ПЛОДОВОДСТВО

УДК 58.084.1: 58.085

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ

Ксения Сергеевна Бердасова, Анастасия Сергеевна Пьянова, Татьяна Евгеньевна Лончакова

Ботанический сад-институт ДВО РАН,
690024 Россия, г. Владивосток, ул. Маковского, 142
E-mail: k.berdasova@mail.ru, berdasova_as@mail.ru, yashma135@mail.ru

Впервые разработан протокол микроклонального размножения для садовой земляники сорта Фреска из семян, включающий введение в культуру, размножение и укоренение. Объект исследования - земляника садовая сорта Фреска. Целью исследования послужило изучение влияния регуляторов роста и активированного угля на микроклональное размножение вышеуказанного сорта земляники садовой. Семена стерилизовали 0,1% раствором нитрата серебра, затем промывали раствором хлорида натрия, далее производили трехкратную промывку стерильной дистиллированной водой. Для проращивания семян использовали питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга без регуляторов роста ($МС^0$). Для исследования влияния регуляторов роста на развитие растений использовали питательные среды МС с добавлением 6-бензиламинопурина (МС+0,5 мг/л 6-БАП; МС+1,0 мг/л 6-БАП) и тидиазурона (МС+0,5 мг/л ТДЗ). В качестве контроля использовали $МС^0$. Культуральные сосуды помещали под холодный белый флуоресцентный свет, фотопериод 16/8 ч свет/темнота, температур 23±2°С. Для проращивания семян достаточно использовать питательную среду Мурасиге и Скуга без регуляторов роста. Эффективность стерилизации семян 0,1% раствором нитрата серебра была достаточно высокой и составила 97,5%. Однако, качество коммерческих семян было низким, и мы получили лишь 3,9% жизнеспособных сеянцев. Далее было изучено влияние вышеуказанных концентраций регуляторов роста на регенерационный потенциал сеянцев, с использованием в качестве базальной среды компонентного состава по прописи Мурасиге и Скуга. Показано, что применение тидиазурона приводит к некрозу тканей и полной гибели микрорастений, как при культивировании проростков, так и при пересадке на данную среду целых растений. А 6-бензиламинопурин положительно влияет на эффективность микроразмножения земляники садовой сорта Фреска. В нашем случае 6-бензиламинопурин приводил к увеличению коэффициента размножения и индукции ризогенеза (МС+0,5 мг/л 6-БАП). Следует отметить, что добавление в питательную среду активированного угля стимулировало рост микрорастений, но при этом снижался коэффициент размножения (1,0 мг/л 6-БАП). Образование корневой системы регистрировали у всех клонов, которые помещали на среду Мурасиге и Скуга базальную и с содержанием 6-бензиламинопурина.

Ключевые слова: *земляника садовая; микроклональное размножение; садоводство; регулятор роста растений; 6-бензиламинопурин; тидиазурон*

Введение

Земляника является одной из самых потребляемых и коммерчески ценных ягод [6]. Она богата витаминами и имеет высокий антиоксидантный потенциал [7, 10, 12]. Мировое производство земляники по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации (Food and Agriculture Organization) за 2020 г. составило почти 9 млн. тонн. По количеству произведенной земляники Россия входит в десятку лидеров [5]. Одним из популярных сортов в Приморском крае является сорт Фреска, который ценится за свои характеристики: скороспелость, высокая продуктивность, длительный срок плодоношения, плотная и сочная мякоть, размер плодов. Высокие декоративные качества и неприхотливость в уходе позволяют культивировать данный сорт в качестве горшечной культуры. Отдельным преимуществом сорта Фреска является высокая устойчивость к грибным заболеваниям, что особенно важно в условиях влажного климата. В настоящее время наряду с

традиционными методами получения посадочного материала все большую популярность приобретает метод микроклонального размножения, который имеет ряд преимуществ – получение генетически однородных растений, высокий коэффициент размножения, непрерывный цикл производства посадочного материала. Проведен ряд исследований по введению различных сортов земляники в культуру *in vitro* [2, 8, 9], однако, в качестве эксплантов чаще всего используются вегетативные части растения. В данном исследовании рассматривается микроклональное размножение земляники, полученной из семян, что может способствовать получению большого количества здорового растительного материала.

Цель исследования – изучение влияния регуляторов роста и активированного угля на микроклональное размножение земляники садовой сорта Фреска.

