

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД СОВРЕМЕННОГО ПИТОМНИКОВОДСТВА (ОБЗОР)

О.В. Мацнева , н.с.

Л.В. Ташматова, к.с.-х.н.


ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, mazneva@vniispk.ru

Аннотация

В статье рассматриваются основные вопросы, связанные с целесообразностью использования метода клонального размножения земляники садовой в системе производства посадочного материала плодовых и ягодных культур. Освещены технологические аспекты этапов микроразмножения, особенности культивирования эксплантов земляники *in vitro*. Обсуждены проблемы и перспективы метода клонального размножения земляники. Представлены некоторые результаты работы лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК. Интенсификация садоводства предполагает разработку новых эффективных технологий и включение их в систему производства оздоровленного посадочного материала. Метод клонального микроразмножения наиболее полно реализует потенциал растительного организма к размножению. Важным моментом является высокий коэффициент размножения. Для успешного размножения необходимо учитывать реакцию генотипа, влияние физиологических, гормональных и физических факторов. Клональное микроразмножение земляники можно разделить на четыре основных этапа: введение в культуру, собственно микроразмножение, укоренение и адаптация к нестерильным условиям. Для введения земляники чаще всего используется питательная среда Мурасиге – Скуга (Murashige – Skoog, 1962), дополненная 0,5 мг/л 6-БАП. Наиболее высокий коэффициент размножения обеспечивают среды с минеральной основой по рецептам Андерсона, Ли де Фоссарда и Мурасиге – Скуга. На этапе ризогенеза земляники наиболее часто применяемыми ауксинами являются ИМК (индолилмасляная кислота) в концентрации 0,5...1,0 мг/л и ИУК (индолилуксусная кислота) в концентрации 1,0 мг/л. Для укоренения используют разбавленную вдвое среду Мурасиге-Скуга с полным содержанием хелата железа и витаминов. Чередование питательных сред с минеральной основой по Боксю и Мурасиге-Скугу позволяет увеличить выход укорененных растений на первом этапе на 25% и повысить долю адаптированных к нестерильным условиям на 5%.

Ключевые слова: земляника, клональное микроразмножение, питательная среда, адаптация

CLONAL MICRO-PROPAGATION OF STRAWBERRIES IS A PROMISING METHOD OF MODERN NURSERY PRACTICE (REVIEW)

O.V. Matsneva , researcher
L.V. Tashmatova, cand. agr. sci.

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPК, mazneva@vniispk.ru

Abstract

The main issues related to the feasibility of using the method of clonal propagation of strawberries in the system of production of planting material of fruit and berry crops are considered in this article. Technological aspects of micro-propagation stages and peculiarities of strawberry explant cultivation *in vitro* are covered in the paper. Problems and prospects of clonal strawberry propagation are discussed. Some results of the work of the biotechnology laboratory at VNIISPК are given. Intensification of horticulture involves the development of new effective technologies and their inclusion in the system of production of healthy planting material. The method of clonal micro-propagation most fully realizes the potential of the plant organism for reproduction. A high multiplication factor is an important point. For successful reproduction it is necessary to take into account the reaction of the genotype, the influence of physiological, hormonal and physical factors. Clonal micro-propagation can be divided into four main stages: introduction to culture, micro-propagation itself, rooting and adaptation. Strawberries became the first culture for which the technology of plant regeneration in the culture of isolated apexes was developed. The nutrient medium Murashige-Skoog (1962) is more often used for strawberry introduction with the addition of 6-BAP 0.5mg/l. The nutrient media with the mineral base according to Anderson, Ly de Fossard and Murashige-Skoog provide the highest multiplication factor. At the stage of strawberry rhizogenesis, the most commonly used auxins are IBC (indolyl butyric acid) at a concentration of 0.5...1.0 mg/l and IAC (indolylacetic acid) at a concentration of 1.0 mg/l. For rooting, the Murashige-Skoog medium with a full content of iron chelate and vitamins is used. The alternation of the nutrient media with the mineral base according to Boxus and Murashige-Skoog allows to increase the yield of rooted plants in the first phase by 25% and to increase the proportion of adapted plants to non-sterile conditions by 5%.

