

СЕКЦИЯ 2.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ FRAGARIA× ANANASSA DUCH. (ROSACEAE) НА ПРИМЕРЕ РЕМОНТАНТНЫХ СОРТОВ

Навальнева Ирина Алексеевна

*заведующая лабораторией по клонированию декоративных деревьев,
цветов и кустарников цеха по благоустройству и озеленению № 1
Учебно-научного инновационного центра «Агротехнопарк»
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Белгородская государственная сельскохозяйственная академия
имени В.Я. Горина», г. Белгород
E-mail: irinavalneva@rambler.ru*

Буковцова Ирина Сергеевна

*научный сотрудник лаборатории по клонированию декоративных
деревьев, цветов и кустарников цеха по благоустройству
и озеленению № 1
Учебно-научного инновационного центра «Агротехнопарк»
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Белгородская государственная сельскохозяйственная академия
имени В.Я. Горина», г. Белгород
E-mail: sevatani@rambler.ru*

CLONAL MICROPROPAGATION FRAGARIA × ANANASSA DUCH. (ROSACEAE) AN EXAMPLE REMONTANT VARIETIES

Navalneva Irina A.

Head of laboratory cloning of ornamental trees, flowers and shrubs plant for landscaping and gardening № 1 Teaching and Research Innovation Center "Agrotechnopark" Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Belgorod State Agricultural Academy VJ Gorin", Belgorod

Bukovtsova Irina

Researcher at the laboratory cloning of ornamental trees, flowers and shrubs plant for landscaping and gardening № 1 Teaching and Research Innovation Center "Agrotechnopark" Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Belgorod State Agricultural Academy VJ Gorin", Belgorod

Работа выполнена в рамках договора № 1-04 от 10 мая 2012 «Получение оздоровленного посадочного материала в условиях in vitro на примере земляники садовой», заключенного между департаментом АПК Белгородской области и исполнительной дирекции ОГУ «Фонд УНАК».

АННОТАЦИЯ

В статье представлена информация о наиболее востребованных сортах ремонтантной земляники, о способах стерилизации. Нами были подобраны составы питательных сред для выращивания, развития и ризогенеза клонов земляники садовой.

ABSTRACT

The article provides information on the most popular varieties of strawberries remontant, methods of sterilization. We were picked up by the compositions of culture media for the cultivation, development and rhizogenesis clones strawberry.

Ключевые слова: *Fragaria* × *ananassa* Duch. (Rosaceae); земляника садовая; фитогормоны; эксплант; ремонтантность.

Keywords: *Fragaria* × *ananassa* Duch. (Rosaceae); strawberry garden; plant hormones; explants remontanant.

Интенсификация современного сельскохозяйственного производства требует широкого использования высокотехнологичных приемов. В частности, в садоводстве прослеживается четкая тенденция повышения требований к качеству посадочного материала и его сортименту. Это ставит задачи получения оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных растений, решение которых связано с необходимостью использования высоких технологий оздоровления и тестирования. С другой стороны, сокращение сроков создания новых генотипов с хозяйственно-ценными свойствами, ускорение их внедрения в производство, создание и содержание коллекций ценных форм также являются важными задачами сельскохозяйственной науки. [2, с. 5] Решению этих проблем может способствовать применение относительно новых биотехнологических приемов, которые до недавнего времени считались сугубо лабораторными [2, с. 6].

Для земляники садовой не отработаны приемы надежного получения растений-регенерантов в культуре пыльников, каллусов и других эксплантов типа листовых дисков.

Совершенствование техники культуры изолированных тканей и органов земляники садовой с учетом биологических особенностей и факторов культивирования, повышение их технологичности и эффективности, сочетание различных приемов оздоровления, клонального микроразмножения, хранения стерильных культур и тестирования, получение растений-регенерантов из различных тканей и органов существенно расширит возможности этих методов в системе производства оздоровленного посадочного материала и в селекционном процессе [6, с. 21].

Ремонтантная земляника для садоводов представляет особый интерес. Ее главной отличительной чертой является способность закладывать цветковые почки при высокой температуре и длительной протяженности светового дня. Отдача урожая продолжается до глубокой осени. Ягоды образуются не только на материнских, но и на молодых дочерних растениях, сформировавшихся в начале сезона [4, с. 4]. Сорты ремонтантной земляники, полученные отбором клонов неремонтантных сортов, имеют тенденцию ко второму плодоношению.

Целью нашей работы являлось внедрение техники клонального микроразмножения ремонтантных сортов *Fragaria* × *ananassa* Duch. (Rosaceae).

