

УДК 634.75:631.53:581.143.6

РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ АЛЬФА И СЛАВУТИЧ

С.Э. Семенас

РУП «Институт плодородства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: svese7@yahoo.com

АННОТАЦИЯ

Было изучено размножение *in vitro* двух сортов земляники садовой: Альфа и Славутич. Поздний сорт Альфа передан на Государственное сортоиспытание в 2008 г., сорт Славутич среднего срока созревания включен в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь в 2009 г. Установлено, что увеличение концентрации бензиладенина (БА) в питательной среде сначала повышает коэффициент размножения, затем этот показатель снижается, как и высота растений-регенерантов. Для размножения изученных сортов рекомендуется среда Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л БА. Для сорта Альфа следует снижать содержание бензиладенина в пассаже, предшествующем пересадке на среду для укоренения, до 0,1–0,2 мг/л. Размноженные *in vitro* растения были использованы для закладки оздоровленных маточников земляники садовой сортов Альфа и Славутич.

Ключевые слова: земляника садовая, сорта, Альфа, Славутич, клональное размножение *in vitro*, коэффициент размножения, бензиладенин, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

В РУП «Институт плодородства» метод культивирования *in vitro* используется для размножения, оздоровления и сохранения генотипов плодовых и ягодных растений. В отделе биотехнологии разработаны технологии производства оздоровленного посадочного материала и методики микроклонального размножения для различных культур, в том числе земляники садовой [1, 2]. Были подобраны оптимальные среды для размножения различных районированных сортов этой культуры. Однако в настоящее время в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород включены новые сорта, и возникла необходимость определить состав питательной среды для их ускоренного размножения, оздоровления *in vitro* и поддержания базовых маточников. У земляники садовой высокая сортовая специфичность по отношению к концентрации регуляторов роста в питательной среде [3], поэтому для каждого сорта необходим индивидуальный подбор сред.

Для культуры тканей земляники садовой мы используем минеральную основу среды Мурасиге-Скуга. Эта среда наиболее универсальна, хотя земляника отличается большой пластичностью в отношении минерального состава среды.

Тип и концентрацию биологически активных веществ (цитокенинов и ауксинов) подбирают в зависимости от экспланта, генотипа растения, состояния материнского растения и целей культивирования [3]. Концентрация биологически активных веществ

должна обеспечивать, с одной стороны, получение достаточного количества хорошо развитых регенерантов, с другой – свести к минимуму риск появления мутаций. При этом мы стремимся к достижению не максимального, а оптимального значения коэффициента размножения. Оптимальным является такое значение коэффициента размножения, которое позволяет получать достаточное для целей размножения количество регенерантов; при этом не наблюдается явлений витрификации или они минимальны. Для получения максимального коэффициента размножения необходимо увеличивать концентрации биологически активных веществ. Это приводит не только к повышению генетической нестабильности, но и угнетает рост и развитие регенерантов, может быть причиной витрификации регенерантов в культуре. После высадки в грунт у таких растений может возникнуть нежелательное явление гиперцветения.

В качестве экспланта для целей сохранения генотипа в процессе размножения *in vitro* обычно используют меристематическую верхушку. Клетки меристемы находятся в генетически наиболее стабильном состоянии по сравнению с клетками других частей растения [4, 5], поэтому для размножения *in vitro* с целью сохранения генотипа допустимо использовать только культуру меристематических тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2010-2011 гг. Объектами исследования были сорта земляники садовой Альфа и Славутич.

Сорт земляники садовой Альфа российской селекции относится к группе сортов позднего срока созревания. Согласно исследованиям, проведенным в РУП «Институт плодородства» [6, 7], он является источником высокой зимостойкости, устойчивости к серой гнили, крупноплодности. Плоды этого сорта крупные (средняя масса – 9,7 г), овально-конической формы, блестящие, имеют привлекательный внешний вид (4,6 балла). Вкус ягод кисло-сладкий, с ароматом, дегустационная оценка – 4,5 балла. В плодах содержится 9,8 % растворимых сухих веществ, 1,13 % титруемых кислот, 481 мг/100 г фенолов, 141 мг/100 г калия; сумма сахаров составляет 6,21 %, пектинов – 0,71 %. Сорт Альфа универсального назначения. Он сочетает высокий уровень изученных компонентов продуктивности (количество цветоносов на куст, средняя масса ягод) с компактным типом соцветия, является источником высокой продуктивности. Альфа характеризуется высокой урожайностью (10,9 т/га) и высокой экономической эффективностью возделывания в условиях Беларуси: уровень рентабельности составляет 151 % [6, 7]. В 2008 г. сорт был передан в сеть Государственного сортоиспытания.