Материалы и методы

В качестве первичных эксплантов для получения стерильной культуры *in vitro* использовали коммерческие семена земляники садовой сорта Фреска («Дом семян», Санкт-Петербург). Семена стерилизовали 0,1% раствором нитрата серебра (время экспозиции 15 мин), используя орбитальный шейкер с настройками 200 оборотов в минуту. После проведения процесса стерилизации, семена обрабатывали для связывания ионов серебра стерильным 1% раствором хлорида натрия в течении 15 минут при постоянном перемешивании, далее производили трехкратную промывку стерильной дистиллированной водой (по 2 минуты).

Для проращивания семян использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга [11] без регуляторов роста ($МС^0$). Для исследования влияния экзогенных регуляторов роста на развитие растений, полученные микрорастения помещали на поверхность питательной среды МС с добавлением 6-бензиламинопурина (МС+0,5 мг/л 6-БАП; МС+1,0 мг/л 6-БАП) и тидиазурона (МС+0,5 мг/л ТДЗ). В качестве контроля использовали $МС^0$. Концентрация сахарозы во всех случаях составляла 3%, агара 0,6%. Значение pH растворов доводили до значения 5,7-5,8, используя 0,1N раствор KOH перед автоклавированием. Регуляторы роста добавляли после автоклавирования. Все работы были выполнены в ламинарном боксе БАВнп-01-"Ламинар-С"-1,5 (Lamsystems, Россия).

Культуральные сосуды находились под холодным белым флуоресцентным светом с освещенностью 2-3 тыс. лк. в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота и температуре 23±2°С. Субкультивирования эксплантов на свежие питательные среды проводили каждые 3-4 недели.

Результаты и обсуждение

На этапе получения стерильной культуры земляники садовой была показана высокая эффективность стерилизации 0,1% раствором нитрата серебра (97,5%). Однако, отмечена низкая жизнеспособность коммерческих семян – способность к прорастанию сохранило лишь 3,9% семян. Первые проростки регистрировали на 25 сутки культивирования, которые в дальнейшем показали высокую жизнеспособность и образовывали дочерние микрорастения. Первые настоящие листья у микрорастений земляники появились через 34 дня, тогда же растения пересаживали на питательные среды с содержанием регуляторов роста (МС+0,5 мг/л 6-БАП; МС+1,0 мг/л 6-БАП и МС+0,5 мг/л ТДЗ).

Используемые экзогенные регуляторы роста оказывают значительное действие на регуляцию органогенеза земляники садовой в условиях *in vitro*. Выявлено, что применение ТДЗ приводит к некрозу тканей и полной гибели растений, как при культивировании проростков, так и при пересадке на данную среду целых растений. Что не согласуется с данными R. Dwiyani с коллегами [4], где наилучшие результаты

отмечались на среде с применением ТДЗ по сравнению с применением 6-БАП. В нашем исследовании наилучшие результаты были получены на питательной среде с добавлением 6-БАП. При использовании данного регулятора роста мы наблюдали прямой органогенез, который в дальнейшем сопровождался образованием дополнительных побегов у растений. Это указывает на необходимость усовершенствования протокола микроклонального размножения для каждого сорта земляники.

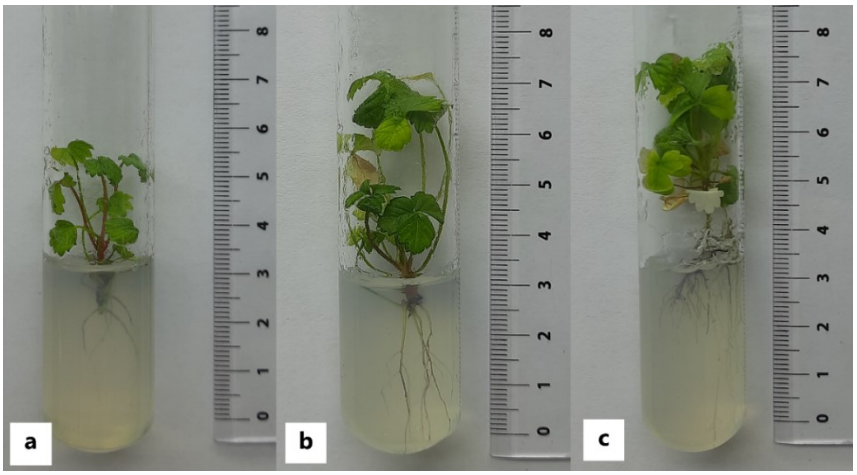

Рис. 1 Ризогенез земляники садовой сорта Фреска на среде МС^0 (a), на среде МС+0,5 мг/л 6-БАП (b, c)

В другом исследовании приведены данные по индукции ризогенеза при помощи индолил-3-масляной кислоты (ИМК), где показано положительное влияние данного регулятора роста на индукцию ризогенеза, размер и количество корней [3]. Однако, мы регистрировали образование корней на питательной среде МС^0 (рис. 1a). Корневая система полученных микроклонов была хорошо развита.

