

УДК 581.16:582.734.4

## Микроразмножение земляники садовой сорта Московский деликатес

И.Д. Бородулина<sup>1</sup>, Т.В. Плаксина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко Россельхозакадемии (Барнаул, Россия)

## Micropropagation of Moscow Delicatessen Strawberry Cultivar

I.D. Borodulina<sup>1</sup>, T.V. Plaksina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Altai State University (Barnaul, Russia)

<sup>2</sup> The Lisavenko Siberian Research Institute of Horticulture, RAAS (Barnaul, Russia)

Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) — одна из самых популярных ягодных культур, выращиваемых в Северном полушарии умеренной зоны. Эту культуру традиционно размножают вегетативно с помощью усов. Для ремонтантной земляники такой способ размножения малоэффективен, так как за период вегетации она образует 1–2 уса на одну розетку. Альтернативным методом вегетативного размножения является размножение *in vitro*.

Изучены особенности клонального микроразмножения земляники садовой ремонтантного сорта Московский деликатес. В качестве объекта исследования использовали три клональных генотипа сорта — гМД1, гМД2 и гМД3. Для размножения брали микророзетки из длительно пассируемой культуры земляники садовой данного сорта, полученной из апикальной меристемы. Основной питательной средой была агаризованная среда по прописи Мурасиге — Скуга, дополненная регуляторами роста.

Изучено влияние концентрации 6-бензиламинопурина (6-БАП) на коэффициент размножения и  $\beta$ -индолилмасляной кислоты ( $\beta$ -ИМК) на укоренение трех клональных генотипов земляники садовой сорта Московский деликатес в культуре *in vitro*. Определены оптимально низкие концентрации 6-бензиламинопурина (0,5–2,0 мкМ) на этапе собственно размножения и  $\beta$ -индолилмасляной кислоты (0,5–3,0 мкМ) на этапе укоренения.

**Ключевые слова:** генотип, земляника садовая, концентрация, 6-бензиламинопурин (БАП), коэффициент размножения, укоренение *in vitro*, ризогенез,  $\beta$ -индолилмасляная кислота (ИМК).

DOI 10.14258/izvasu(2014)3.2-03

Земляника садовая — одна из самых популярных ягодных культур, выращиваемых в Северном полушарии умеренной полосы [1, с. 3]. Потребность в ее по-

пине strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) is one of the most popular fruit crops grown in the temperate zone of the Northern hemisphere. This culture is propagated traditionally vegetative by means of rosettes. For remontant varieties this method is less effective because plants form only 1–2 rosettes per plant during the growing season. The micropropagation *in vitro* is the alternative method of reproduction to vegetative propagation.

The peculiarities of clonal micropropagation pine strawberry have been studied. Three clonal genotypes — gMD1, gMD2 and gMD3 of Moscow Delicatessen cultivar were the object of investigation. For propagation the microrosettes long time strawberry subculture *in vitro* were taken. Microrosettes were cultivated in agar and sucrose nutrient medium Murashige — Skoog supplemented with growth regulators.

The influence of 6-benzylaminopurine (6 BAP) concentration on the coefficient of multiplication as well as the influence of  $\beta$ -indolebutyric acid (IBA) on rooting formation of used strawberry Moscow Delicatessen genotypes *in vitro* culture have been studied. The optimally low concentrations of 6-benzylaminopurine (0,5–2,0  $\mu$ M) on the multipropagation stage and the same for  $\beta$ -indolebutyric acid (0,5–3,0  $\mu$ M) on the rooting stage have been determined.

**Key words:** genotype, pine strawberry, 6-benzylaminopurine (BAP) concentration, the coefficient of multiplication, *in vitro* rooting,  $\beta$ -indolebutyric acid (IBA).

садовом материале большая, но удовлетворена она еще не полностью. Эту культуру традиционно размножают вегетативно с помощью усов. Для ремон-

тантной земляники такой способ размножения малоэффективен, так как за период вегетации она образует 1–2 уса на одну розетку. Это связано с особенностью строения розетки и заложения вегетативных почек у ремонтантной земляники. Кроме того, при размножении земляники традиционно передаются многие болезни и, как следствие, снижаются характеристики сорта [2, с. 22].

Альтернативным методом вегетативного размножения растений является размножение *in vitro* [2, с. 12; 3, с. 56]. Биотехнологические подходы и приемы способствуют расширению сортимента, ускоренному внедрению новых гибридов ремонтантных сортов земляники, период плодоношения которых значительно продолжительнее, чем традиционных сортов, что особенно актуально для сибирского региона.