Сорт Славутич включен в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород в 2009 г., рекомендован для возделывания в Гомельской, Минской и Могилевской областях. Это сорт среднего срока созревания, среднепоражаемый серой гнилью, белой и бурой пятнистостью листьев. Он является источником высокой зимостойкости, высокого содержания пектиновых веществ (более 0,75 %). Ягоды средние (средняя масса – 8,7 г), овально-конической формы, блестящие, кисло-сладкие, с привлекательным внешним видом (4,6 балла) и высокими вкусовыми качествами, с сильно выраженным ароматом (дегустационная оценка – 4,6 балла) [6, 7]. Свежие плоды содержат 10,6 % растворимых сухих веществ, 1,23 % титруемых кислот, 433 мг/100 г фенолов, 137 мг/100 г калия; сумма сахаров составляет 6,23 %, пектинов – 0,80 %. Славутич, так же как и Альфа, является сортом универсального назначения и рекомендован для промышленного возделывания. Уровень рентабельности Славутича – 127 % [6, 7].

Для инициации культуры *in vitro* использовали верхушечные меристемы. С оздоровленных маточных растений собирали концы плетей длиной около 5 см, которые промывали проточной водопроводной водой для удаления механических загрязнений. Для стерилизации растительного материала использовали 70%-ный раствор этанола (экспозиция 10 секунд) и 30%-ный раствор пероксида водорода (экспозиция 30 секунд), затем промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой. Меристематический конус выделяли под бинокулярным микроскопом. Экспланты помещали на питательную среду следующего состава: минеральная основа по Мурасиге-Скугу, 100 мг/л мезоинозитола, по 0,5 мг/л витаминов В₁, В₆ и РР, 0,2 мг/л бензиладенина (БА). В качестве источника углеводов использовали глюкозу (30 г/л), концентрация агар-агара – 4,5 г/л, рН=5,7.

На этапе размножения использовали такую же среду, дополненную 0,1 мг/л гибберелловой кислоты (ГА) и 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК). Для стабилизации культуры *in vitro* землянику садовую культивировали на этой среде в течение двух пассажей. После этого растения-регенеранты были пересажены на среды, содержащие 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1,0 мг/л БА с целью определения оптимальной концентрации этого биологически активного вещества при клональном микроразмножении. Для опыта были отобраны растения-регенеранты длиной от 1,0 до 1,5 см, с хорошо развитыми листьями (не менее 5). Растения-регенеранты культивировали на указанных средах в течение двух пассажей. Среда для укоренения содержит ¼ концентрации макросолей среды Мурасиге-Скуга, полную концентрацию микросолей, агар-агар – 4,5 г/л, и уменьшенное количество глюкозы (20 г/л); рН=5,7. Биологически активные вещества в эту среду не добавляли.

Учитывали коэффициент размножения, высоту растений, долю пробирок, в которых наблюдали образование каллуса и витрификацию регенерантов, а также процент укорененных растений после пересадки на среду для укоренения. Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сорт Альфа. Коэффициент размножения сорта Альфа в первом пассаже варьировал в пределах от $1,33 \pm 0,09$ (среда с 0,2 мг/л БА) до $8,83 \pm 0,17$ (среды с 0,5 и 0,6 мг/л БА). Во втором пассаже коэффициент размножения повышается, за исключением среды с 0,9 мг/л БА: минимальное его значение – $3,92 \pm 0,09$, максимальное – $12,17 \pm 0,17$ (рисунок 1). Максимальный коэффициент размножения в первом пассаже получен на средах с 0,5 и 0,6 мг/л БА ($8,83 \pm 0,17$); во втором пассаже наиболее эффективны среды, содержащие 0,4 и 0,5 мг/л данного биологически активного вещества (коэффициент размножения $12,00 \pm 0,19$ и $12,17 \pm 0,17$ соответственно). Однофакторный дисперсионный анализ показал, что различия между этими парами сред недостоверны ($p < 0,05$). Однако достоверны различия между средами с 0,5 и 0,6 мг/л БА и всеми остальными средами в первом пассаже, а также между средами с 0,4 и 0,5 мг/л БА и всеми остальными средами во втором пассаже. В обоих пассажах опыта при увеличении концентрации БА коэффициент размножения сначала возрастает, а затем снижается.