Использование питательной среды свободной от регуляторов роста для укоренения получаемых саженцев сокращает затраты при массовом получении посадочного материала, а, соответственно, снижает стоимость продукции.

К тому же мы отмечали процесс ризогенеза у всех микроклонов при культивировании на питательной среде МС+0,5 мг/л 6-БАП (рис. 1b, 1c), несмотря на то, что данная среда обычно используется для увеличения коэффициента размножения [1]. Длина корней на данной среде достигала 3-4 см. Развивалась хорошо сформированная корневая система.

Опираясь на исследования O.V. Subin [13], где наибольший процент корнеобразования растений-регенерантов был отмечен на среде с применением активированного угля, мы так же использовали модифицированную среду Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 и 1,0 мг/л 6-БАП и активированным углем в концентрации 10 г/л. Однако, в нашем исследовании применение активированного угля не всегда приводило к положительному результату. Так на среде МС+0,5 мг/л 6-БАП с углем наблюдали ингибирование роста и дальнейшую гибель растений. При повышении концентрации данного гормона до 1,0 мг/л и в сочетании с активированным углем растения развивались и образовывали дополнительные микроклоны, но с меньшим коэффициентом размножения по сравнению со средой без использования активированного угля, что наглядно продемонстрировано на рисунке 2.

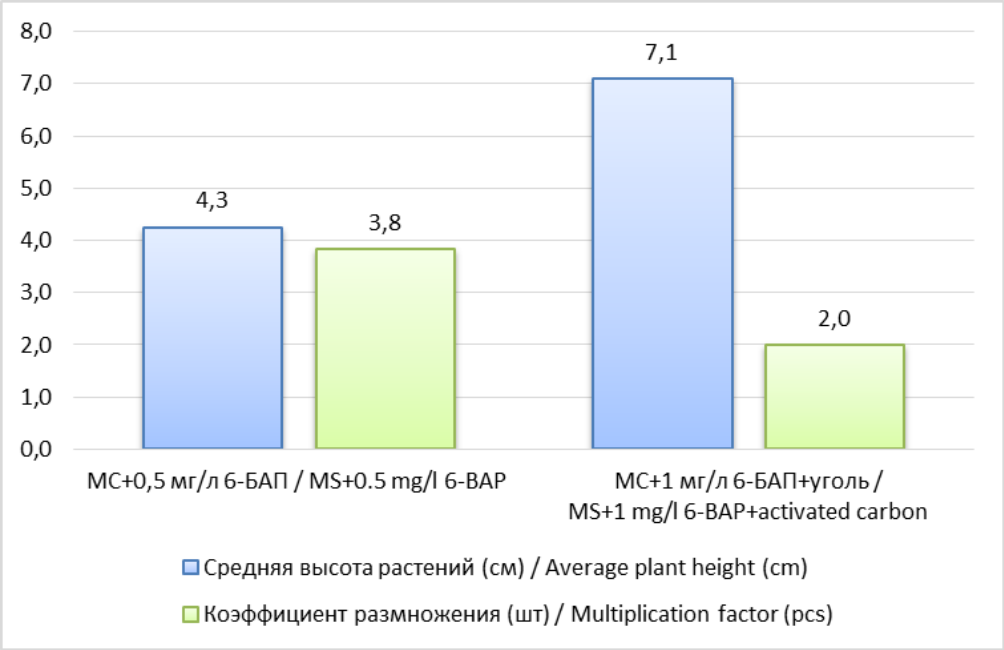

Рис. 2 Средние показатели высоты и коэффициента размножения земляники садовой сорта Фреска

Повышении концентрации 6-БАП в питательной среде приводило к подавлению пролиферации пазушных меристем. Вероятно, это обусловлено стрессовой реакцией микрорастений на избыточное присутствие экзогенного регулятора роста цитокининовой природы. Следует обратить внимание на высоту растений при культивировании на питательной среде с углем – растения значительно выше (рис. 2, 3). Таким способом можно регулировать высоту растений и при необходимости доводить микрорастения до нужного размера без применения экзогенных регуляторов роста, влияющих на вставочный рост клонов (например, гиббереллинов).

