

ОПТИМИЗАЦИЯ СРОКОВ ВВЕДЕНИЯ ЗЕМЛЯНИКИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

О.В. Мацнева , н.с.
Л.В. Ташматова, к.с.-х.н.

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, matsneva61@list.ru

Аннотация

С целью определения оптимальных сроков введения земляники в культуру *in vitro* мы изучали четыре периода изоляции: позднелетний (февраль), раннелетний (июнь), позднелетний (август) и осенний (октябрь). Объектами исследования являлись сорта земляники садовой Берегиня, Царица, Урожайная ЦГЛ, Фрида. Исходным материалом для позднелетнего введения служили неукорененные розетки, заготовленные в конце октября и помещенные в холодильную камеру при температуре 2...3 градуса Цельсия. В летние и осенний периоды розетки брались с вегетирующих растений. Стерилизацию проводили по общепринятой методике с применением 0,01% раствора мертиолат. В качестве основной питательной среды использовали среду Мурасиге-Скуга. Наибольшую жизнеспособность показали экспланты, введенные в культуру в позднелетний период. Процент регенерации составил в среднем 76,5. Высокая приживаемость меристем обусловлена активизацией ростовых процессов у розеток земляники, вышедших из состояния покоя. Осенний срок введения (октябрь) показал низкий выход жизнеспособных эксплантов – 45%.

Ключевые слова: земляника садовая, экспланты, период изоляции, *in vitro*, жизнеспособность

OPTIMIZATION OF THE TERMS OF STRAWBERRY *IN VITRO* INTRODUCTION

O.V. Mazneva , researcher
L.V. Tashmatova, cand. agr. sci.

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPК, matsneva61@list.ru

Abstract

In order to determine the optimal terms of strawberry *in vitro* introduction, four periods of isolation were studied: late winter (February), early summer (June), late summer (August) and autumn period (October). Five strawberry cultivars, Bereginya, Tzaritza, Urozhainaya TzGL and Frida, were under study. Non-rooted strawberry rosettes harvested in late October and placed in the refrigerator chamber at 2–3°C were used as an initial material for late-winter introduction. In summer and autumn the rosettes were taken from vegetating plants. The sterilization was conducted according to the generally accepted methodology with the application of 0.01% mertiolate solution. Murasige-Skuga was used as a basic nutrient medium. The explants introduced *in vitro* in late winter showed the

greatest viability. The regeneration percentage was 76.5, on the average. The high survival rate of meristems was caused by activation of growth processes in the strawberry rosettes which came out from dormancy. Autumn term of introduction (October) showed a low output of viable explants – 45%.

Key words: strawberries, explants, isolation period, *in vitro*, viability

Введение

Земляника садовая является одной из основных ягодных культур в нашей стране и за рубежом. Она обладает высокой пластичностью и приспособленностью к различным условиям выращивания, скороплодностью, ежегодной урожайностью, высокими вкусовыми качествами плодов. Однако, в последнее время наблюдается снижение урожайности (до 20...80%), связанное с широким распространением ряда опасных грибных, вирусных и микоплазменных заболеваний [4]. В решении этой проблемы важная роль отводится клональному микроразмножению. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки давать начало целому растительному организму под воздействием экзогенных факторов [8].

При массовом размножении сортов земляники требуется ежегодное введение эксплантов в культуру *in vitro*. Тем самым сокращается количество пассажей, снижается риск возникновения соматических мутаций, таких как многовершинность, появление уклоняющихся форм [3].

Процесс клонального микроразмножения начинается с изолирования эксплантов и получения хорошо растущей стерильной культуры. Основным фактором, влияющим на эффективность инициации культуры *in vitro*, можно считать период изоляции экспланта. Введение в культуру *in vitro* проводят в период активной вегетации растений (май–июнь) или осенью (сентябрь) [1, 6]. Ряд исследователей высказывает мнение, что сезон вычленения меристем не оказывает существенного влияния на способность растений к регенерации [5]. По мнению Высоцкого [2], вычленение можно проводить всесезонно, оптимальный срок – июнь–август. Леонова [7] считает лучшим сроком для изоляции конец лета – начало осени. По ее мнению, более позднее выделение эксплантов может стать причиной высокой инфицированности культуры.

Цель нашего исследования: выявить оптимальные сроки введения земляники в культуру *in vitro* и их влияние на жизнеспособность эксплантов.

Материалы и методики

Объект исследования – земляника садовая сортов Берегиня, Царица, Урожайная ЦГЛ, Фрида. Исследования проведены в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК в 2016...2017 годах. Эксплантами служили верхушечные почки вегетативных побегов и молодые розетки земляники. Заготовку исходного материала для зимнего введения проводили в конце октября. С не укорененных розеток удалялись все листья, корни отсутствовали или были зачаточными (рисунок 1). Подготовленный материал помещался в сухие пластиковые пакеты и хранился в холодильнике при температуре 2...3 градуса Цельсия. В таком виде розетки сохранялись 3,5...4 месяца. Введение в культуру проводили в феврале при активизации ростовых процессов, что выражалось в выдвигании листа из сердечка и образовании молодых корешков.