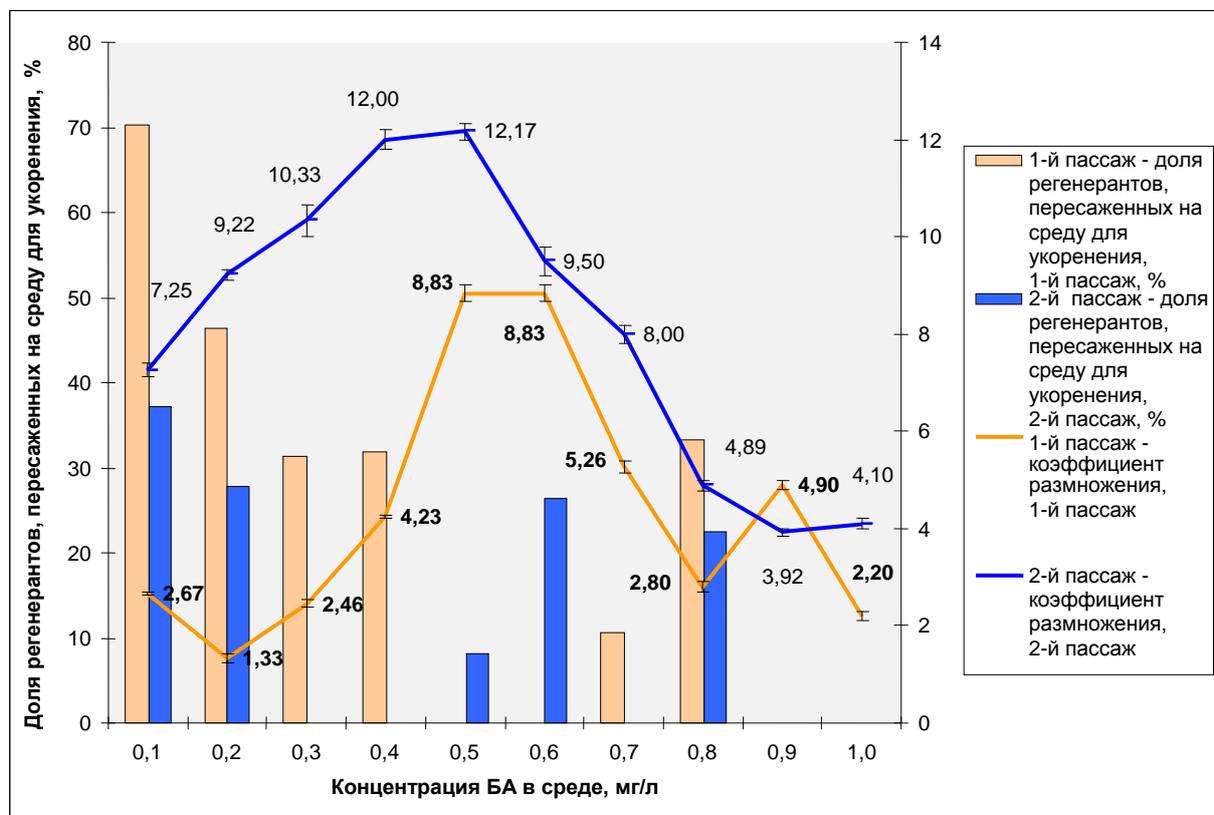


Рисунок 1 – Зависимость коэффициента размножения сорта Альфа и доли регенерантов, пересаженных на среду для укоренения, от концентрации бензиладенина в питательной среде (первый и второй пассажи опыта).

