

УДК 633.79:58.085:633

**ВВЕДЕНИЕ ЭКСПЛАНТОВ НОВЫХ
СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ
В КУЛЬТУРУ IN VITRO**

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии
Leobun@mail.ru

Беседина Екатерина Николаевна
мл. научный сотрудник
лаборатории вирусологии

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник
лаборатории вирусологии

*Федеральное Государственное
бюджетное научное учреждение
"Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства",
Краснодар, Россия*

Клональное микроразмножение широко используется в селекции плодовых и ягодных культур для размножения небольшого числа генотипов и для быстрого получения большого количества безвирусного материала. Объектом исследования служили апексы земляники размером от 1 до 3 мм и меристемы (0,3 мм) сортов Клери, Азия, Альба, Мармолада. В статье выявлено влияние некоторых факторов культивирования земляники на этапе введения эксплантов в культуру in vitro. В результате проведённых исследований установлено, что ввод в культуру in vitro апексов размером 3 мм с последующим вычленением из них меристем размером 0,3 мм, повышает приживаемость эксплантов (меристем 0,3 мм) более чем в 2 раза (с 25% до 59% в среднем). Показано, что эффективность клонального микроразмножения земляники повышается на питательных средах, содержащих комплекс 6-БАП с ИУК в соотношении 1:0,1. Указанная среда обеспечивает высокий коэффициент размножения

UDC 633.79:58.085:633

**INTRODUCTION OF PLANTLETS
OF NEW STRAWBERRY
VARIETIES IN VITRO CULTURE**

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology
Leobun@mail.ru

Besedina Catherine
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

Kostyuk Marina
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

*Federal State Budget Scientific
Organization "North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

Clonal micro reproduction is widely used in the breeding of fruit and berry crops for reproduction of a small number of genotypes and for a fast receiving a large amount of virus-free material. The object of research is the strawberry apexes from 1 to 3 mm in size and the meristems (0,3 mm) of Klery, Asia, Alba and Marmolada varieties. The influence of some factors of strawberry cultivation at a stage of explants introduction in vitro is revealed in the article. As a result of the carried out research it is established that input in vitro of apexes of 3 mm in size, with the subsequent exarticulation from them of meristems of 0,3 mm in size, increases of explants survival (meristems of 0,3 mm) more than twice (from 25% to 59% on average). It is shown that the efficiency of clonal strawberry micro reproduction is increased on the nutrient mediums containing a complex 6-BAS with IAA in the ratio 1:0,1. This medium provides the high coefficient of reproduction

в сочетании с высоким качеством регенерированных микропобегов. Также установлено, что состав среды с комплексом 6-БАП и дитиобиотином вызывает более интенсивный рост побегов и активизирует синтез хлорофилла. Затемнение эксплантов в течение 8 суток в 1-м пассаже приводит к увеличению коэффициента размножения эксплантов земляники сорта Азия с 22,6 до 64,3 в варианте среды, содержащей 6-БАП без ИУК, и к увеличению коэффициента размножения с 9,4 до 16,0 у сорта земляники Альба. При добавлении в среду 0,1 мг/л ИУК коэффициент размножения увеличивается с 33,2 до 40,0 у сорта земляники Азия и с 12,6 до 16,4 у сорта Альба.

Ключевые слова: ЗЕМЛЯНИКА, ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO, ЭКСПЛАНТЫ, АПЕКСЫ, МЕРИСТЕМЫ, ЗАТЕМНЕНИЕ

together with high quality of regenerated micro shoots. It is also established that the structure of medium with complex of 6-BAS and detiobiotine causes more intensive growth of shoots and activates of chlorophyll synthesis. The darkening of explants for 8 days at the 1 st passage leads to increase in coefficient of reproduction of Asia strawberry explants from 22,6 to 64,3 at the medium containing 6-BAS without IAA and to increase in coefficient of reproduction from 9,4 to 16,0 of Alba strawberry. In addition in the medium of 0,1 mg/l of IAA the coefficient of reproduction increases from 33,2 to 40,0 at Asia strawberry and from 12,6 to 16,4 at Alba strawberry.

Keywords: STRAWBERRY, INTRODUCTION IN VITRO CULTURE, PLANTLETS, APEXES, MERISTEMS, DARKNESS

Введение. В селекции плодовых и ягодных культур для поддержания и размножения небольшого числа отдельных генотипов или новых перспективных сортов широко используется клональное микроразмножение - получение *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений [1-3]. Преимуществами данного способа размножения растений перед существующими традиционными способами являются: получение генетически однородного посадочного материала, оздоровление растений, высокий коэффициент размножения, сокращение продолжительности селекционного процесса, размножение трудноразмножаемых растений, ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития, возможность работы в лабораториях круглый год и планирование выпуска растений к определённому сроку [4-8].

