

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ**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)*

Реферат. В статье представлены результаты клонального микроразмножения сортов земляники садовой селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ Нелли, Кемия, и сортов итальянской селекции Альба, Клери, Джоли. В ходе исследований установлены благоприятные сроки введения в культуру, подобрана оптимальная концентрация 6-Бензиламинопурина (6-БАП).

Изоляцию эксплантов начали проводить со второй декады июня по конец августа. Высокая приживаемость – 83,3-93,7 % – отмечена у сортов Альба, Нелли, Кемия при введении эксплантов в культуру *in vitro* во второй декаде августа. У сортов Джоли и Клери приживаемость составила в этот период 65-74 % (указанный период отмечен как наиболее благоприятный). 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 требуется, так как корни у растений-регенерантов формируются самостоятельно. У сорта Нелли процент корнеобразования составил 95 %, у сорта Кемия – 98 %, у сортов Альба, Клери и Джоли – 82-93 %.

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

Summary. This article presents the results of clonal micropropagation of garden strawberry varieties of FSBSI NCFSCHVW such as Nelly, Kemiya, and Italian varieties such as Alba, Clery, and Joly. 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 from the second decade of June to the end of August. A high survival rate of 83.3-93.7% was observed in varieties Alba, Nelly, Kemiya when explants were introduced into *in vitro* culture in the second decade of August. The varieties Jolie and Clery have a survival rate of 65-74 % in this period, also it is the most favorable period. At the stage of proliferation, 6-BAP (0; 0.5; 1.0 and 1.5 mg/L) was added to the nutrient medium; it was found that it is reasonable to introduce 6-BAP in an amount of 1, 0 mg/l into the medium to increase the efficiency of micropropagation of these strawberry varieties. The number of vitrified shoots increases with an increase in the concentration of 6-BAP to 1.5 mg/l. In general, the assessment of the multiplication potential of garden strawberry varieties *in vitro* showed that the Nelly variety has a high multiplication potential. The number of shoots reached 8.7-12.6 pieces per explant, in varieties Kemiya, Joly, Alba and Clery 9.2-10.6 pieces, by the third subculturing with the addition of 6-BAP (1.0 mg/l). The addition of auxins to the medium is not required at the stage of rhizogenesis of the studied varieties, given that the roots of regenerated plants form independently. The percentage of root formation was 95 % in the Nelly variety; 98 % – in the Kemiya variety. Alba, Clery and Jolie have 82-93 %.

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

Введение. Высокие вкусовые качества, аромат, антиоксидантная способность, обусловленная высоким уровнем антоцианов, высокое содержание витаминов и других пита-

тельных свойств в землянике садовой сделали ее наиболее потребляемой ягодной культурой [1]. Область выращивания земляники значительно расширилось, и эта ягода стала одной из самых культивируемых культур во всем мире. Расширяемые площади культуры требуют большого количества посадочного материала земляники высокого качества [2]. Задача усложняется широким распространением патогенных организмов (вирусы, фитоплазмы, грибы, нематоды), которые передаются в процессе вегетативного размножения от маточных растений [3].

Применение метода клонального микроразмножения *in vitro* в совокупности с методами оздоровления растений обеспечивает альтернативную возможность увеличения производства посадочного материала земляники, свободного от вредоносных организмов [4, 5].

В целом методика клонального микроразмножения земляники садовой *in vitro* достаточно отработана и используется уже на протяжении многих лет [6-13]. Несмотря на это, требуется постоянное совершенствование технологии, связанное с меняющимся сортиментом земляники садовой, генотипические особенности которых при выращивании в условиях *in vitro* еще не известны. Кроме того, меняется, состав микробных сообществ, климатические условия.

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

Объекты и методы исследований. Исследования проводились в лаборатории вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ в 2019-2020 гг. Объекты исследований: земляника садовая сортов селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ Нелли, Кемия и сорта итальянской селекции Альба, Клери, Джоли. В исследовании была использована общепринятая методика размножения растений земляники *in vitro* [14].

Ниже приведена краткая характеристика изучаемых сортов.

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 [12].

Сорт Альба – один из наиболее раннеспелых, крупноплодных и продуктивных, урожайность – 80 ц/га. Размер ягод крупный, средняя масса 25-30 г, максимальная – до 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 высокой урожайностью (до 290 ц/га). С одного куста получают в среднем 1-1,5 кг плодов, иногда и до 2 кг.