Несмотря на большое число работ по вопросам регенерации и размножения *in vitro* земляники садовой [4, с. 3; 5, с. 23], на сегодняшний день остается актуальной модификация основной методики, так как каждый сорт предъявляет свои специфические требования к условиям культивирования *in vitro*.

Цель исследования — изучение особенностей клонального микроразмножения земляники садовой сорта Московский деликатес.

В задачи исследования входило:

– изучить влияние 6-бензиламинопурина (БАП) на показатели роста и развития земляники садовой в условиях *in vitro*;

– определить оптимальные концентрации  $\beta$ -индолмасляной кислоты (ИМК) на этапе укоренения.

Работа проводилась в Алтайском государственном университете, в лаборатории биотехнологии растений Южно-Сибирского ботанического сада и в НИИ садоводства Сибири Россельхозакадемии, в лаборатории биотехнологии и цитологии растений.

**Объекты и методы.** Земляника садовая (*Fragaria × ananassa* Duch.) относится к семейству *Rosaceae* (розоцветные). *Fragaria × ananassa* представляет собой естественный гибрид *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. и *Fragaria virginiana* (Duch.). В качестве объекта исследования использовали три клональных генотипа сорта Московский делика-

тес — гМД1, гМД2 и гМД3. Для размножения брали микророзетки из длительно пассируемой культуры земляники садовой сорта Московский деликатес, полученной из апикальной меристемы.

В качестве основной питательной среды применяли агаризованную среду с минеральным составом по прописи Мурасиге — Скуга (МС), дополненную регуляторами роста БАП (0,5; 1; 2; 4; 5 и 10 мкМ) на этапе собственно размножения и ИМК (0,5; 1; 3 и 5 мкМ) на этапе укоренения. В качестве контроля на этапе укоренения использовали безгормональную среду ½ МС.

Флаконы с растениями помещали в культуральную комнату с фотопериодом 16 ч день / 8 ч ночь. В качестве источника света использовали лампы ЛД-40. Интенсивность освещения составляла от 3 до 10 клк. В культуральной комнате с кондиционированным воздухом поддерживали температуру  $25 \pm 2$  °С и влажность воздуха 70%.

Учет и наблюдение проводили в конце каждого пассажа, через 20–25 суток. На этапе собственно размножения оценивали следующие показатели: количество развившихся побегов у одного экспланта (шт./экспл.), длина побега (см), количество листьев (шт.). На этапе корнеобразования оценивали частоту укоренения (%), количество корней у одного регенеранта (шт.), среднюю длину корней (мм), наличие каллуса (+, –).

Все эксперименты проводились в 2–3 повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты исследования и обсуждение.** Эффективность использования БАП в качестве регулятора роста цитокининовой природы для размножения сортов и форм земляники садовой подтверждена рядом исследований [3, с. 57; 6, с. 6, 9]. Изучение влияния БАП на коэффициент размножения генотипов земляники (табл. 1) показало, что более интенсивно регенерационные процессы происходили при использовании низких концентраций цитокинина (0,5–2 мкМ) — на микророзетках развивались 1,5–2,1 пазушные почки.

Таблица 1

Влияние концентрации 6-бензиламинопурина на коэффициент размножения земляники садовой сорта Московский деликатес ( $n = 15$ )

| Концентрация, мкМ | Коэффициент размножения, шт./экспл. |         |         |
|-------------------|-------------------------------------|---------|---------|
|                   | гМД1                                | гМД2    | гМД3    |
| 0,5               | 2,1±0,3                             | 1,7±0,4 | 1,8±0,4 |
| 1,0               | 2,5±0,4                             | 2,1±0,3 | 2,1±0,3 |
| 2,0               | 2,2±0,2                             | 1,7±0,4 | 1,8±0,4 |
| 5,0               | 1,5±0,3                             | 1,3±0,1 | 1,1±0,2 |
| 10,0              | 0                                   | 0       | 0       |

## Микроразмножение земляники садовой сорта Московский деликатес

Повышение концентрации БАП до 10 мкМ приводило к подавлению роста и развития эксплантов. Одной из причин наблюдаемого процесса является образование каллуса на корнях розеток растений-ре-

генерантов земляники садовой. Кроме того, высокие концентрации БАП (5–10 мкМ) достоверно снижали высоту розеток земляники с 2–3 до 0,5–1 см (рис. 1), что в дальнейшем может затруднить их укоренение.