У размножения растений *in vitro* существуют и недостатки. Наиболее распространённые из них – это слабая приживаемость эксплантов на этапе интродукции биоматериала в культуру *in vitro* и малые коэффициенты размножения (пролиферации) эксплантов *in vitro* [9].

Целью настоящего исследования является поиск новых подходов в совершенствовании методики оздоровления и клонального микроразмножения земляники садовой.

Объекты и методы исследований. Материалом для исследования служили апексы земляники размером от 1 до 3 мм и меристемы (0,3 мм), взятые с быстро растущих усов земляники первого порядка (от маточного куста) сортов Клери, Азия, Альба, Мармолада. Осуществлялась промывка апексов в проточной воде (1-1,5 часа). Стерилизация проводилась в два этапа: 1. Бенлат (2%) – 45 секунд. 2. Сулема (0,1%) – 7 минут или гипохлорид кальция (3%) – 15 минут. Отмывка после первого этапа длилась 5 минут, после второго этапа – 20 минут в стерильной дистиллированной воде. Все работы по культивированию эксплантов земляники *in vitro*, а также состав питательной среды соответствовали современным методикам [10, 11, 12]. Среда включала макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу (1962), аскорбиновую кислоту – 1 мг/л, витамины В1, В6 и РР по 0,5 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, глюкозу – 24 г и агар-агар 0,7%.

Обсуждение результатов. Ввод в культуру *in vitro* меристем земляники размером 0,3 мм показал низкую их приживаемость (29%). С целью увеличения приживаемости меристем земляники и ускорения темпов роста и развития эксплантатов выполнено исследование по вводу в культуру апексов размером 3 мм с последующим вычленением из них меристем размером 0,3 мм (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что приживаемость меристем земляники размером 0,3 мм, вычлененных из 3 мм апексов, увеличилась более чем в 2 раза. Причины повышения процента приживаемости эксплантов: привыкание к культивированию, снижение уровня фенолов и отсутствие воздействия стерилизатора непосредственно перед вычленением меристем.

Таблица 1 – Влияние предварительного культивирования источника эксплантата на приживаемость меристем земляники

Сорт	Меристемы 0,3 мм, взятые из растущих усов			Меристемы 0,3 мм, взятые из культивируемых in vitro растений		
	Количество		% прижи- ваемости	Количество		% прижи- ваемости
	Посаж.	Приж.		Посаж.	Приж.	
Клери	40	16	40	30	21	70
Азия	40	17	35	30	20	67
Альба	30	7	23	30	14	47
Мармолада	30	5	17	30	16	53
	общий		29	общий		59

Данный способ ввода меристем земляники в культуру in vitro позволяет получить больше оздоровленных растений от одного исходного, что ценно при оздоровлении выделившегося селекционного материала.

Таблица 2 – Коэффициент размножения in vitro земляники сорта Мармолада в зависимости от содержания ФАВ в питательной среде

Вариант опыта	Кол-во мериклонов в варианте	Коэффициент размножения (средн.)	Кол-во микро-растений более 3 см	Некроз основания эксплантатов (%)	Хлороз в баллах
1. Контроль – 0,8 мг/л 6-БАП	10	9,4	0,33	44	0,5
2. 1,2 мг/л 6-БАП	10	8,9	0,39	51	0,5
3. 2,0 мг/л 6-БАП	10	4,2	0,07	83	3,5
4. 0,8 мг/л 6-БАП + 0,08 мг/л ИУК	10	12,6	1,0	11	0,5
5. 0,8 мг/л 6-БАП + 0,08 мг/л ИМК	10	3,6	0,23	100	3,5
6. 0,8 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л де-тиобиотина	10	11,0	1,37	10	0,0
7. 1,0 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИУК	10	14,7	0,95	8	0,5

Для повышения коэффициента размножения земляники садовой *in vitro* на примере сорта Мармалада изучена активность следующих физиологически активных веществ (ФАВ): 6-БАП, ИУК, ИМК, дитиобиотин в различных сочетаниях. Результаты представлены в табл. 2.

Из табл. 2 следует, что наиболее эффективным оказалось сочетание в среде культивирования 6-БАП с ИУК в соотношении 1:0,1, оно обеспечивает превосходство экспланта по важным показателям развития. Сочетание 6-БАП с дитиобиотином вызывает более интенсивный рост побегов. В этом варианте, кроме того, растения были интенсивнее окрашены (рис.).