Рисунок 1 – Исходный материал земляники перед хранением

Заготовка для изоляции в летний и осенний периоды проходила с вегетирующих растений земляники. Лабораторные исследования проводились по существующим методическим рекомендациям Джигадло [5], Атрощенко [1]. Стерилизацию растительного материала осуществляли в два этапа. Розетки максимально очищали от кроющихся листьев, промывали в мыльном растворе, затем в течение 40 минут в проточной воде. Далее на 10 секунд исходный материал погружали в 70% спирт, затем 10 минут промывали стерильной дистиллированной водой.

На втором этапе для стерилизации земляники использовали 0,01% раствор мертиолат с экспозицией 10 минут и трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой по 10 минут.

Экспланты высаживали на агаризованную питательную среду с микро- и макроэлементами по Мурасиге-Скугу и регулятором роста 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л. Минеральную основу дополняли хелатом железа, витаминами: тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота – по 0,5 мг/л, аскорбиновой кислотой – 1 мг/л, глицином – 2 мг/л и сахарозой – 30 г/л, рН питательной среды – 5,5...5,8. Условия культивирования: температура 22...24°C, освещенность 2...3 тыс. люкс, продолжительность светового периода 16 часов/сутки. Экспланты вводили в культуру в количестве 30 штук.

Результаты исследований

Благодаря тому, что при выходе из покоя в позднезимний период (февраль) клетки меристем находятся в состоянии наиболее активного роста, экспланты земляники отличались большей регенерационной способностью, чем в другие периоды вегетации.

В среднем, при введении в культуру в феврале получили 77% жизнеспособных эксплантов, в августе – 65%, в июне и октябре только 45%. Количество инфицированных и погибших от некроза меристем в феврале составило 24,5%, в июне – 54,7%, августе – 35%, в конце вегетации (октябрь) возрастал до 55%.

При введении в культуру *in vitro* в позднезимний период экспланты всех сортов земляники характеризовались высокой регенерационной способностью (рисунок 2).

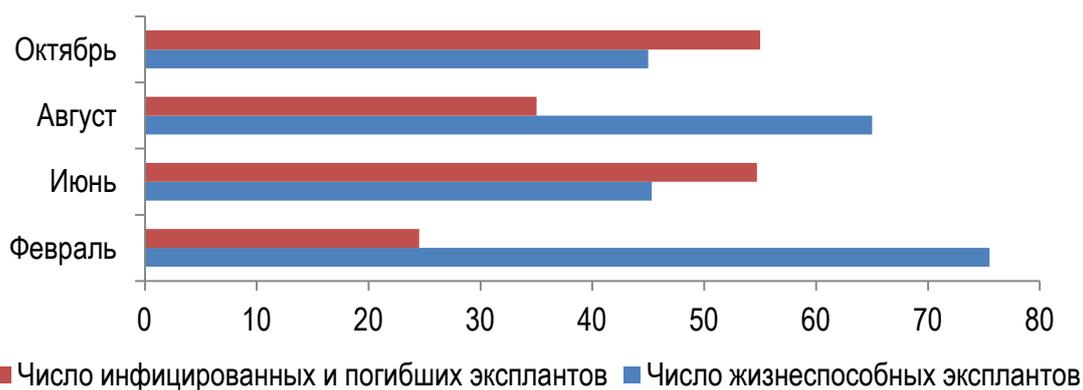


Рисунок 2 – Эффективность введения эксплантов земляники по срокам введения

Процент жизнеспособных эксплантов составил от 68% у сорта Царица до 86% у сорта Берегиня. Неразвившихся меристем практически не было (1...2%). Уровень инфицированности составил по сортам 13...32% от общего количества эксплантов. Наибольший процент инфицированных эксплантов был зафиксирован у сорта Царица – 32%. Жизнеспособные меристемы всех сортов, введенных в зимний период, развивались равномерно, были интенсивно зелеными, к концу первого пассажа высота многих достигала 15 мм. Окисление питательной среды отсутствовало. Благоприятными сроками изоляции и культивирования меристем сорта Царица оказались июнь и август со значительным снижением приживаемости эксплантов в октябре (до 35%), после прекращения вегетации. Количество неразвившихся и инфицированных меристем в осенний период также был значительным и составил соответственно 25 и 40% (таблица 1).