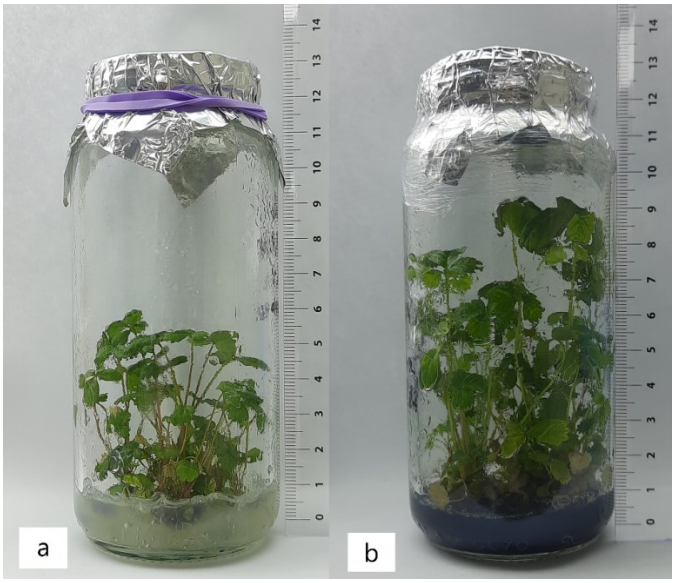

Рис. 3 Высота микрорастений земляники при культивировании на среде МС+0,5 мг/л 6-БАП (a) и МС+1,0 мг/л 6-БАП с активированным углем (b)

Используя разработанный протокол, можно также обеспечить большое количество микрорастений исследуемого сорта для получения высококачественного

посадочного материала и использования таких саженцев в коммерческих целях: продажа саженцев, масштабное производства плодов земляники, использование в озеленении и т.д.

Заключение

Использование семян в качестве первичного экспланта является хорошим способом для получения асептической культуры земляники. Применение этого метода ускоряет процесс получения асептической культуры земляники садовой. При получении проростков из семян на сеянцах в первые дни начинают образовываться корни и дочерние растения. Согласно нашим выводам для получения большого количества микроклонов земляники садовой сорта Фреска необходимо использовать 6-БАП. Данный регулятор роста также приводит к индукции ризогенеза. При необходимости удлинения побегов микроклонов следует добавлять активированный уголь в количестве 10 г/л среды. Применение ТДЗ приводит к гибели микрорастений. Это подтверждает необходимость тщательного подбора условий и разработки индивидуальных протоколов для микроклонального размножения разных сортов земляники.

Благодарности

Работа была выполнена на уникальной научной установке «Коллекция живых растений in vitro Ботанического сада-института ДВО РАН» (реестровый номер регистрации на сайте http://ckp-rf.ru – 347296) в рамках темы государственного задания «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии».
Регистрационный номер: 122040800086-1.

Список литературы

1. *Карпушина М.В.*, *Винтер М.А.* Микроклональное размножение земляники садовой // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2021. – № 31. – С. 108-113. DOI: https://doi.org/10.30679/2587-9847-2021-31-108-113.

2. *Мацнева О.В.*, *Ташматова Л.В.*, *Хромова Т.М., Шахов В.В.* Разработка протокола введения растений земляники в культуру in vitro // Вестник аграрной науки. – 2020. – № 5(86). – С. 45-50. DOI: https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2020.5.45.

3. *Ashrafuzzaman M.*, *Faisal S.*, *Yadav D.*, *Khanam D.*, *Raihan F.* Micropropagation of Strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture // Bangladesh journal of agricultural research. – 2013. – Vol. 38(3). – P. 467-472. DOI: https://doi.org/10.3329/bjar.v38i3.16973.

4. *Dwiyani R.*, *Yuswanti H.*, *Nyoman N.*, *Mayadewi A.*, *Fitriani Yu.* Runner-tip culture of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown on several shoot-induction medium // International journal of biosciences and biotechnology. – 2020. – Vol. 8(1). – P. 10-18. DOI: https://doi.org/10.24843/IJBB.2020.v08.i01.p02.