Рис. 1. Регенерированные *in vitro* микрорастения земляники садовой

Кроме стимуляторов роста для повышения эффективности размножения эксплантов земляники *in vitro* был апробирован вариант культивирования с выдерживанием апексов в 1 пассаже 8 суток без освещения, при температуре 27 °С (вариант 2). Контроль (вариант 1) – стандартный режим культивирования при освещенности 5 тысяч люксов, температуре 24 °С и продолжительности дня 16 часов. После затенения все апексы культивировали в условиях режима «контроль». Подсчеты проводились в конце второго пассажа. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Влияние временного затенения в процессе культивирования на повышение коэффициента размножения земляники *in vitro*

Сорт	Вариант	Варианты среды (ФАВ)	Кол-во клонов (апексов)	Кол-во экспл. к концу II пассажа	Коэфф. размножения
Азия	1. Контроль	+0,8 мг/л 6 БАП (I)	16	76	22,6
		+0,8 мг/л 6 БАП + 0,1 мг/л ИУК (II)	15	54	37,2
	2. Затенение	I	8	62	64,3
		II	10	50	40
Альба	1. Контроль	I	10		9,4
		II	10		12,6
	2. Затенение	I	12		16,0
		II	8		16,4

Показано, что при культивировании эксплантов в 1 пассаже без освещения 8 суток коэффициент размножения резко увеличивается с 22,6 до 64,3 в варианте среды, содержащей 6-БАП без ИУК, у сорта Азия и с 9,4 до 16,0 у сорта Альба. При добавлении в среду 0,1 мг/л ИУК различие было меньше (с 33,2 до 40,0 у сорта Азия и с 12,6 до 16,4 у сорта Альба).

Выводы. Установлено, что ввод в культуру *in vitro* апексов земляники размером 3 мм с последующим вычленением из них меристем размером 0,3 мм повышает приживаемость эксплантов (меристем 0,3 мм) более чем в 2 раза (с 25% до 59% в среднем).

Эффективность клонального микроразмножения повышается на питательных средах, содержащих 6-БАП и ИУК в соотношении 1:0,1, обеспечивающих высокий коэффициент размножения в сочетании с высоким качеством регенерированных микропобегов. Комплекс 6-БАП с детобиотином приводит к более интенсивному росту и синтезу хлорофилла.

Затемнение эксплантов в течение 8 суток в 1-м пассаже приводит к увеличению коэффициента размножения с 22,6 до 64,3 в варианте среды, содержащей 6-БАП без ИУК, сорта Азия и с 9,4 до 16,0 – сорта Альба. При добавлении в среду 0,1 мг/л ИУК коэффициент размножения увеличивается с 33,2 до 40,0 у земляники сорта Азия и с 12,6 до 16,4 – у сорта Альба.

Литература

1. Луговской, А.П. Технология комбинационной и клоновой селекции сортов плодовых культур / А.П. Луговской, С.Н. Артюх, Е.М. Алехина [и др.] // Сб.: Интенсивные технологии возделывания плодовых культур.– Краснодар: СКЗНИИСиВ, – 2004. – С. 127-203.
2. Бунцевич, Л.Л. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / Л.Л. Бунцевич, М.В. Захарова, М.А. Костюк, Ю.П. Данилюк, Р.С. Захарченко // Проблемы интенсивного садоводства (матер. расширенного заседания Ученого совета, посвященного 100-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук Трусевица Гавриила Владимировича).– Краснодар: СКЗНИИСиВ. – 2010. – С. 191-193.
3. Медведева, Н.И. Использование методов *in vitro* в селекции плодовых и цветочно-декоративных культур / Н.И. Медведева, Л.Л. Бунцевич, В.С. Мохно // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012.– №15(3). – С. 1-11.–
Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/12/03/01.pdf>.
4. Debnath, S.C. Strawberry Culture In Vitro: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology/ Samir C. Debnath, Jaime A. Teixeira da Silva // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology . – 2007. – P.1-12.
5. Ashrafuzzaman, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture/ M. Ashrafuzzaman, S.M. Faisal, D. Yadav, D. Khanam, F. Raihan // Bangladesh J. Agril. Res. 38(3). - 2013. – P. 467-472.
6. Nakamura, M. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus /Masayuki Nakamura, You Takeuchi, Kazuhiko Miyanaga, Minoru Seki, Shintaro Furusaki // Biotechnology Letters. – V. 21. - 1999. – P. 695-699.
7. Adak, N. Studies on determining the appropriate hormone concentrations on meristem culture of some strawberry (*Fragaria* spp.) cultivars / Nafiye Adak // Journal of Food, Agriculture & Environment. – Vol. 9 (2). – 2011. – P. 341-344.
8. El Hamdouni, E.M. Micropropagation des cultivars ‘Chandler’ et ‘Tudla’ de Fraisier (*Fragaria x ananassa* Duch.) / E.M. El Hamdouni, A. Lamarti, A. Badoc // Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. – 2000. – V. 139. – P. 71-90.
9. Егоров, Е.А. Проблемы производства безвирусного посадочного материала плодовых культур на юге России / Е.А. Егоров, А.П. Луговской, Л.Л. Бунцевич / Сб.: Садоводство и виноградарство 21 века (матер. междунар. науч.-практ. конф.). – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 1999.– С. 213-223.
10. Sonmez, D.A., Kafkas, E. Development of *in vitro* methods for regeneration of strawberry ‘Festival’ variety (*Fragaria x annanasa* Duch.) Current Opinion in Biotechnology, V. 22, Supplement 1, September 2011, P. 138
11. Biswas, M.K. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits / M.K. Biswas, M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam, M. Hossain // Scientia Horticulturae. - V. 122. - 2009. – P. 409-416.
12. Бунцевич, Л.Л. Разработка составов питательных сред для интродукции в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк, М.В. Макаркина // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2014. – № 28 (4). – С. 46-55. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/14/04/06.pdf>.

