

УДК 634.75:631.533.3:581.143.6

РАЗМНОЖЕНИЕ РАЙОНИРОВАННЫХ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ВИМА ЗАНТА И ДУКАТ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

С.Э. Семенас

РУП «Институт плодородства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: svese7@yahoo.com

РЕФЕРАТ

Представлены результаты опыта по определению оптимальной концентрации бензиладенина (БА) в питательной среде при размножении *in vitro* двух районированных сортов земляники садовой. Для сорта Вима Занта рекомендовано использовать среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 и 0,4 мг/л бензиладенина, что позволяет достичь коэффициента размножения 9,78 и получать более 20 % хорошо развитых растений-регенерантов. Для Дуката оптимальна среда MS, дополненная 0,3 или 0,4 мг/л БА. При этом коэффициент размножения превышает 7, а доля растений, готовых для пересадки на среду для укоренения, выше 30 %. Рекомендуемые концентрации бензиладенина позволяют получить достаточное количество хорошо развитых растений-регенерантов, которые пригодны как для дальнейшего размножения *in vitro*, так и для укоренения, последующей адаптации к нестерильным условиям и высадке в грунт.

Ключевые слова: земляника садовая, Вима Занта, Дукат, размножение *in vitro*, коэффициент размножения, бензиладенин, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Культура *in vitro* широко используется не только для размножения и оздоровления, но также и для сохранения коллекций генотипов, в том числе для хранения коллекций оздоровленных растений (базовые коллекции). В РУП «Институт плодородства» содержатся коллекции оздоровленных сортов земляники садовой. Для поддержания базовых маточников необходимо определить концентрацию биологически активных веществ, позволяющую получать достаточное количество хорошо развитых регенерантов, и свести к минимуму риск появления мутаций.

В отделе биотехнологии ранее была разработана технология производства оздоровленного посадочного материала земляники садовой с применением культуры *in vitro* [1, 2], были подобраны среды, оптимальные для размножения различных районированных сортов земляники садовой. В настоящее время в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь включены новые сорта, и возникла необходимость определить для них состав питательной среды, используемой при размножении *in vitro*. Необходимость подбора концентраций биологически активных веществ среды для новых сортов вызвана тем, что у земляники садовой высока сортовая специфичность по отношению к концентрации регуляторов роста в питательной среде [3].

Для культивирования земляники садовой обычно используют минеральную основу среды Мурасиге-Скуга, хотя эта культура отличается большой пластичностью в отношении минерального состава среды для культивирования *in vitro*. Тип и концентрацию биологически активных веществ (цитокининов и ауксинов) подбирают в зависимости

от экспланта, генотипа растения, состояния материнского растения и целей культивирования [3]. Для уменьшения частоты соматического мутагенеза при размножении *in vitro* применяют минимальные концентрации биологически активных веществ, которые обеспечивают достижение оптимального 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. Получение максимального коэффициента размножения связано с применением высоких концентраций биологически активных веществ и 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 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.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в 2010-2011 гг. в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства». Объектами исследования были сорта земляники садовой Вима Занта и Дукат, включенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь.

Вима Занта (Vima Zanta) – среднеранний урожайный сорт; страна происхождения – Голландия. Сорт устойчив к грибным болезням листьев и вертициллезу, чувствителен к мучнистой росе. Ягоды десертного назначения, транспортабельны. В Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород включен с 2002 г., рекомендован для возделывания на всей территории страны.

Дукат (Dukat) – позднего срока созревания, очень урожайный, зимостойкий. Страна происхождения – Польша. Сорт устойчив к красной пятнистости, высокоустойчив к белой пятнистости. В меньшей степени, чем Зенга-Зенгана, поражается серой гнилью, не повреждается весенними заморозками, в том числе и во время цветения. Растения не поражаются заболеваниями корневой системы. Ягоды транспортабельны, десертного вкуса, пригодны для переработки. Сорт Дукал включен в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород с 2006 г., рекомендован к возделыванию в Брестской, Гомельской и Гродненской областях.

