аномалии роста и развития [2, 3]. В результате возникло предположение о дрейфе генотипа и, как результат, возможной генетической неоднородности получаемого материала [4]. Подобные сведения массово транслировались в отечественных источниках без соответствующей научной проверки, формируя тем самым негативный фон для развития нового направления.

В значительной степени это касалось именно земляники, как культуры, наиболее успешно размножаемой *in vitro*. Появление в массе генетически однородного материала посторонней примеси, не отвечающей сортовым признакам, ставило под сомнение всю теорию метода, тем более что этот материал — потенциальная база для производства посадочного материала высоких категорий. Согласно технологии, необходима высадка растений в изолированных условиях, с обязательной защитой от летающих насекомых. В изоляторах происходит последующее усообразование и накопление укоренившихся розеток. В качестве обязательной процедуры периодически выполняется очень важная технологическая операция — удаление цветоносов. В год посадки, когда растения только приживаются, процесс можно было достаточно легко отслеживать визуально, так как они имеют относительно небольшой размер и занимают ограниченную площадь. Однако в дальнейшем факт появления цветоносов трудно контролировать — требуются большие трудозатраты по их обнаружению, а само цветение в условиях высоких температур завершается скоротечно. В таком случае неизбежны пропуски цветоносов при удалении, что заканчивается самоопылением определенной части цветков, после чего соцветия теряются из поля зрения. Это и обеспечивает последующие проблемы. Эффект высокой всхожести недозрелых семян земляники хорошо известен и используется в селекционной практике — очевидно, что он имел место в данном случае. Всего несколько растений на делянке, появившихся из таких семян и имеющих при этом иную от исходной генетическую основу, в состоянии за год-два дать значительное вегетативное потомство. Именно эти растения могут быть восприняты, как несущие генетические отклонения, а факт их появления отнесен к издержкам размножения *in vitro* [5].

Еще одна проблема, которую отмечают многие исследователи, задержка развития генеративных органов у земляники после культуры тканей и ее излишняя вегетативная продуктивность [6]. Наиболее очевидно, что она связана с принципиальными различиями типов растений. Известно, что динамика развития растений земляники очень четко задается фотопериодом. В естественных условиях усообразование начинается в конце первой половины лета, на исходе фазы плодоношения, когда растения достаточно истощены. При такой же длительности светового дня синхронно начинается усообразование и у растений *in vitro*, но процесс протекает более энергично, поскольку растения не расходовали пластические вещества на развитие генеративных органов и формирование урожая. В дальнейшем, по мере сокращения светового дня и снижения среднесуточной температуры в сентябре создаются условия для формирования генеративных органов равнозначно у растений разного происхождения, т. е. происходит закладка цветочных почек на следующий год. Моделирование в климатической камере температурно-световых условий конца лета — начала осени позволило обеспечить закладку генеративных органов у адаптированных микрорастений, что впоследствии было установлено после их посадки в теплицу с подходящими для развития условиями [5].

Максимально возможная длительность культивирования *in vitro* также достаточно часто дискутируется в научной литературе [7]. Как результат, появились рекомендации по регламентированию этого параметра [8]. Предположительно, ограничение числа пассажей минимизирует вероятность появления генотипических и фенотипических отклонений, которые, конечно, достоверно можно установить только применением соответствующих методов [9, 10]. Однако на примере микрорастений голубики не было выявлено никаких проблем с генетической стабильностью материала *in vitro* [11]. Настоящие исследования были проведены с целью выяснения некоторых особенностей развития растений земляники, полученных методом *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в биотехнологической лаборатории агробиотехнологического департамента Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов в 2014–2019 гг. Объектами исследований были сорта земляники зарубежной селекции Darselect (Дарселект), Kimberly (Кимберли), Asia (Азия), Florence (Флоренс). Все этапы культивирования соответствовали общепризнанным схемам. Материал *in vitro* помещали в культуральную комнату с освещенностью 5000–6500 лк, 16-часовым фотопериодом и температурой $+24 \pm 1$ °C. После адаптации к нестерильным условиям растения перемещали в теплицу, температура в которой с октября по март поддерживалась в пределах $+12...15$ °C, а с марта по октябрь — в интерва-

ле +15...35 °C. Дополнительное освещение не использовали. В опыте изучали 5 вариантов, для чего сформировали 5 групп растений, сходных по физическим параметрам (высота растений, количество листьев, объем корневой системы). В качестве модельного был взят сорт Дарселект. Вариант 1 (контроль) — дочерние розетки от маточных тепличных растений с периодом покоя в искусственных условиях; вариант 2 — дочерние розетки от маточных тепличных растений без периода покоя; вариант 3 — адаптированные микрорастения непосредственно после 58 пассажей *in vitro* без периода покоя; вариант 4 — адаптированные микрорастения после 54 пассажей *in vitro* с периодом покоя в искусственных условиях; вариант 5 — адаптированные микрорастения после 14 пассажей *in vitro* с периодом покоя в искусственных условиях.