5. FAO (2023): Food and Agriculture Organization of the United Nations. – [Electronic source] – URL: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize

6. *Giampieri F.*, *Alvarez-Suarez J.M.*, *Gasparrini M.*, *Forbes-Hernandes T.Y.*, *Afrin S.*, *Bompadre S.*, *Rubini C.*, *Zizzi A.*, *Astolfi P.*, *Santos-Buelga C.*, *Gonzalez-Paramas A.M.*, *Quiles J.L.*, *Mezzetti B.*, *Battino M.* Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress // Food and chemical toxicology. – 2016. – Vol. 94. – P. 128-137. DOI: 10.1016/j.fct.2016.06.003.

7. *Gündüz K.* Strawberry: Phytochemical composition of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) // Nutritional composition of fruit cultivars. – Academic Press, 2016. – P. 733-752. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00030-1.

8. *Jhajhra S.*, *Dashora L.K.*, *Singh J.*, *Bhatnagar P.*, *Kumar A.*, *Arya C.K. In vitro* propagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // International journal of current microbiology and applied sciences. – 2018. – Vol. 7(10). – P. 3030-3035. DOI: https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.353.

9. *Kryukov L.A.*, *Vodolazhsky D.I.*, *Kamenetsky-Goldstein R.* Micropropagation of Grapevine and Strawberry from South Russia: Rapid Production and Genetic Uniformity // Agronomy. – 2022. – Vol. 12(2). – 308 p. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy12020308.

10. *Li Ch.*, *Wu H.*, *Masisi K.*, *Malunga L.N.*, *Song Yu.* Strawberries // Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. – Academic Press, 2020. – P. 423-435. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00026-X.

11. *Murashige T.*, *Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

12. *Padmanabhan P.*, *Mizran A.*, *Sullivan J.A.*, *Paliyath G.* Strawberries // Encyclopedia of food and health. – Oxford: Academic Press, 2016. – P. 193-198. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00667-X.

13. *Subin O.V.* Microclonal propagation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) Alina sort in culture *in vitro* // Biological Systems: theory and innovations. – 2016. – Vol. 1 (214). – P. 281-288.

Статья поступила в редакцию 28.08.2023 г.

Berdasova K.S., Pianova A.S., Lonchakova T.E. The effect of growth regulators on the effectiveness of micropropagation of strawberries // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2024. – № 151. – P. 40-45

For the first time, a protocol of microclonal propagation for garden strawberries of ‘Fresca’ cv. from seeds has been developed, including introduction to culture, reproduction and rooting. The object of the study is a strawberry of the garden cultivar ‘Fresca’. The objective of the study was to study the effect of growth regulators and activated carbon on microclonal propagation of the above-mentioned garden strawberry cultivar. The seeds were sterilized with a 0.1% solution of silver nitrate, then washed with a solution of sodium chloride, then washed three times with sterile distilled water. For seed germination, a nutrient medium was used according to the Murashige and Skoog recipe without growth regulators (MS^0). To study the effect of growth regulators on plant development, MS nutrient media with the addition of 6-benzylaminopurine (MS+0.5 mg/l 6-BAP; MS+1.0 mg/l 6-BAP) and thidiazuron (MS+0.5 mg/l TDZ) were used. MS^0 was used as a control. Culture vessels were placed under cool white fluorescent light, photoperiod 16/8 h light/dark, temperature 23 ± 2 °C. To germinate seeds, it is enough to use the Murashige and Skoog nutrient medium without growth regulators. The effectiveness of seed sterilization with 0.1% silver nitrate solution was quite high and amounted to 97.5%. However, the quality of commercial seeds was low and we received only 3.9% of viable seedlings. Further, the influence of the above concentrations of growth regulators on the regeneration potential of seedlings was studied, using a component composition according to Murashige and Skoog as a basal medium. The limiting factors in the microclonal reproduction of this strawberry cultivar are growth regulators and their concentrations. It is shown that the use of thidiazuron leads to tissue necrosis and complete death of microplants, both during the cultivation of seedlings and when transplanting whole plants to this medium. And 6-benzylaminopurine has a positive effect on the effectiveness of micro-propagation of strawberries of the garden cultivar ‘Fresca’. In our case, 6-benzylaminopurine led to an increase in the multiplication factor and the induction of rhizogenesis (MS+0.5 mg/l 6-BAP). It should be noted that the addition of activated carbon to the nutrient medium stimulated the growth of microplants, but at the same time the multiplication factor decreased (MS+1 mg/l 6-BAP). The formation of the root system was recorded in all clones that were placed on a Murashige and Skoog basal medium and containing 6-benzylaminopurine.

Key words: *strawberry; micropropagation; horticulture; plant growth regulator; 6-benzylaminopurine; thidiazuron*