Для инициации культуры *in vitro* использовали меристематические верхушки с верхушечных почек плетей, взятых с оздоровленных маточных растений. После срезки верхушек плетей их промывали проточной водопроводной водой в течение 1-2 минут для удаления песка и других механических загрязнений. Стерилизация эксплантов была проведена с помощью 70%-ного этилового спирта в течение 10 секунд и 30%-ного раствора перекиси водорода в течение 30 секунд, затем растительный материал был трехкратно промыт стерильной дистиллированной водой. Экспланты были помещены на питательную среду следующего состава: минеральная основа по Мурасиге-Скугу, 100 мг/л мезоинозитола, по 0,5 мг/л витаминов В₁, В₆ и РР, дополненная 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 ту же среду, в которую дополнительно добавили 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 мг/л; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 и 0,8 мг/л БА для 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 таких средах в течение двух пассажей. Учитывали коэффициент размножения, высоту растений, долю пробирок с каллусом и витрификацией растений, а также процент укорененных растений после пересадки на среду для укоренения. 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 добавляются.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сорт Вима Занта

Для растений-регенерантов сорта Вима Занта коэффициент размножения при увеличении концентрации бензиладенина в среде возрастал с $3,13 \pm 0,24$ на среде с 0,1 мг/л БА до $9,78 \pm 0,48$ на среде с 0,5 мг/л БА, а затем вновь понижался (рисунок 1). Дисперсионный анализ показал, что коэффициент размножения на последней среде достоверно отличался от этого показателя на всех других средах, только разница с этим же показателем на среде с 0,4 мг/л бензиладенина ($9,11 \pm 0,48$) была не достоверной при уровне значимости 0,05.

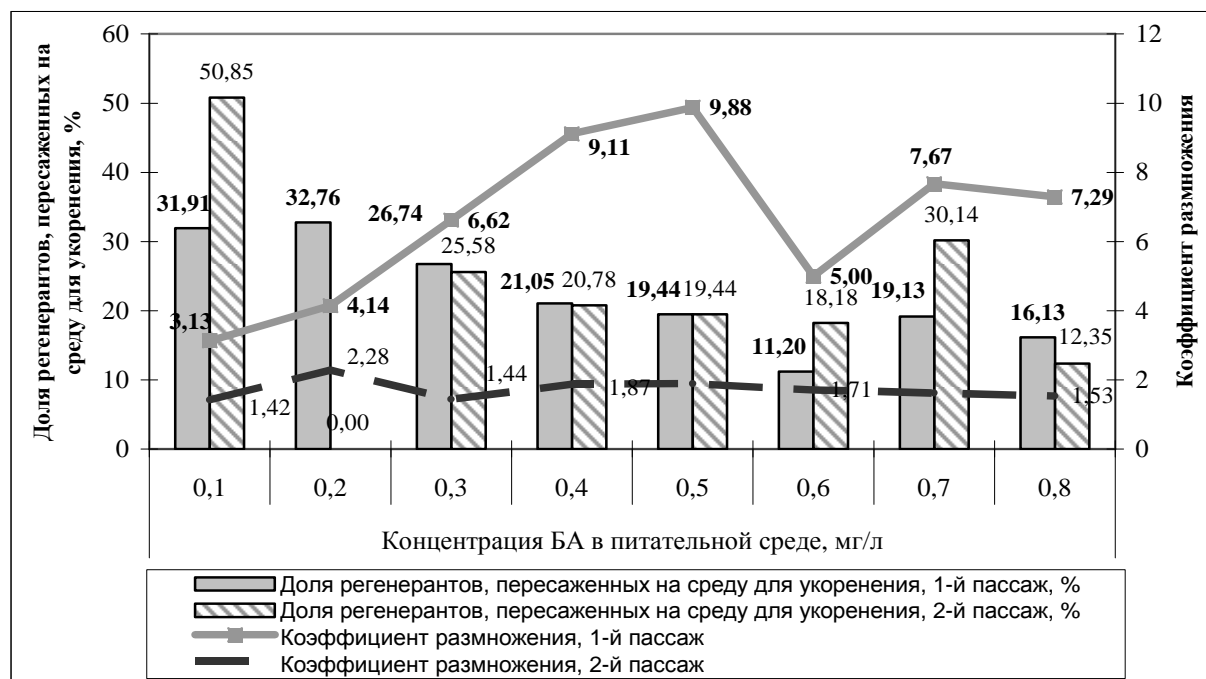


Рисунок 1 – Зависимость коэффициента размножения сорта Вима Занта и доли регенерантов, пересаженных на среду для укоренения, от концентрации бензиладенина в питательной среде.