Таблица 1 – Зависимость эффективности инициации культуры *in vitro* земляники садовой от срока введения экспланта

Сроки введения	Показатели развития эксплантов, %	Сорта			
		Берегиня	Царица	Урожайная ЦГЛ	Фрида
Февраль	Жизнеспособные	86	68	70	82
	Инфицированные	13	32	29	16
	Некроз	1	0	1	2
Июнь	Жизнеспособные	54	86	24	17
	Инфицированные	15	4	27	47
	Некроз	31	10	49	36
Август	Жизнеспособные	54	76	-	-
	Инфицированные	41	13	-	-
	Некроз	5	11	-	-
Октябрь	Жизнеспособные	55	35	-	-
	Инфицированные	35	40	-	-
	Некроз	10	25	-	-

Примечание – исследование сроков введения для сортов Урожайная ЦГЛ и Фрида в августе и октябре будут продолжены

Для сорта Берегиня периоды изоляции в июне, августе, октябре характеризовались одинаковым количеством жизнеспособных эксплантов (54...55%) при высоком уровне инфицированности в конце лета и осенью (41 и 35 % соответственно) и большим количеством неразвившихся меристем в июне (31%).

Лучшим периодом для инициации земляники сорта Урожайная ЦГЛ из двух

исследуемых выделен февраль. Количество жизнеспособных эксплантов составило 70%. В июне наблюдался высокий уровень неразвившихся эксплантов (49%). Исследования по введению эксплантов в культуру *in vitro* с целью определения оптимальных периодов изоляции для сортов земляники будут продолжены.

Выводы

Сроки изоляции исходного материала являются важным аспектом микроклонального размножения земляники. Приживаемость эксплантов варьировала в пределах 45...77% в зависимости от срока изоляции. Исследуемые сорта земляники показали высокую жизнеспособность эксплантов при введении в культуру *in vitro* в позднелетний период после выхода исходного материала из состояния покоя. Процент регенерации составил в среднем 76,5% от общего числа введенных в культуру меристем. После прекращения вегетации (октябрь) количество инфицированных и неразвившихся эксплантов превышало жизнеспособные (55% и 45% соответственно).

Введение эксплантов в культуру *in vitro* в июне сопровождалось высоким уровнем неразвившихся меристем, что вызвало низкую приживаемость.

Таким образом, наиболее результативными можно считать введение земляники в позднелетний и позднелетний сроки вегетации.

Литература

1. Атрощенко Г.П., Костицын В.В., Наделюев А.А. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. СПб: СПбГАУ, 2001. 13 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т.26. С. 3-10.
3. Высоцкий В.А. Появление уклоняющихся форм при длительном культивировании ягодных растений *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т.45. С.54-57.
4. Белошапкина О.О. Биологические и технологические основы оздоровления посадочного материала земляники от вирусов М.: МСХА. 2005. 162с.
5. Джигадло, Е.Н. Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ВНИИСПК, 2005. 49 с.
6. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенов С.Э, Колбанова Е.В., Красинская Т.А., Волосевич Н.Н., Соловей О.В., Змушко А.А., Божидай Т.Н., Рундя А.П., Малиновская А.М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. / под общ. ред. Н.В. Кухарчик. Минск : Беларуская навука, 2016. 235 с.
7. Леонова Н.В. Оптимизация состава питательной среды при размножении земляники садовой *in vitro* // Вестник Брянской ГСХА. 2013. №1. С.45-48.
8. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков Н.Н., Ковалев В.М., Калашников Д.В. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 1998. 416 с.

References

1. Atroshchenko, G.P., Kostitsyn, V.V. & Nedelyuev, A.L. (2001). *Recommendations for production of healthy planting material of strawberry*. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg State Agrarian University. (In Russian).
2. Vysotskiy, V.A. (2011). Biotechnological methods in up-to-date gardening. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 3-10. (In Russian, English abstract).

3. Vysotskiy, V.A. (2016). The appearance of non true-type forms during long term *in vitro* cultivation of small fruit plants. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 45, 54-57. (In Russian, English abstract).
4. Beloshapkina, O.O. (2005). *Biological and technological fundamentals of improving the planting stock of strawberry from viruses*. Moscow: Moscow Timiryazev Agricultural Academy. (In Russian).
5. Dzhigadlo, E.N., Dzhigadlo, M.I., & Golyshkina, L.V. (2005). *Methodical recommendations for using biotechnological methods in work with fruit, berry and ornamental crops*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
6. Kukharchik, N.V., Kastritskaya, M.S., Semenas, S.E, Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovei, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P. & Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian).
7. Leonova, N.V. (2013). Optimization of the composition of nutrient media at reproduction of strawberry *in vitro*. *Vestnik of the Bryansk state agricultural academy*, 1, 45-48. (In Russian, English abstract).
8. Sheveluha, V.S., Kalashnikova, E.A., Degtyarev, S.V., Kochieva, E.Z., Prokofev, M.I., Novikov, N.N., Kovalev, V.M., & Kalashnikov, D.V. (1998). *Agricultural Biotechnology*. Moscow: Vysshaya Shkola. (In Russian).