References

1. Lugovskoy, A.P. Tehnologiya kombinatsionnoy i klonovoy selektsii sortov plodovyh kul'tur / A.P. Lugovskoy, S.N. Artyuh, E.M. Alehina, S.N. Scheglov [i dr.] // Sb.: Intensivnye tehnologii vozdeleyvaniya plodovyh kul'tur.– Krasnodar: SKZNIISiV, – 2004. – S. 127-203.
2. Buntsevich, L.L. Virusnye i virusopodobnye bolezni plodovyh kul'tur i ozdorovlenie rasteniy sposobom klonal'nogo mikrorazmnozheniya in vitro / L.L. Buntsevich, M.V. Zaharova, M.A. Kostyuk, Yu.P. Danilyuk, R.S. Zaharchenko // Problemy intensivnogo sadovodstva (mater. rasshirennogo zasedaniya Uchenogo soveta, posvyaschennogo 100-letiyu so dnya rozhdeniya doktora sel'skohozyaystvennyh nauk Trusevicha Gavriila Vladimirovicha).– Krasnodar: SKZNIISiV. – 2010. – S. 191-193.
3. Medvedeva, N.I. Ispol'zovanie metodov in vitro v selektsii plodovyh i tsvetochno-dekorativnyh kul'tur / N.I. Medvedeva, L.L. Buntsevich, V.S. Mohno // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs]. – Krasnodar: SKZNIISiV, 2012.– №15(3). – S. 1-11.–
Rezhim dostupa: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/12/03/01.pdf>.
4. Debnath, S.C. Strawberry Culture In Vitro: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology/ Samir C. Debnath, Jaime A. Teixeira da Silva // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology . – 2007. – P.1-12.
5. Ashrafuzzaman, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture/ M. Ashrafuzzaman, S.M. Faisal, D. Yadav, D. Khanam, F. Raihan // Bangladesh J. Agril. Res. 38(3). – 2013. – P. 467-472.
6. Nakamura, M. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus /Masayuki Nakamura, You Takeuchi, Kazuhiko Miyanaga, Minoru Seki, Shintaro Furusaki // Biotechnology Letters. – V. 21. - 1999. – P. 695-699.
7. Adak, N. Studies on determining the appropriate hormone concentrations on meristem culture of some strawberry (*Fragaria* spp.) cultivars / Nafiye Adak // Journal of Food, Agriculture & Environment. – Vol. 9 (2). – 2011. – P. 341-344.
8. El Hamdouni, E.M. Micropropagation des cultivars 'Chandler' et 'Tudla' de Fraisier (*Fragaria x ananassa* Duch.) / E.M. El Hamdouni, A. Lamarti, A. Badoc // Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. – 2000. – V. 139. – P. 71-90.
9. Egorov, E.A. Problemy proizvodstva bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyh kul'tur na yuge Rossii / E.A. Egorov, A.P. Lugovskoy, L.L. Buntsevich / Sb.: Sadovodstvo i vinogradarstvo 21 veka (mater. mezhdunar. nauch.-prakt. konf.). – Krasnodar: SKZNIISiV, 1999. – S. 213-223.
10. Sonmez, D.A., Kafkas, E. Development of in vitro methods for regeneration of strawberry 'Festival' variety (*Fragaria x annanasa* Duch.) Current Opinion in Biotechnology, V. 22, Supplement 1, September 2011, P. 138
11. Biswas, M.K. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits / M.K. Biswas, M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam, M. Hossain // Scientia Horticulturae. - V. 122. - 2009. – P. 409-416.
12. Buntsevich, L.L. Razrabotka sostavov pitatel'nyh sred dlya introduktsii v kul'turu in vitro eksplantov sortov maliny i kryzhovnika / L.L. Buntsevich, E.N. Besedina, M.A. Kostyuk, M.V. Makarkina // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs]. – Krasnodar: SKZNIISiV, 2014. – № 28 (4). – S. 46-55. – Rezhim dostupa: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/14/04/06.pdf>.