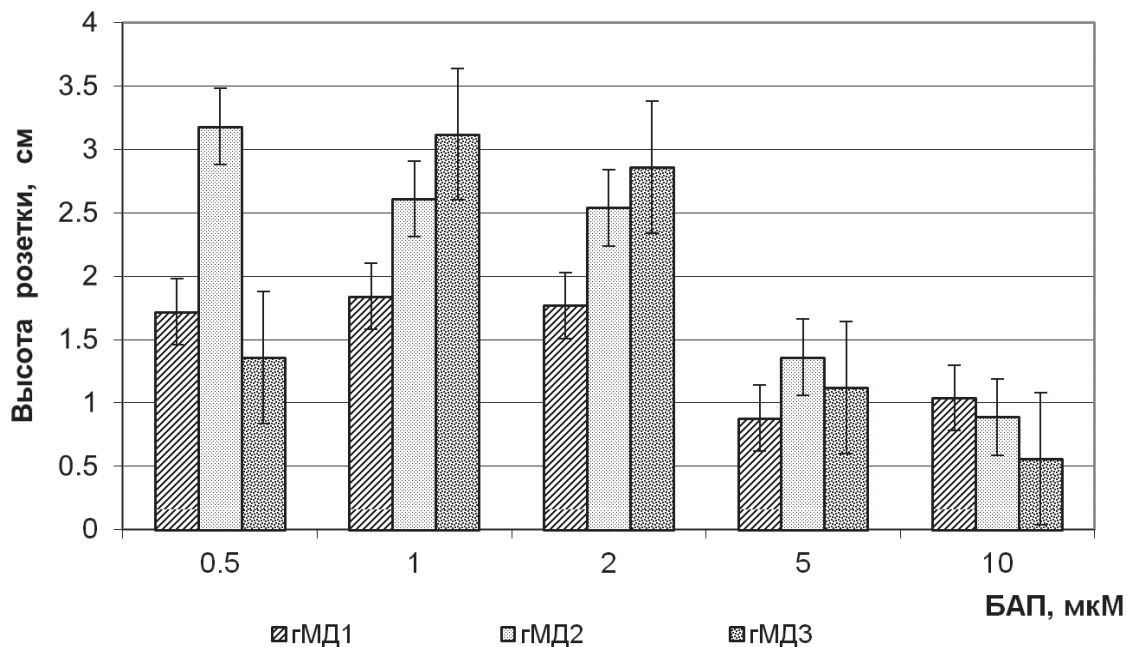


Рис. 1. Влияние концентрации 6-бензиламинопурина на высоту розетки земляники садовой сорта Московский деликатес

Как показано на рисунке 2, в среднем за пассаж все генотипы земляники садовой образуют по 3–6 листьев. У гМД1 количество листьев не изменялось

при повышении концентрации БАП с 0,5 до 5,0 мкМ, за исключением варианта с 10,0 мкМ БАП, где количество листьев увеличилось почти в 2 раза.