На среде с 0,6 мг/л БА коэффициент размножения был намного ниже, чем на средах с большей и меньшей концентрацией этого вещества (0,5 и 0,7 мг/л). Это может быть следствием появления в пробирках незначительной инфекции, которая не вызвала гибели растений, однако оказала угнетающее действие на их рост и размножение. Во втором пассаже коэффициенты размножения были намного ниже вследствие развившейся инфекции.

Витрификация у растений-регенерантов сорта Вима Занта была обнаружена только на среде с 0,3 мг/л БА (4,1 %). Следует отметить, что на следующем пассаже витрификацию наблюдали на трех средах: 13,9 % на среде с 0,3 мг/л БА, 13,8 % на 0,6 мг/л БА и 37,98 % на самой высокой из использованных концентраций этого биологически активного вещества (0,8 мг/л). Витрификация негативно влияет на размножение земляники садовой *in vitro*, на ее укореняемость и адаптацию, поэтому необходимо избегать витрификации растений-регенерантов. Для получения генетически стабильной культуры и максимального сохранения исходного генотипа не желательны избыточное образование каллусных тканей и регенерация побегов из них. В нашем опыте такого явления не наблюдали.

На всех средах в каждой пробирке получено достаточное количество хорошо развитых растений-регенерантов, что позволяет как отобрать их для укоренения, так и продолжать размножение *in vitro*. Доля хорошо развитых регенерантов, пригодных для высадки на среду для укоренения, составила от 32,76 % на среде с 0,2 мг/л БА до 11,20 % на среде с 0,6 мг/л БА (рисунок 1). Последнее значение рассматриваемого показателя снижено в связи с появлением инфекции, как и значение коэффициента размножения на этой среде. За этим исключением, доля хорошо развитых растений-регенерантов, готовых для пересадки на среду для укоренения, снижалась по мере увеличения концентрации бензиладенина в среде. На втором пассаже сохранялась та же тенденция. При пересадке на среду для укоренения регенеранты, размноженные на всех изученных средах, развивали корни в течение 2 недель. Укореняемость во всех случаях составила 100 %.

Высота растений-регенерантов на первом пассаже варьировала от 2,33 см до 1,13 см и не зависела от концентрации БА в среде (рисунок 2). После второго пассажа этот показатель был минимальным на среде с 0,1 мг/л БА (1,48 см), максимальным – на среде с 0,4 мг/л бензиладенина – 3,08 см. При размножении *in vitro* на растении, высаженном на питательную среду, постоянно происходит закладка почек, из которых образуются новые растеньица. В каждом конгломерате находятся растения различного возраста, и, следовательно, различной высоты. Этот показатель варьировал в одной пробирке в широких пределах: от 0,2 см до 4,5 см (на среде с 0,1 мг/л БА), от 0,5 см до 5,5 см (0,6 мг/л БА). Определение среднего показателя дает возможность убедиться, что все изученные среды не подавляют рост регенерантов. Однако на обоих пассажах наблюдается тенденция к снижению высоты растений-регенерантов при увеличении концентрации бензиладенина в питательной среде.