Key words: strawberry, clonal micropropagation, nutrient medium, adaptation

Современные технологии производства плодов и ягод невозможны без развития питомниководства, обеспечивающего стабильность и конкурентоспособность отрасли садоводства в целом. Интенсификация садоводства предполагает разработку новых эффективных технологий и включение их в систему производства оздоровленного посадочного материала. Маточные и промышленные насаждения плодовых и ягодных культур, заложенные базисным и сертифицированным посадочным материалом, дают в 1,5...4,0 раза больше продукции, чем при использовании рядового материала (Головин, 2001). От качества посадочного материала зависит состояние и продуктивность маточников. По «Стратегии развития селекции и питомниководства плодовых, ягодных культур и

винограда в Российской Федерации на период до 2020 года» ежегодная потребность в базисном и сертифицированном посадочном материале плодовых и ягодных культур составляет более 5 млн. шт., в том числе земляники: базисного – 243,5 тыс. шт., сертифицированного – 243,5 тыс. шт., рядового – 84700 тыс. шт.

Метод клонального микроразмножения наиболее полно реализует потенциал растительного организма к размножению. Рост микроклонов в искусственных контролируемых условиях дает возможность элиминировать вирусы и болезни и получать оздоровленный посадочный материал. Высокий коэффициент размножения регенерантов в культуре *in vitro* также является существенным положительным моментом. Однако, на практике, воспроизводимость результатов низка. Сильнее, чем при традиционных способах размножения, проявляется реакция генотипов, существеннее влияние физиологических, гормональных и физических факторов, которые необходимо учитывать для успешного размножения (Матушкина, Пронина, 2001; Калашникова, 2007).

Основы метода размножения земляники в культуре тканей были разработаны Voxus (Voxus, 1974). В настоящее время этот прием включен в систему производства оздоровленного посадочного материала земляники. В мировой практике клональное микроразмножение земляники садовой применяется для быстрого и эффективного размножения отдельных форм и сортов из небольшого количества исходного материала, отбора *in vitro* на ранних стадиях развития, обмена растительным материалом без риска переноса карантинных объектов и для оздоровления от вирусов (Наделюев, 2002). Клональное микроразмножение земляники можно разделить на четыре основных этапа:

- Введение в культуру *in vitro* (выбор исходных растений; изолирование и стерилизация эксплантов; высадка на питательную среду). Важным моментом этого этапа является получение стерильной культуры, способной к успешной регенерации на питательной среде. Эффективность этапа зависит от типа стерилизующего агента, генотипа растения, сезона изоляции и физиологического состояния экспланта.
- Собственно микроразмножение путем стимуляции развития пазушных почек экспланта. На данном этапе важную роль играют генотип размножаемого растения, состав питательной среды, физические условия культивирования.
- Укоренение микропобегов. Успешность этапа определяется сортовыми особенностями, составом питательной среды и типом ауксина.
- Адаптация микрорастений к условиям *ex vitro* (перенос растений в субстрат в условиях влажной камеры).

Первичная культура *in vitro* определяет весь последующий технологический цикл клонального микроразмножения растений. Скорость инициации меристематических тканей, приводящих к образованию из них целых растений, зависит от темпов ее дифференциации. У разных генотипов она разная и определяется способностью эксплантов образовывать пазушные почки и быть готовыми к клонированию (Матушкина, Пронина, 2016). В качестве первичного экспланта при клональном микроразмножении земляники используют апикальные меристемы, которые изолируют и помещают на питательные среды с цитокининами. Для стерилизации растительного материала используют 0,1% и 0,01% растворы мертиолята, 0,1% раствор сулемы, 12% и 30% растворы перекиси водорода, гипохлорит натрия, этиловый спирт (Атрощенко, 2001; Сковородников, 2012; Кухарчик, 2016; Мацнева, 2019). Способность эксплантов к регенерации определяется состоянием материнского растения в период изолирования. Для земляники наилучшим периодом введения в культуру *in vitro* является фаза выхода растений из состояния покоя или начало активной вегетации, когда меристема обладает наибольшей способностью к регенерации (Муратова, 2015). В исследованиях лаборатории

биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК наибольшую жизнеспособность показали экспланты, введенные в культуру в позднезимний период (февраль). Высокая приживаемость меристем была обусловлена активизацией ростовых процессов у розеток земляники, вышедших из состояния покоя, после зимнего хранения. Получено в среднем по сортам 76,5% стерильных жизнеспособных эксплантов, пригодных для дальнейшего клонирования (Мацнева, 2018).

Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется составом питательной среды. Для введения земляники чаще всего используется питательная среда Мурасиге – Скуга (Murashige – Skoog, 1962), дополненная 0,5 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурина) (Матушкина, Пронина, 2019). Наиболее высокий коэффициент размножения обеспечивают среды с минеральной основой по рецептам Андерсона, Ли де Фоссарда и Мурасиге – Скуга (Куликов, 2010). Чередование питательных сред с минеральной основой по Боксю и Мурасиге – Скугу позволяет увеличить выход укорененных растений на первом этапе на 25% и повысить долю адаптированных к нестерильным условиям на 5% (Куликов, 2005). Для широкомасштабного производства посадочного материала земляники в системе размножения пригодна питательная среда Мурасиге – Скуга, которая отличается большим содержанием неорганического азота, стимулирующего процессы органогенеза (Расторгуев, 2012).

Реализация морфогенетического потенциала растений в значительной степени определяется регуляторами роста, прежде всего цитокининами. Для микроразмножения земляники чаще используется 6-БАП, проявляющий более высокую активность в поддержании роста тканей и индукции органогенеза (Шевелуха, 1998). У земляники садовой наблюдается высокая сортовая специфичность по отношению к концентрации регулятора роста 6-БАП в питательной среде, являющейся отражением эндогенного содержания ростовых веществ. Диапазон концентраций, рекомендуемых для сортов земляники находится в пределах 0,2...1,5 и зависит от генотипа, целей и стадии размножения (Семенов, 2000). Используемая концентрация 6-БАП должна обеспечивать высокий коэффициент размножения, но не вызывать соматических мутаций (Высоцкий, 2016).

На этапе ризогенеза земляники наиболее часто применяемыми ауксинами являются ИМК (индолилмасляная кислота) в концентрации 0,5...1,0 мг/л и ИУК (индолилуксусная кислота) в концентрации 1,0 мг/л. Для укоренения используют разбавленную вдвое среду Мурасиге-Скуга с полным содержанием хелата железа и витаминов (Матушкина, Пронина, 2001). Уменьшение в два раза концентрации минеральных солей в питательной среде снижает осмотическое давление, что является важным фактором для растущих корней. Земляника садовая часто формирует корни уже на среде размножения и высаживается на адаптацию, минуя этап укоренения. Семенов С.Э. (2000) рекомендует на этапе укоренения использовать среду без фитогормонов. Ряд ученых считает, что кратковременное воздействие ауксина на микропобеги оказывает большее стимулирующее влияние, чем постоянное его присутствие в питательной среде (Сулейманова, 2016). В лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК применяется способ пикировки микрорастений земляники, достигших высоты 1,5...2,0 см со среды размножения в стерильный грунт с использованием ИМК-содержащей пудры «корневин».

При проведении адаптации учитываются основные анатомические и физиологические факторы, отличающие растения *in vitro* от *in vivo*: слабое развитие проводящих сосудов ксилемы, отсутствие кутикулярного слоя воска, нефункционирующий устьичный аппарат. Для снижения транспирации растения высаживаются в стерильный субстрат в условия влажной камеры (влажность 95...98%). При переносе растений земляники в нестерильные условия эффективность адаптации достигает 80...100% в зависимости от генотипа

(Муратова, 2005). В лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК отрабатываются приемы адаптации земляники с постепенным снижением влажности путем перфорации укрывных контейнеров. За три года наших исследований через культуру *in vitro* прошло 19 сортов земляники отечественной и иностранной селекции: Царица, Урожайная ЦГЛ, Берегиня, Альфа, Соловушка, Студенческая, Фестивальная ромашка, Мальвина, Азия (Asia), Дарселект (Darselekt), Кимберли (Kimberli), Хоней (Honey), Фрида (Frida), Альба (Alba), Мармолада (Marmolada Onebor), Корона (Korona), Флоренс (Florence), Клери (Kleri), Ион сок, Рубино. Растения мериклонов были переданы отделу сорторазведения ФГБНУ ВНИИСПК для закладки оздоровленных маточников земляники.

Выращивание сертифицированного посадочного материала по технологии *in vitro* в производственных условиях экономически выгодно. Рентабельность рассады земляники достигает 115%, что подтверждает перспективность этих приемов для производства (Высоцкий, 2005). Однако, переход к масштабной технологии производства посадочного материала земляники *in vitro* требует решения ряда проблем: низкая регенерационная активность отдельных генотипов; витрификация тканей; заражение бактериями, паразитирующими в растительных тканях; существенные потери на всех этапах клонирования; трудности адаптации к условиям *ex vitro*; высокая себестоимость оздоровленных растений *in vitro*.