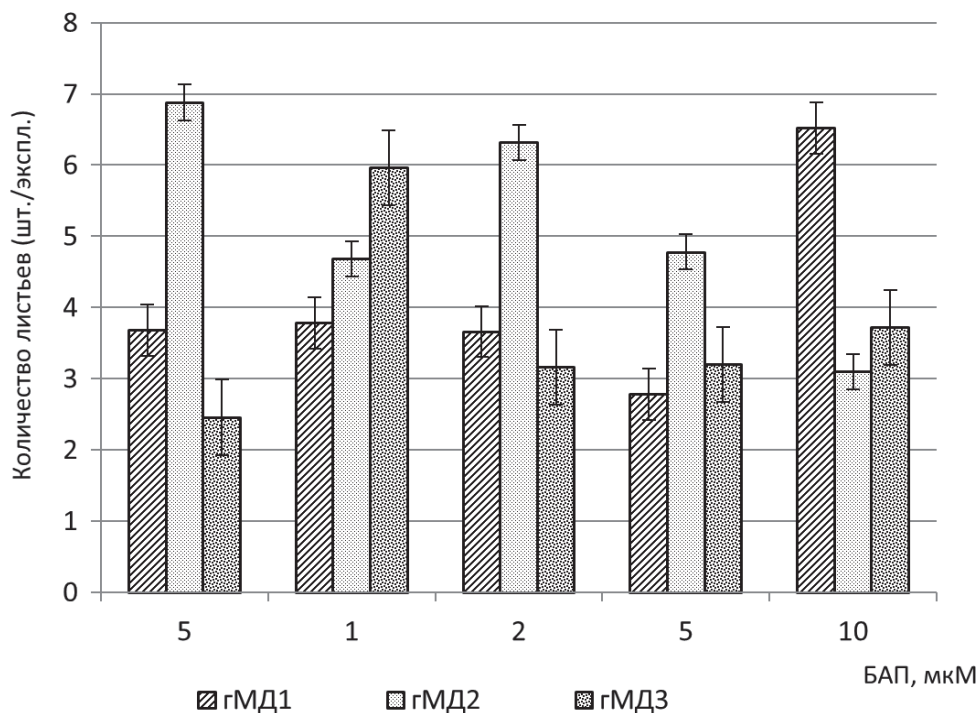


Рис. 2. Влияние концентрации 6-бензиламинопурина на количество листьев земляники садовой сорта Московский деликатес

Генотип МД2 характеризовался наибольшей высотой розетки ( $3,38 \pm 0,43$  см) и бóльшим количеством листьев ( $6,94 \pm 0,21$  шт./экспл.) по сравнению с другими генотипами на питательных средах с 0,5–5,0 мкМ БАП. Высокая концентрация цитокинина в среде (10,0 мкМ БАП) снижала облиственность и высоту розеток этого генотипа почти в 2 раза по сравнению с другими. У гМД3 наибольшее количество листьев развивалось на среде, дополненной 1 мкМ БАП.

Таким образом, исходя из показателей роста и развития земляники садовой наиболее эффективными концентрациями цитокинина для всех трех исследуемых генотипов земляники садовой сорта Московский деликатес явились 0,5–1 мкМ БАП. Разделяя побеги и вновь помещая их на среду с БАП, циклы можно повторять в течение длительного промежутка времени, получая необходимое количество посадочного материала.

Для укоренения генотипов земляники садовой растения-регенеранты переносили на среду  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением ИМК в концентрациях 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 мкМ. На безгормональной питательной среде все исследуемые генотипы земляники укоренялись на 100%, но корни были очень тонкие и не имели корневых волосков. Использование в составе питательной среды ИМК в концентрации 0,5–3 мкМ не влияло на изменение частоты регенерации, укоренение микророзеток, как и на безгормональной среде, составило 93–100%. Использование ИМК в более высоких концентрациях было нецелесообразным, так как значительно угнетался процесс ризогенеза: два генотипа земляники садовой (гМД1 и гМД2) укоренились на 43 и 47% соответственно. Наиболее развитые корни (судя по количеству и длине корней) были отмечены на среде  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением ИМК 0,5; 1,0 и 3,0 мкМ (табл. 2). У корней, регенерировавших на среде с ауксином, наблюдали появление корневых волосков.

Таблица 2

Влияние  $\beta$ -индолилмасляной кислоты на укоренение земляники садовой сорта Московский деликатес ( $n = 15$ )

| Концентрация, мкМ | Укоренение, % |      |      |
|-------------------|---------------|------|------|
|                   | гМД1          | гМД2 | гМД3 |
| 0 (контроль)      | 100           | 100  | 100  |
| 0,5               | 93            | 100  | 100  |
| 1,0               | 93            | 100  | 100  |
| 3,0               | 100           | 93   | 100  |
| 5,0               | 47            | 43   | 93   |

Анализ влияния ИМК на количество образовавшихся корней у исследуемых генотипов земляники садовой показал, что для гМД1 и гМД2 увеличение концентрации ИМК до 5 мкМ вызывало развитие каллуса и ингибировало процессы ризогенеза (рис. 3). Генотип МД3 укоренялся при всех испытанных концентрациях ауксина (93–100%), при этом количество корней было практически одинаковым на безгормональных средах и средах, содержащих ауксина (3,5–4,2 шт./экспл.). Максимальное количество корней генотип гМД1 образовывал в присутствии 3 мкМ ИМК —  $4,1 \pm 0,32$  шт./экспл. против  $2,2 \pm 0,45$  шт./экспл. в контроле (рис. 4). У гМД2 регенерировало наибольшее количество корней по сравнению с другими генотипами этого сорта и было максимальным на среде с 1 мкМ ИМК ( $5,5 \pm 0,44$  шт./экспл.).

Применение ИМК для укоренения розеток растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский деликатес оказалось эффективным, так как использование низких и средних концентраций (0,5–3,0 мкМ) этого ауксина приводило к формированию достаточно развитой корневой системы. Образовавшиеся корни были нетонкие, достаточно

длинные и имели корневые волоски (корни второго порядка) (см. рис. 3).