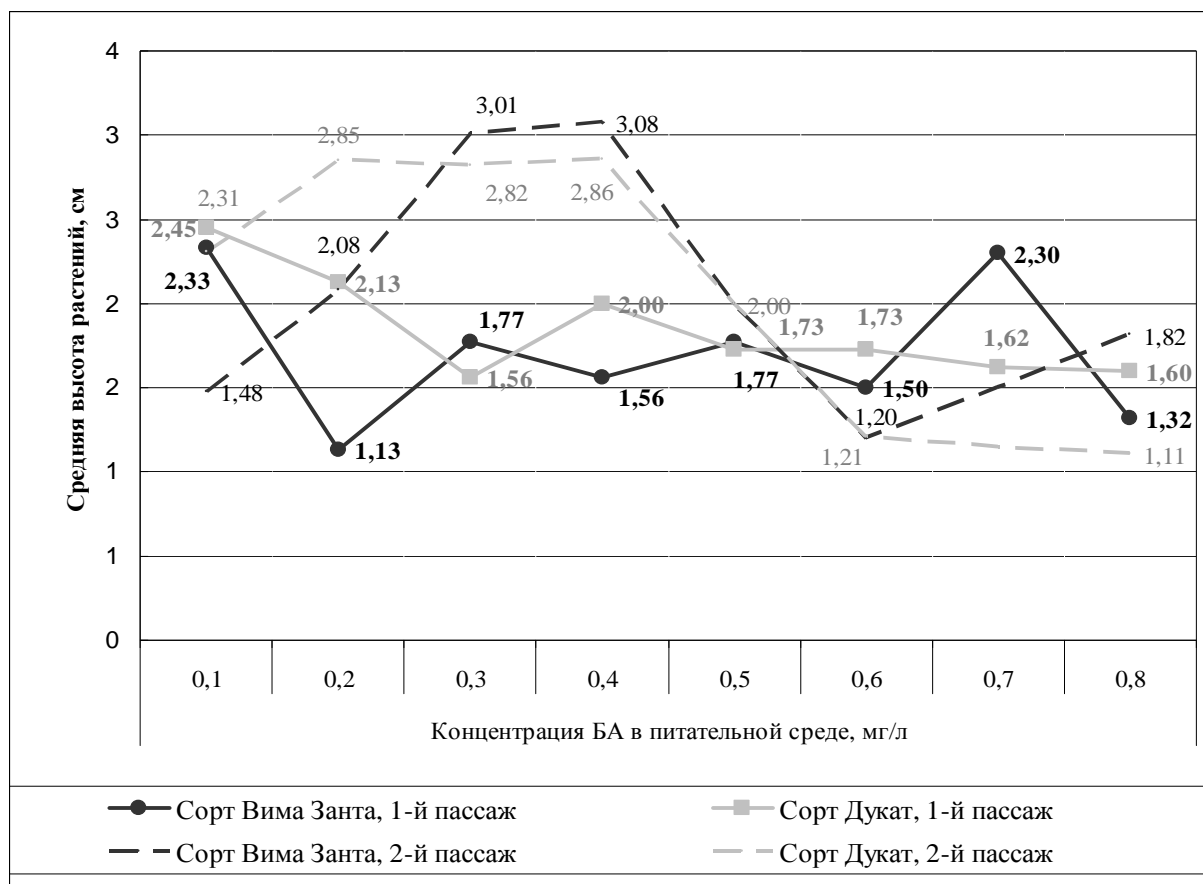


Рисунок 2 – Высота растений сортов Вима Занта и Дукат на средах с различной концентрацией бензиладенина.

Сорт Дукат

Растения-регенеранты земляники садовой сорта Дукат показали коэффициенты размножения от $1,62 \pm 0,05$ (среда с 0,1 мг/л БА) до $4,83 \pm 0,17$ (0,2 мг/л БА). После второго пассажа значения этого показателя были выше, но менее однородны. Максимальный коэффициент размножения наблюдали на среде с минимальным количеством бензиладенина ($12,00 \pm 1,29$), и достаточно высокие показатели отмечены на средах с 0,3 мг/л; 0,4 и 0,6 мг/л БА ($7,83 \pm 0,10$; $7,77 \pm 0,05$ и $7,07 \pm 0,15$ растений на один высаженный регенерант соответственно) (рисунок 3). Достоверны различия между всеми средами, за исключением сред со следующими концентрациями БА: 0,1 мг/л и 0,8; 0,4 и 0,6; 0,3, 0,4 и 0,5 мг/л.