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись стерильные верхушечные столоны (усы) *Fragaria* × *ananassa* Duch. (Rosaceae). Были выбраны одни из наиболее востребованных ремонтантных сортов в настоящее время — «Вима-Рина» и «Елизавета II». Сорта отличаются хорошей зимостойкостью, качеством ягод, ярко выраженной ремонтантностью, ранним плодоношением и хорошей транспортабельностью.

Исследования по культивированию в условиях *in vitro* проводили в соответствии с методическими указаниями по культуре ткани и органов в селекции растений [7, с. 7—17].

У земляники материал для введения в культуру *in vitro* брали в конце сентября. У испытуемых сортов после отделения от материнского растения оставляли отрезки стебля, которые подвергали стерилизации различными дезинфицирующими агентами (табл. 1) [1, с. 8].

Таблица 1.

Стерилизация исходного растительного материала

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Время обработки, мин
Пергидроль	10—12	10—15
	20	
Дезэфект	≈30	5
		15
		30
		60
хлоргексидин	0,1	15—20

При введении в культуру, микроразмножении и укоренении использовали как безгормональную модифицированную среду Мурасиге-Скуга (MS), так и обогащенную фитогормонами (табл. 2) [3, с. 15]. Культивирование эксплантов осуществляли в световой комнате при длине дня 16 часов, освещенности 1—6000 люкс, температуре 25—27°С в течение 3—4 недель. Перед высадкой в теплицу растения промывали в 1 %-ом растворе КМnO₄. Растения высаживали в теплицу для адаптации: 100 % влажность, температура 35—45°С. Схема посадки — 6х6 см [5, с. 181].

Таблица 2.

Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования апикальных меристем земляники, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу	Никотиновая кислота	0,5
Хелат железа	5,0	Глюкоза	20.000
Аскорбиновая кислота	1,0	Агар-агар	7000
Тиамин	0,5	Пиридоксин	0,5

Обработка экспериментальных данных выполняли на основе методов математической статистики по Доспехову [3, с. 154].

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенными исследованиями выявлено, что успех введения в культуру тканей определяется эффективностью стерилизации. Как показал сравнительный анализ действия различных стерилизующих агентов, использование хлорсодержащих веществ обеспечивало достаточную стерильность материала.

Среди изученных агентов пергидроль 10—12 % обладал наименьшим стерилизующим эффектом, в основном грибная инфицированность эксплантов составляла 98 %. Количество стерильных проростков не превышало 2 %.

Применение раствора пергидроля с концентрацией примерно 20 % обеспечивало больший стерилизующий эффект материала — 60 %.

30 %-й раствор дезфекта показывает лучший результат при стерилизации объектов в течение 30 минут — 35 %. После воздействия дезфекта в течение 60 минут экспланты имели обширные площади повреждения.

Высокий стерилизующий эффект наблюдался так же после обработки материала 0,1 %-ым раствором хлоргексидина — 90 %. При его применении общая зараженность растений составляла 10 %. Использование раствора оказывало положительное действие на жизнеспособность проростков.

Важным фактором, имеющим значение для успешного микроразмножения, является гормональный состав питательной среды и вид экспланта. Решающую роль в этом играют концентрации и сочетание фитогормонов.

Наблюдения показали, что асептические проростки земляники садовой через 7—10 дней после посадки на ростовые питательные среды начинали активно расти. На среде без гормонов растения были слаборазвитые, при этом формировался один развитый побег высотой 2,0—4,0 см, коэффициент размножения не превышал 1 (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние гормонального состава питательной среды на рост и развитие растений земляники

№ среды	Состав среды (мг/л)	Развитие в баллах	Высота растения, см	Количество побегов на 1 растение (эксплант), шт	Коэффициент размножения
1	БАП, Гк, Кн по 0,1	3	2—5	1—2	2
2	БАП, Гк, Кн по 0,2	3	3—5	1—2	2
3	БАП 0,3 + НУК 0,1	4	2—6	1—2	3
4	БАП 0,4 + Гк 0,1	4	2—6	2—3	4
5	БАП 0,5 + ИМК 0,1	5	3—6	3—6	5
6	БАП 0,5 + ИУК 0,1	5	2—6	3—6	5
б/г (к)*	-	3	2—4	1	1

**б/г (к) — безгормональная среда (контроль)*

На средах № 1—4, дополненных БАП, гиббереллином, кинетином и НУК в различных сочетаниях и концентрациях наблюдался активный рост растений, их высота варьировала от 2 до 6 см. Количество побегов на 1 растение достигало трех, экспланты были сильно вытянутыми, поэтому коэффициент размножения был равен 2—4.