При рассмотрении доли хорошо развитых регенерантов, готовых к высадке на среду для укоренения, на различных средах наблюдается тенденция к снижению этого показателя при увеличении концентрации БА. На некоторых средах с более высоким содержанием этого вещества (0,4–0,8 мг/л) ни в одном из пассажей не были получены растения, пригодные для укоренения *in vitro*. На средах с 0,9 и 1,0 мг/л БА в обоих пассажах рост растений-регенерантов угнетался. Принимая во внимание резкое снижение коэффициента размножения на этих средах, такие концентрации бензиладенина нельзя рекомендовать к использованию для размножения земляники садовой сорта Альфа.

В данном опыте наибольшее значение коэффициента размножения получено на среде с 0,5 мг/л БА. Эту концентрацию рекомендуется использовать для размножения сорта Альфа. Однако перед этапом укоренения следует снижать концентрацию до 0,1–0,2 мг/л с целью получения максимального количества регенерантов, пригодных для высадки на среду для укоренения. На этих средах от 27,72 % (среда с 0,2 мг/л БА, 2-й пассаж) до 70,27 % (среда с 0,1 мг/л БА, 1-й пассаж) растений-регенерантов были готовы для укоренения.

При клональном микроразмножении в каждой пробирке высота растений-регенерантов варьирует в значительных пределах, так как почки закладываются постоянно и растущие из них растеньица – разного возраста. На основании полученных данных нет возможности сделать заключение о влиянии концентрации бензиладенина на высоту регенерантов, однако полученные данные показывают, что все изученные среды не оказывают значительного ингибирующего влияния на растения земляники сорта Альфа. Минимальная средняя высота регенерантов – 1,13 см (среда с 0,2 мг/л БА, 2-й пассаж), максимальная – 3,21 (среда с 0,2 мг/л БА, 1-й пассаж) (рисунок 2).

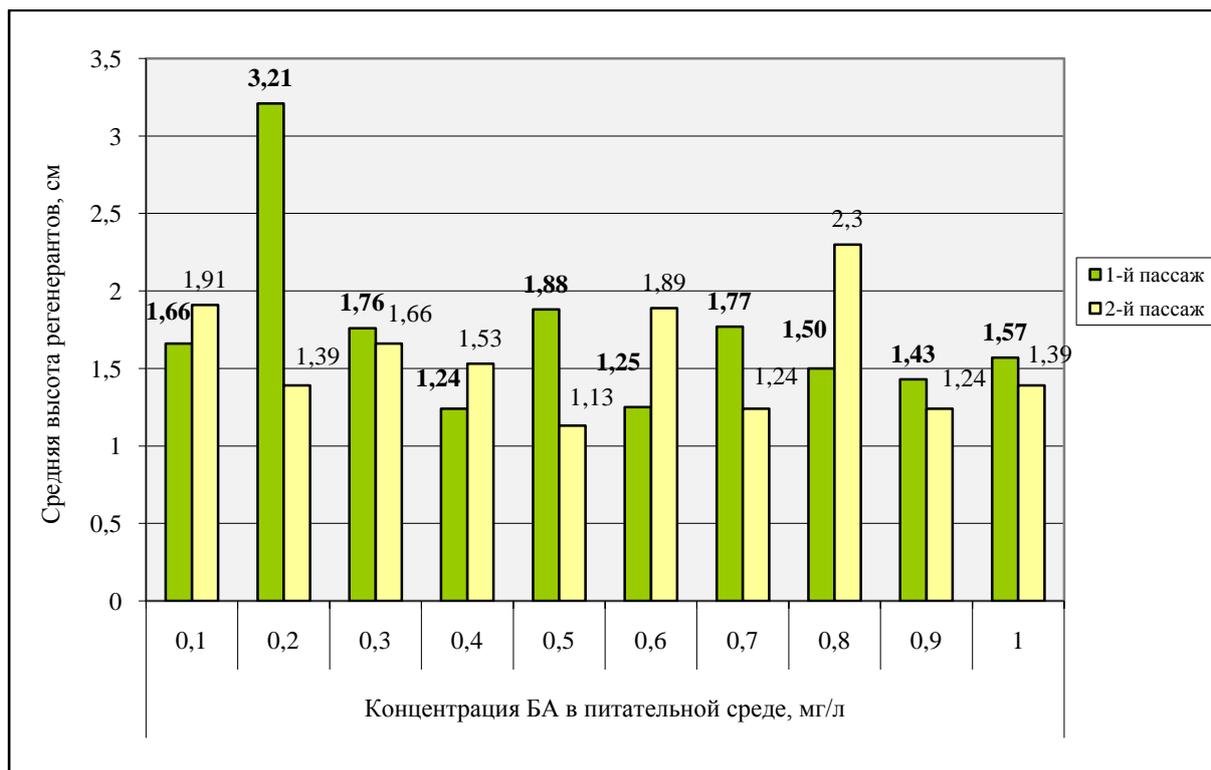


Рисунок 2 – Зависимость средней длины растений-регенерантов сорта Альфа от концентрации бензиладенина в питательной среде (первый и второй пассажи опыта).