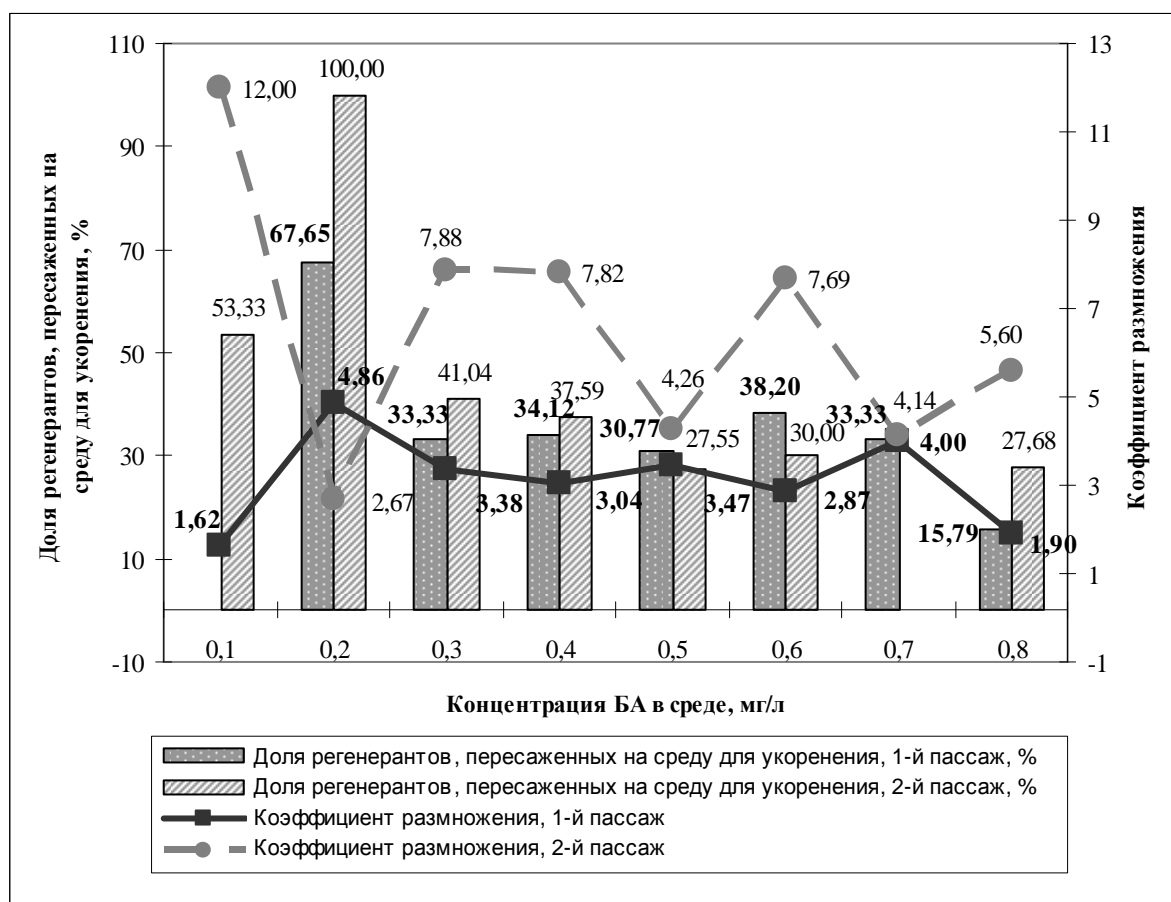


Рисунок 3 – Зависимость коэффициента размножения сорта Дукат и доли растений-регенерантов, пересаженных на среду для укоренения, от концентрации бензиладенина в питательной среде.

Доля регенерантов, готовых к укоренению, варьировала от 0 (0,1 мг/л БА) до 67,65 % (0,2 мг/л БА). Во 2-м пассаже этот показатель был выше – от 27,55 % до 100 %. У всех изучаемых сортов на средах с минимальным содержанием бензиладенина (0,1 и 0,2 мг/л) доля хорошо развитых растений была выше, чем на остальных (рисунок 3).