Прохождение периода покоя растениям обеспечивали в климатической камере KBW 240 BINDER (Германия) в течение 1,5 месяцев при низких положительных температурах (+3-5 °C). Для посадки растений использовали пластиковые контейнеры объемом 10 л, заполненные торфом, в которые высаживали по 3 растения. Учеты проводили еженедельно, регистрировали динамику роста, цветения и усообразования.

Результаты исследований

В ходе длительного культивирования в течение 56-60 пассажей не было визуально выявлено каких-либо отклонений роста и развития пролиферирующих культур в пассажах размножения, укоренения микропобегов, адаптации микрорастений по изучаемым сортам. Между сортами различия были очевидными, которые сохранялись на протяжении всех лет наблюдений. Особенно это касалось стадии пролиферации, когда определяли коэффициент размножения в пассажах. Оптимальная длительность пассажа определялась скоростью заполнения внутреннего объема пробирок растущими эксплантами. Процесс пролиферации протекал успешно у всех сортов в течение 1 месяца на питательной среде с бензиламинопурином (6-БАП) при концентрации 1,0 мг/л, за исключением сорта Кимберли. У сорта Кимберли культивирование в пассаже более трех недель приводило к развитию витрификации эксплантов и последующей гибели материала. Далее конгломераты делили на 5-6 частей, которые высаживали на свежие порции питательной среды аналогичного состава. На стадии элонгации использовали низкие концентрации 6-БАП (0,05 мг/л) в составе питательной среды, что позволяло получать микропобеги высотой 3-5 см. На стадии укоренения концентрацию цитокинина снижали до 0,01 мг/л, за счет чего удалось добиться 100 %-ой укореняемости материала всех сортов. В ходе адаптации часть растений независимо от сорта погибала из-за патогенеза грибной и бактериальной природы, а также неблагоприятного сочетания факторов окружающей среды. Выход адаптированных растений находился в пределах 60-80 %, и он никак не зависел от сортовых особенностей.

Основной интерес исследований в данном случае представляло дальнейшее развитие растений, размноженных с использованием метода *in vitro* и находящихся в различных стадийных и физиологических состояниях на момент начала опыта. Высадка в теплицу растений изучаемых вариантов (см. методику) показала, что наиболее положительной динамика роста была у растений, имевших период покоя. При достаточно близкой стартовой высоте надземной части (от 4,8 до 6,1 см) в вариантах 1, 4 и 5 растения в течение 4 недель сформировали мощный листовой аппарат; растения из вариантов 2 и 3, которые не имели периода покоя перед высадкой, развивались слабее (рис. 1).

Рис. 1. Динамика роста растений различного происхождения земляники сорта Дарселект в ходе вегетации.

Примечание: * — полное описание вариантов изучения представлено в методике

Однако в течение четвертой-пятой недель роста у всех растений изучаемых групп регистрировали цветение и после искусственного опыления в течение последующего месяца плодоношение. Генеративная продуктивность была близкой как у растений, имевших различную длительность культивирования *in vitro* (варианты 4-5, рис. 2), так и у адаптированных непосредственно после культуры тканей (вариант 3, рис. 2). К концу шестой - началу седьмой недели роста у растений в вариантах 1, 4, 5 и вскоре 3 регистрировали начало усообразования. Несмотря на различное происхождение и физиологический статус в названных выше вариантах развитие столонов и формирование дочерних розеток происходило практически равноценно (табл. 1).

Различия по числу розеток на одно растение в изучаемых вариантах (кроме варианта 2) находились в пределах ошибки опыта. По числу розеток на один стolon существенное превышение над остальными вариантами было отмечено в варианте 3, хотя при этом число столонов на растение здесь оказалось ниже, чем в вариантах с периодом покоя. В данном случае, по-видимому, сказывался гормональный фон после культивирования *in vitro*. Исключение составил лишь вариант 2, представленный дочерними растениями, не получившими периода покоя, где усообразование было крайне низким, что, скорее всего, связано с физиологическими проблемами (хотя цветение при этом было равноценным).

Рис. 2. Плодоношение растений земляники сорта Дарселект после длительного культивирования *in vitro*. Слева: вариант 4 (54 пассажа + период покоя); справа: вариант 3 (непосредственно после адаптации).

Таблица 1.