Через 2 недели культивирования на среде для укоренения все регенеранты образовали корни и затем были высажены в субстрат для прохождения периода адаптации. Были успешно адаптированы 100 % растений сорта Альфа.

Сорт Славутич. Максимальные значения коэффициента размножения в первом и втором пассажах опыта наблюдались на среде с 0,5 мг/л бензиладенина и достигали $8,77 \pm 0,15$ и $7,90 \pm 0,10$ соответственно (рисунок 3). В первом пассаже минимальное значение этого показателя составило 3,70 (среда с 0,8 мг/л БА), во втором пассаже – 3,20 (среда с 0,1 мг/л БА). Однофакторный анализ позволил определить, что в первом пассаже значение коэффициента размножения на среде с 0,5 мг/л бензиладенина достоверно ($p < 0,05$) отличается от значений этого показателя на всех других средах. Это утверждение верно также для коэффициента размножения на среде с 0,6 БА (рисунок 3). Анализ данных второго пассажа показал, что достоверно отличаются от всех остальных сред только коэффициенты размножения на среде с 0,5 мг/л БА ($7,9 \pm 0,10$) и 0,1 мг/л БА ($3,23 \pm 0,12$).

Доля хорошо развитых растений-регенерантов, пригодных для высадки на среду для укоренения, была не менее 20 %: минимальное значение составило 24,10 в первом пассаже и 20,90 – во втором пассаже; максимальный процент достигал 41,35 и 53,13 в первом и втором пассажах соответственно. Явлений витрификации и избыточного образования каллуса у сорта Славутич не наблюдали.