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 [13].

В качестве исходного материала были использованы экспланты из растущих розеток земляники.

Стерилизацию растительного материала проводили по схеме: предварительная подготовка и основная обработка. Подготовленные сегменты промывали под проточной водопроводной водой в течение 30 минут. 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 про-

бирки 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). На этапе введения: безгормональная среда МС, на этапе пролиферации с добавлением 6-БАП (0,5; 1,0; 1,5 мг/л), на этапе укоренения среда ½ MS с 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 и выделения фенолов и т.д. [3]. В ходе работы изучались особенности размножения 5 сортов земляники. Изоляцию эксплантов земляники в культуру *in vitro*, проводили в три срока: июнь, июль и август (рис. 1).

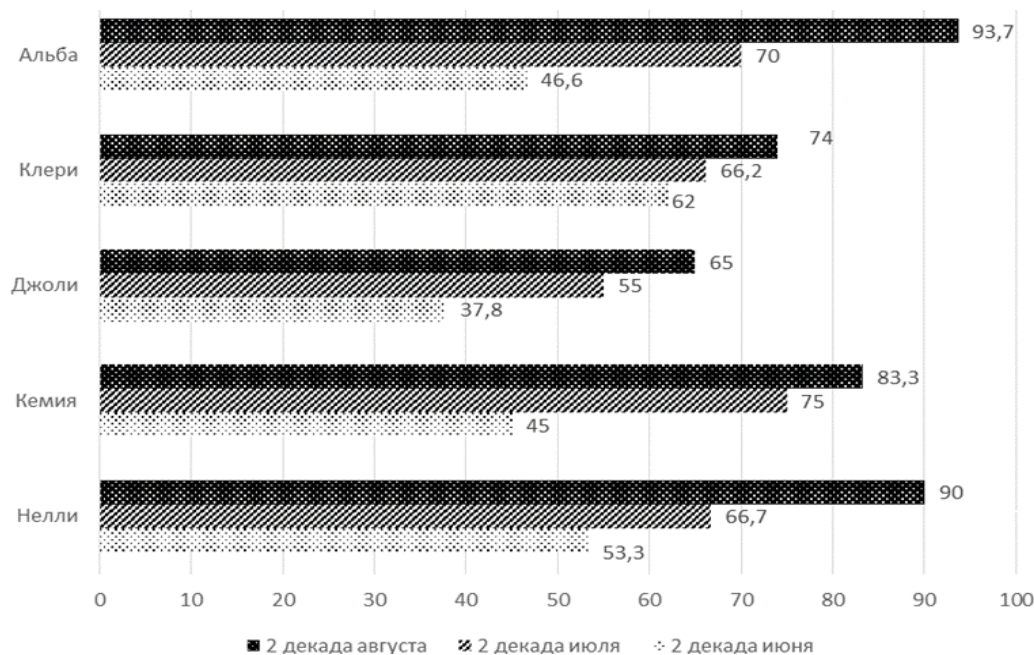


Рис. 1. Эффективность введения эксплантов земляники *in vitro* по срокам инициации

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 декаде 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 целью определения оптимального количества цитокинина для качественного побегообразования, 6-БАП добавляли в нескольких вариантах. Максимальное количество побегов, в среднем, образуется к третьему пассажу 9,6-12,7 шт. на среде с 6-БАП 1,5 мг/л (рис. 2). Однако, в этом варианте, хотя побегов образуется много, большая их часть были обводнённые (а) или мелкие (б) (рис. 3)

Рис. 2. Коэффициенты размножения земляники в зависимости от концентрации 6-БАП и пассажа.



(а) сорта Альба



(б) сорт Кемия

Рис. 3. Экспланты земляники садовой после процесса мультипликации на среде с концентрацией 6-БАП 1,5 мг/л

Проведенный анализ показал, что наиболее качественные побеги земляники получают на средах при добавлении 6-БАП в количестве 0,5-1,0 мг/л.

На среде с 6-БАП 0,5 мг/л образуется от 7,4-8,1 побега 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.

Помимо концентрации цитокинина и количества субкультивирований на уровень пролиферации побегов в условиях *in vitro* оказывают влияние и сортовые особенности земляники. 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, 14].