Особенности вегетативной продуктивности растений земляники сорта Дарселект различного происхождения и физиологического статуса

Происхождение растений	Число столонов на 1 растение, шт.	Число розеток на 1 стolon, шт.	Число розеток на 1 растение, шт.
вариант 1 (контроль) дочерние розетки от маточных тепличных растений с периодом покоя в искусственных условиях	3,7	2,0	7,3
вариант 2 дочерние розетки от маточных тепличных растений без периода покоя	1,0	1,7	1,7
вариант 3 адаптированные микрорастения непосредственно после 58 пассажей <i>in vitro</i> без периода покоя	2,3	2,9	6,7
вариант 4 адаптированные микрорастения после 54 пассажей <i>in vitro</i> с периодом покоя в искусственных условиях	3,3	2,1	7,0
вариант 5 адаптированные микрорастения после 14 пассажей <i>in vitro</i> с периодом покоя в искусственных условиях	3,7	2,1	7,7
НСР ₀₅	0,7	0,4	1,1

Выводы

Нет оснований для ограничения числа пассажей микроразмножения земляники при использовании 6-БАП в питательной среде в диапазоне концентраций 0,01-1,0 мг/л, поскольку при изучении не было выявлено каких-либо изменений морфо-биологических характеристик в течение 5 лет непрерывного культивирования *in vitro*. Показатели вегетативной и генеративной продуктивности растений земляники, в значительной степени характеризующие генотип, у сорта Дарселект не зависели от стадийного состояния материала — *in vivo*, *in vitro* (54 пассажа), *in vitro* (14 пассажей) при обеспечении прохождения периода покоя.

Список использованной литературы

1. **Barlass M.** Micropropagation of temperate fruits — application and limitation // *Acta Horticulturae*, 1989. — № 240. — P. 43–50.
2. **Isahad T.** Justments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants // *Acta Biologica Cracoviensia*, ser. Botanica, 2015. — V. 57/2. — P. 9–28.
3. **Mohamed F. H.**, Abd El-Hamed K. E., Omar F. A., El-Shahat A. A. *Ex vitro* Performance and Genetic Stability of Strawberry Plants Derived from Different *in Vitro* Propagation Methods // *Hortscience Journal of Suez Canal University*, 2017. — V. 6 (1). — P. 39–50.
4. **Naing A. H.**, Kim S. H., Chung M. Y., Park S. K., Kim C. K. *In vitro* propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars // *Plant Methods*, 2019. — V. 15 (36). — P. 1–10.
5. **Корнацкий С. А.**, Гусева О. А., Седельникова О. В. Методологические и практические аспекты выращивания чистосортной и продуктивной рассады земляники: мат. межд. науч.-практ. конф. «Генетические основы селекции сельскохозяйственных культур» (Мичуринск, 24-25 мая 2017 г.). — Мичуринск, 2017. — С. 158–164.
6. **Поляков А. В.**, Линник Т. А. Производство оздоровленного посадочного материала сортов земляники садовой (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) с низкой усообразующей способностью методом клонального микроразмножения *in vitro* // *Вестник МГОУ: Серия «Естественные науки»*, 2014. — № 3. — С. 35–41.
7. **Высоцкий В. А.** О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур // *Сельскохозяйственная биология*, 1995. — № 5. — С. 57–63.
8. ГОСТ Р 54051-2010. Плодовые и ягодные культуры. Стерильные культуры и адаптированные микрорастения. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2011. — 16 с.
9. **Ehsan S.**, Khalil A. S., Afshin S., Nasim G., Pooran G. Evaluation of genetic stability of plantlets from tissue culture Date Palm using microsatellite markers // *Iranian J. Hort. Sci.*, 2017. — V. 48. — №. 2. — P. 357–367.
10. **Bhalang D.**, Prabhuling G., Hipparagi K., Raghavendra S., Prakash D. P., Babu A. G. Analysis of the Genetic Stability of Banana Tissue Culture Propagated Plantlets cv. Ney Poovan (AB) Using Morphological and Molecular Markers // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2018. — V. 7(01). — P. 1007–1018.

11. **Божидай Т. Н.**, Волосевич Н. Н., Кухарчик Н. В. Анализ генетической стабильности растений голубики сорта Duke, полученных в культуре *in vitro* // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі: Серыя аграрных навук, 2015. — № 2. — С. 60–63.

S. A. Kornatskiy

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

**QUESTIONS OF PHENOTYPIC STABILITY AND PHYSIOLOGICAL STATUS OF
STRAWBERRY PLANTS (*FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH.) DURING LONG
CULTIVATION *IN VITRO***