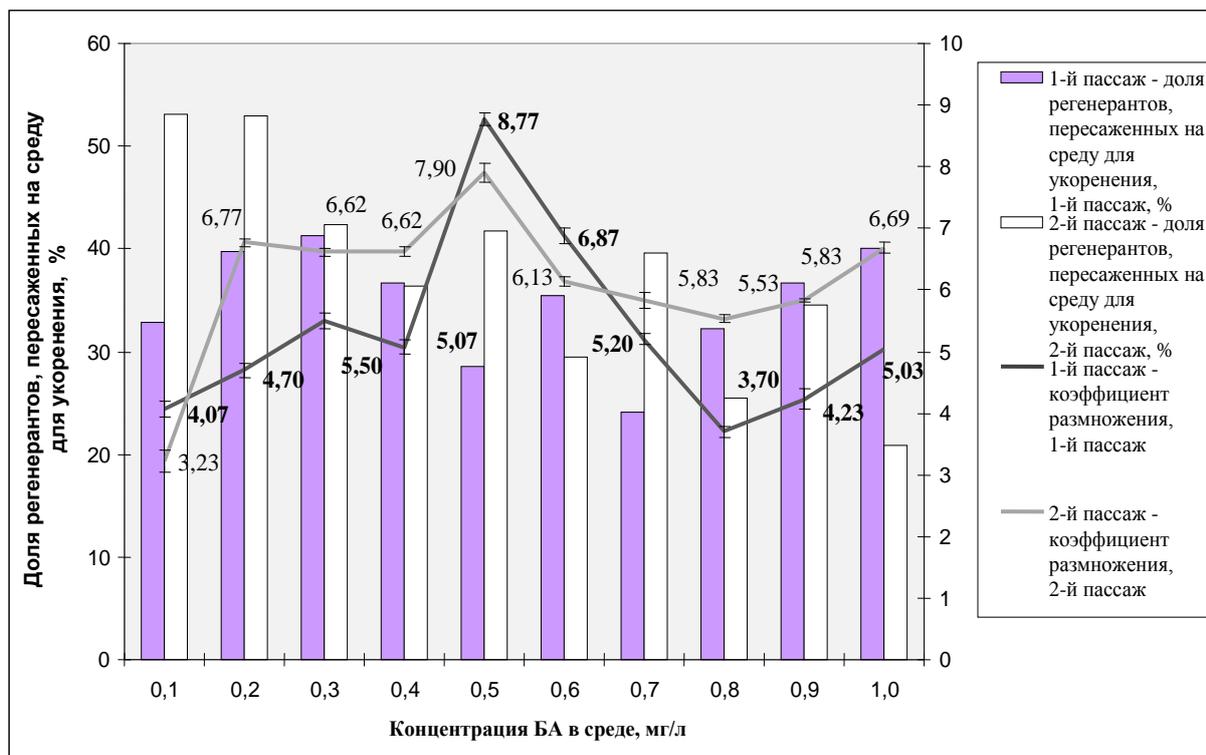


Рисунок 3 – Зависимость коэффициента размножения сорта Славутич и доли регенерантов, пересаженных на среду для укоренения, от концентрации бензиладенина в питательной среде (первый и второй пассажи опыта).

Средняя высота растений на различных средах варьировала в первом пассаже от 1,53 см на среде с 0,6 мг/л БА до 2,49 см на среде с 0,1 мг/л БА. Во втором пассаже растения максимальной высоты были получены на той же среде (2,24 см), минимальной – на среде с добавлением 1 мг/л БА (рисунок 4). Как правило, этот показатель снижается при возрастании концентрации бензиладенина в среде, однако на всех изученных средах растения были достаточно развиты как для дальнейшего размножения, так и для укоренения *in vitro*. Укореняемость на среде для укоренения составила 100 %, и все растения успешно прошли этап адаптации к нестерильным условиям.