По данным авторов изучаемых сортов (В.В. Яковенко и др.), сорт Нелли в условиях маточника имеет высокую усобиобразовательную 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 такой безгормональной среде растения были готовы к пересадке в нестерильные условия (рис. 4). У сорта Нелли процент корнеобразования составил 95 %, у сорта Кемия – 98 %. У сорта Альба, Клери и Джоли – 82-93 %.

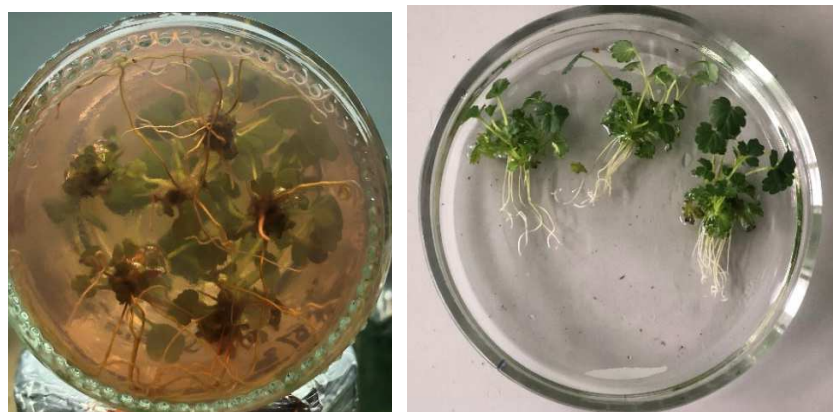


Рис. 4. Корнеобразование земляники на безгормональной питательной среде МС, сорт Нелли

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. 5 а).



Рис. 5. Адаптация микрорастений земляники сорта Джоли, 3 недели

Через 1-1,5 месяца адаптированные растения пересаживали в емкости объемом 150-200 мл (рис. 5 б). Еще через 2 месяца доращивания в теплице у растений земляники 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 адаптировать в субстрате, состоящем из почвенно-торфяной смеси, перлита и вермикулита в соотношении 3:1:1.

Литература

1. <https://www.freshplaza.com/article/2196666/global-consumption-of-strawberries-increases-annually/>
2. Козий И. Производство ягод в России в цифрах // Ягоды России. № 1. 2020. С. 3-4.
3. 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; 7(3): 70-742 (2018).
4. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Орлова Н.Ю., Шахов В.В. Микроклональное размножение земляники садовой // Селекция и сортоведение садовых культур. 2017. Т. 4. № 1-2. С. 93-96.
5. Moradi, K., Otroshy, M. and Azimi, M.R Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures // Journal of Agricultural Technology. Vol. 7(6).p. 1755-1763. (2011).
6. 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, V. 47 (2), 2564-2676. (2017).
7. Ara 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 (IJBS). Vol. 2, No. 10(1), p. 86-92(2012).
8. Rattanpal, Harinder& Gill, Manav&Sangwan, Anil. (2011). Micropropagation of strawberry through meristem culture. ActaHorticulturae. 890. 149-153. 10.17660/ActaHortic..890.19. (2011).
9. Ionela, Rusea&Popescu, Aurel& Valentina, Isac& Dorel, Hoza. MICROPROPAGATION OF STRAWBERRY CV. MAGIC. Annals of the University of Craiova. XXIV (LX). 218-223. (2020).
10. Aarifa Jan, K. M. Bhat, Bhat, S. J. A., M. A. Mir1, M. A. Bhat, Imtiyaz A., Wani and J. A. Rather. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. Article Number - 6A1400026791 Vol.12(39), pp. 5749-5753, (2013).
11. Jhajhra, Sunita & Dashora, L.K. & Singh, Jitendra & Bhatnagar, Prerak & Kumar, Ashok & Arya, C.K.. In-vitro Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7. 3030-3035. 10.20546/ijcmas.2018.710.353. (2018).
12. Яковенко В.В., Лапшин В.И. Сорты земляники для экологического изучения в зоне Северного Кавказа. // Научные труды СКФНЦСВВ. Том 14. Краснодар: СКФНЦСВВ, 2018. С. 147-154.
13. <https://kubansad.ru/en/content/zemlyanika/>
14. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения земляники (методические рекомендации). Воронеж: Кварта, 2012. 20 с.