Отличительной особенностью было то, что на 4 среде с БАП и ГК растения характеризовались более высокой степенью развития, побеги были утолщенные, кустистые. Именно на этой среде коэффициент размножения равнялся 4.

На средах № 5, 6 содержащих БАП, ИМК/ИУК наблюдался интенсивный рост растений не только в высоту, но и хорошее развитие боковых побегов. При этом средняя высота растений составляла 2—6 см. Количество побегов на 1 растение составляло 3—6 штук, коэффициент размножения равнялся 5.

Следовательно, с одного введенного на питательную среду проростка можно получить до пяти хорошо развитых растений.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что добавление в питательную среду БАП 0,5 мг/л и ИМК (ИУК) 0,1 мг/л обеспечивает наиболее высокий выход хорошо развитых растений с одного введенного экспланта. Соответственно наиболее продуктивно использовать среды № 5, 6 для ускоренного микроразмножения земляники в культуре *in vitro*.

Полученный и размноженный в культуре *in vitro* селекционный материал необходимо укоренить для дальнейшего его использования в селекционном процессе. Укоренение образовавшихся в культуре *in vitro* растений связано с индуцированием адвентивных корней, которое достигается изменением гормонального состава питательной среды.

Проведенные исследования на землянике показали, что стимулирующее влияние на корнеобразование оказывала нафтилукуская кислота в концентрации 0,5 мг/л. Количество укоренившихся эксплантов составляло 30 %. Среднее число корней было равно 1—2 штук, размер составлял 1—2 см. Высота растений колебалась от 2 до 4 см. Было отмечено, что увеличение концентрации ИУК до 1,0 мг/л в питательной среде активизирует рост надземной части растений после образования корней, однако выход укоренившихся проростков равнялся 15 %. Максимальное образование корней (42 %) вызывала ИУК в количестве 1,5 мг/л, среднее число корней было равно 2—3 штук, размер составлял 2—3 см. Высота растений колебалась от 3 до 5 см (табл. 4).

Таблица 4.

Влияние физиологически активных веществ на ризогенез клонов земляники

Ростовое вещество	Концентрация, мг/л	Количество введенных эксплантов, шт.	Количество укорененных эксплантов, %	Среднее количество и длина корня, шт; см	Высота растения, см	
НУК	0,5	30	30	1—2; 1—2	2—4	
	1,0		15			
	1,5		42	2—3; 2—3	3—5	
	2,0		2	1—2; 1—2	1—2	
ИУК	0,5		0	0	0	
	1,0		0			
НУК+ИУК	0,2+0,2		0	0	0	0
	0,5+0,5		0	0		
	1,0+1,0		0			
ИМК	1,0		0	0	0	0
б/г (к)*	0		0	0		

Примечание: *б/г (к) — безгормональная среда (контроль)

Однако еще большее увеличение содержания гормона в среде (НУК 2,0 мг/л) оказывало негативное влияние на рост и развитие эксплантов, образования корней снизилось до 2 %. Добавление в питательную среду других гормонов и их сочетаний желаемых результатов не оказало. На контроле укорененных регенерантов не наблюдалось.

Выводы:

1. Оптимальным стерилизующим агентом для обеспечения стерильности и сохранения высокой жизнеспособности вводимого материала является раствор хлоргексидина в концентрации 0,1 %.
2. Добавление в питательную среду БАП 0,5 мг/л и ИМК (ИУК) 0,1 мг/л обеспечивает наиболее высокий выход хорошо развитых растений с одного введенного экспланта, что дает возможность использовать для ускоренного микроразмножения земляники в культуре *in vitro*.

3. Максимальное образование корней (42 %) вызывала НУК в количестве 1,5 мг/л, среднее число корней было равно 2—3 штук, размер составлял 2—3 см. Высота растений колебалась от 3 до 5 см.

В настоящее время оба ремонтантных сорта — «Вима-Рина» и «Елизавета II» выделены нами как наиболее перспективные сорта для дальнейшего клонального микроразмножения. Клоны, полученные от них, сейчас находятся на доращивании на питательных средах и в дальнейшем будут использоваться как маточники для получения оздоровленного материала.

Список литературы:

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. Пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 199. 160 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: дисс.... д. с.-х. наук. М: 1998. 321 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
4. Инновационные технологии возделывания земляники садовой: науч.-практ. изд. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. 88 с.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наукова думка, 1992. 232 с.
6. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 95 с.
7. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие / Составители: Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. М.: 2002, 45 с.