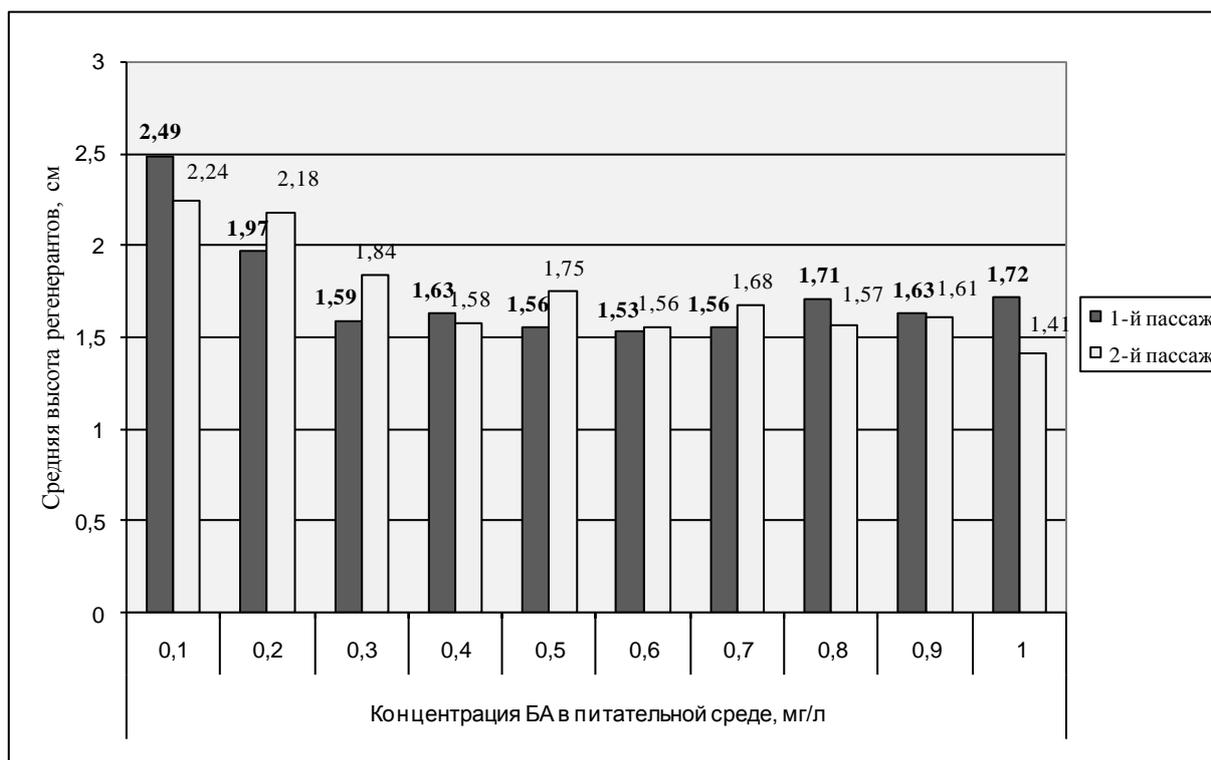


Рисунок 4 – Зависимость высоты растений-регенерантов сорта Славутич от концентрации бензиладенина в питательной среде (первый и второй пассажи опыта).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При увеличении концентрации бензиладенина в питательной среде коэффициент размножения земляники садовой сортов Альфа и Славутич сначала увеличивался, затем повышение концентрации этого биологически активного вещества подавляло процесс размножения *in vitro* и отрицательно влияло на рост регенерантов в культуре. Анализ полученных данных позволяет рекомендовать для размножения сортов земляники садовой Альфа и Славутич среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л БА. Однако для сорта Альфа рекомендуется снижать ее до 0,1–0,2 мг/л в пассаже, предшествующем этапу укоренения *in vitro*, с целью получения максимального количества хорошо развитых регенерантов, пригодных для высадки на среду для укоренения.

Размноженные *in vitro* растения были использованы для закладки оздоровленных маточников земляники садовой сортов Альфа и Славутич.

Литература

1. Кухарчик, Н.В. Схема производства оздоровленного посадочного материала земляники садовой / Н.В. Кухарчик, С.Э. Семенас // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Институт плодководства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 152-160.
2. Семенас, С.Э. Методика клонального микроразмножения сортов земляники садовой / С.Э. Семенас, Н.В. Кухарчик // Плодоводство: науч. тр. / БелНИИ плодководства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2000. – Т. 13. – С. 138-145.

3. Расторгуев, С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений: монография / С.Л. Расторгуев. – Мичуринск: изд-во Мичуринского ГАУ, 2009. – 170 с.

4. Куликов, И.М. Сохранение *in vitro* плодовых, ягодных и декоративных растений / И.М. Куликов, В.А. Высоцкий, Л.В. Алексеенко // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – М., 2009. – Т. XXI. – С. 178-186.

5. Высоцкий, В.А. Возможности создания коллекций ценных форм плодовых и ягодных растений *in vitro* / В.А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: В.И. Кашин [и др.]. – М., 2000. – Т. VII. – С. 56-61.

6. Клакоцкая, Н.В. Хозяйственно-биологическая характеристика нового коллекционного материала земляники садовой в Беларуси: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Н.В. Клакоцкая; РУП «Институт плодоводства». – Самохваловичи, 2010. – 20 с.

7. Клакоцкая, Н.В. Хозяйственно-биологическая характеристика нового коллекционного материала земляники садовой в Беларуси: дис. канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Н.В. Клакоцкая; РУП «Институт плодоводства». – Самохваловичи, 2010. – 120 с.

IN VITRO PROPAGATION OF 'ALPHA' AND 'SLAVUTICH' STRAWBERRY CULTIVARS

S.E. Semenas

SUMMARY

In vitro propagation of two strawberry cultivars ('Alpha' and 'Slavutich') was studied. Late-ripening cultivar 'Alpha' was passed to the State Variety Trial in 2008. 'Slavutich' (medium term of ripening) was included into the State Register of Varieties and Wood and Shrubby Species of the Republic of Belarus in 2009. When the benzyladenine concentration in nutrition medium increases, first of all, it stimulates the propagation coefficient growth, but higher concentrations inhibited both the growth and propagation of regenerant plants. We recommend Murashige-Skoog medium supplemented with 0.5 mg/l BA. For cultivar 'Alpha' benzyladenine concentration should be reduced to 0.1-0.2 mg/l in a passage prior to transplantation to the rooting medium. Plants propagated *in vitro* were used for virus-free mother plantations of strawberry cultivars 'Alpha' and 'Slavutich'.

Key words: strawberry cultivars, Alpha, Slavutich, clonal *in vitro* propagation, propagation coefficient, benzyladenine, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 25.03.2013