Рис. 3. Растение-регенерант земляники садовой гМД1, полученный на среде  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением 3,0 мкМ ИМК

Процесс укоренения растений-регенерантов сопровождался в некоторых вариантах каллусогенезом.

Достаточно развитая корневая система обеспечивает в дальнейшем лучшую адаптацию растений земляники садовой в условия *ex vitro*. На этапе адаптации растений-регенерантов неудачи напрямую связаны с целым рядом анатомических и физиологических особенностей розеток земляники садовой, которые они приобретают в условиях роста и развития *in vitro*.

Таким образом, проведенные исследования по изучению клонального микроразмножения генотипов земляники садовой сорта Московский деликатес позволили сделать следующие выводы.

1. На этапе собственно размножения земляники садовой сорта Московский деликатес оптимально использование низких концентраций 6-бензиламинопурина (0,5–2,0 мкМ).

2. На этапе укоренения целесообразно использовать  $\beta$ -индолилмасляную кислоту в концентрации 0,5–3,0 мкМ.

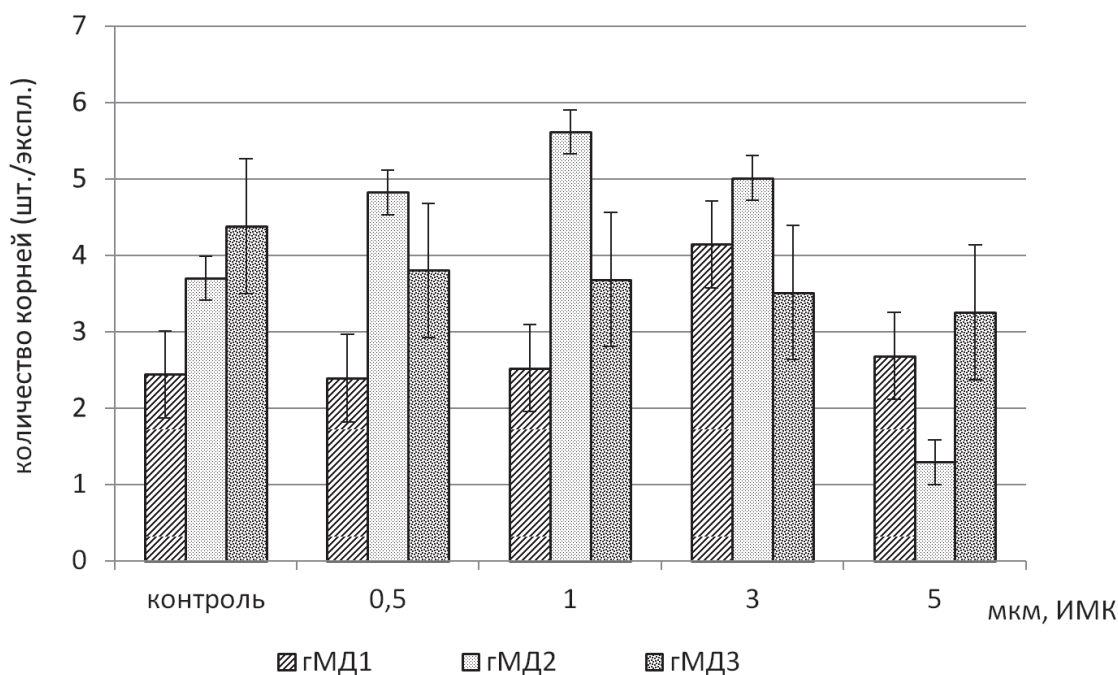


Рис. 4. Влияние  $\beta$ -индолилмасляной кислоты на количество корней земляники садовой

### Библиографический список

1. Лутов В.И. Сортоизучение и совершенствование технологии размножения земляники в условиях северной лесостепи предгорий Салаира : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — Барнаул, 2006.
2. Инновационные технологии возделывания земляники садовой : науч.-практ. изд. — М., 2010.
3. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. — Барнаул, 2004.
4. Алексеенко Л.В. Особенности размножения нейтральных и ремонтантных сортов земляники *in vitro* : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — М., 1998.
5. Белякова Л.В., Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В. Влияние некоторых факторов культивирования на развитие эксплантов земляники в процессе клонального микроразмножения // Садоводство и виноградарство. — 2010. — №2.
6. Расторгуев Л.С. Повышение частоты регенерации растений земляники в культуре каллуса и анализ степени их изменчивости // Плодоводство и виноградарство Юга России. — 2014. — №27 (3).