Растения, полученные в результате размножения на всех средах, после высадки на среду для укоренения в течение 2 недель образовывали корни (100%-ная укореняемость).

Наблюдали единичные пробирки с признаками витрификации растений-регенерантов: 2 пробирки со средами, дополненными 0,3 и 0,8 мг/л БА, что составило менее 1 % от количества высаженных растений. На других средах это явление не наблюдали, так же, как и избыточного образования каллуса.

Высота растений-регенерантов сорта Дукат на средах с различной концентрацией бензиладенина варьировала от 1,56 см до 2,45 см на средах с 0,3 и 0,1 мг/л БА соответственно (рисунок 2). На втором пассаже максимальная средняя высота растений-регенерантов составила 2,86 см (0,4 мг/л БА), минимальная – 1,11 (0,8 мг/л БА). Как и для сорта Вима Занта, очевидна тенденция к снижению высоты растений с ростом концентрации бензиладенина в среде. Однако даже при самых высоких концентрациях (0,8 мг/л) получают более 15 % растений, пригодных для высадки на среду для укоренения (рисунок 3), и достаточно развитые растения для дальнейшего использования в целях размножения (рисунок 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет рекомендовать для размножения сорта Вима Занта среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,4 мг/л бензиладенина. Эта среда позволяет достичь коэффициента размножения $9,78 \pm 0,48$ и получать 21,05 % хорошо развитых растений-регенерантов, пригодных как для дальнейшего размножения, так и для укоренения и адаптации. Средняя высота растений на этих средах достигает 3,08 см.

Для размножения *in vitro* сорта Дукат рекомендуется питательная среда Мурасиге-Скуга с добавлением 0,3 и 0,4 мг/л бензиладенина. На первой среде коэффициент размножения достигает 3,38 и 7,88 в первом и втором пассажах, соответственно, и 30 % хорошо развитых регенерантов. Средняя высота растений составила 1,56 (первый пассаж) и 2,82 см (второй пассаж). На среде с добавлением 0,4 мг/л БА коэффициент размножения достиг 3,04 на первом пассаже и 7,82 – на втором при средней высоте растений-регенерантов 2,00 и 2,86 см соответственно. Размножение на данной среде позволяет получить не менее 30 % хорошо развитых регенерантов.

Рекомендуемые среды для клонального микроразмножения сортов Вима Занта и Дукат позволяют получить достаточное количество хорошо развитых растений-регенерантов, которые пригодны как для дальнейшего размножения *in vitro*, так и для укоренения, последующей адаптации к нестерильным условиям и высадке в грунт.

Литература

1. Кухарчик, Н.В. Схема производства оздоровленного посадочного материала земляники садовой / Н.В. Кухарчик, С.Э. Семенас // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Матвеев (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 плодоводства; 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 МичГАУ, 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* // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: В.И. Кашин [и др.]. – М., 2000. – Т. VII. – С. 55-61.

**IN VITRO PROPAGATION OF STRAWBERRY RELEASED CULTIVARS
'VIMA ZANTA' AND 'DUKAT'**

S.E. Semenas

ABSTRACT

The results of determination of the optimal concentration of benzyladenine in the medium during in vitro multiplication of two strawberry cultivars included into the State Register of Cultivars and Trees and Shrubs Varieties are presented. For 'Vima Zanta' is recommended to use Murashige-Skoog medium with the addition of 0.5 and 0.4 mg/l of benzyladenine, which allows to reach propagation coefficient of 9.78 and receive more than 20 % of well-developed regenerants. For cultivar 'Dukat' the optimal medium is MS, supplemented with 0.3 or 0.4 mg/l BA. The multiplication coefficient exceed 7, while the rate of plants ready for transferring to rooting medium above 30 %. Recommended concentrations of benzyladenine let to obtain a sufficient number of well-developed regenerants suitable for further propagation in vitro and for rooting, adaptation to non-sterile conditions and planting in the ground.

Key words: strawberry, 'Vima Zanta', 'Dukat', in vitro propagation, propagation coefficient, benzyl-adenine, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 11.04.2012