Литература

1. Атрощенко Г.П., Костицын В.В., Наделюев А.А. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. СПб: СПбГАУ, 2001. 13 с.
2. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Биотехнологические методы размножения ягодных культур. // Научно-практические достижения и инновационные пути развития производства продукции садоводства для улучшения структуры питания и здоровья человека: Министерство сельского хозяйства РФ. Мичуринск, 2008. С. 63-69.
3. Высоцкий В.А. Появление уклоняющихся форм при длительном культивировании ягодных растений *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. 45. С. 54-57.
4. Головин С.Е. Основы обеспечения фитосанитарного качества сертифицированного посадочного материала // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур. Материалы междунар. науч.-практ. конф. М.: ВСТИСП, 2001. С.52-53.
5. Инновационные технологии возделывания земляники садовой: науч.-практ. изд. / под ред. И.М. Куликова. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. 88 с.
6. Калашникова Е.А., Родин А.П. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии: Учебное пособие. Издание 2, исп. и доп. М.: МГУЛ, 2007. 73 с.
7. Куликов И.М., Высоцкий В.А., Шипунова А.А. Биотехнологические приемы в садоводстве: экономические аспекты // Садоводство и виноградарство. 2005. №5. С. 24-27.
8. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенас С.Э, Колбанова Е.В., Красинская Т.А., Волосевич Н.Н., Соловей О.В., Змушко А.А., Божидай Т.Н., Рундя А.П., Малиновская А.М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. / под общ. ред. Н.В. Кухарчик. Минск : Беларуская навука, 2016. 235 с.
9. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур и перспективы его использования // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. Мичурина. Тамбов, 2001. С.103-105.

10. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Регенерационная способность земляники в культуре изолированной ткани // Плодоводство и ягодоводство России. 2012. Т. 32, № 1. С.274-279.
11. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технологические аспекты размножения земляники *in vitro* // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019. Т. 6, № 1. С.74-77.
12. Мацнева О.В., Ташматова Л.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру *in vitro* // Современное садоводство - Contemporary horticulture. 2018. № 2. С.78-83. DOI: <https://doi.org/10.24411/2218-5275-2018-10210>
13. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Хромова Т.М., Шахов В.В. Введение сортов земляники в культуру *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т.56. С.29-36. DOI: <https://doi.org/10.31676/2073-4948-2019-56-28-34>
14. Муратова С.А., Хорошкова Ю.В. Клональное микроразмножение растений – перспективный метод современного питомниководства / Мат. конф. «Основы повышения продуктивности агроценозов». Мичуринск: ООО «Бис», 2015. С.367-373.
15. Наделюев А.Л. Совершенствование технологии производства оздоровленного посадочного материала в Ленинградской области: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2002. 16 с.
16. Расторгуев С.Л. Разработка приемов размножения земляники в системе *in vitro* // Вестник МичГАУ. 2012. № 1, Ч.1. С.10-13.
17. Семенас С.Э., Кухарчик Н.В. Методика клонального микроразмножения сортов земляники садовой // Плодоводство. 2000. Т.13. С.138-145.
18. Сковородников Д.Н., Леонова Н.В., Андропова Н.В. Влияние состава питательной среды на эффективность размножения земляники садовой *in vitro* // Вестник ОрелГАУ. 2013. № 1. С.89-92.
19. Стратегия развития селекции и питомниководства плодовых, ягодных культур и винограда в Российской Федерации на период до 2020 года. М., 2012. 43 с.
20. Сулейманова С.Д. Микроклональное размножение плодовых культур // *Wschodnioeuropean Czasopismo Naukowe*. 2016. №11, Ч.2. С.47-54.
21. Boxus P.H. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation // *Journal of Horticultural Science*. 1974. V.49, N3. P. 209-210. DOI: <https://doi.org/10.1080/00221589.1974.11514571>

References

1. Atroshchenko, G.P., Kostitsyn, V.V., & Nedelyuev, A.L. (2001). *Recommendations for production of healthy planting material of strawberry*. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg State Agrarian University. (In Russian).
2. Muratova, S.A., Shornikov, D.G., & Yankovskaya, M.B. (2008). Biotechnical methods of berry crop propagation. In *Scientific and practical achievements and innovative ways of development of horticulture production to improve the structure of nutrition and human health* (pp. 63-69). Michurinsk: Ministry of Agriculture of the Russian Federation.
3. Vysotskiy, V.A. (2016). The appearance of non true-type forms during long term *in vitro* cultivation of small fruit plants. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 45, 54-57. (In Russian, English abstract).
4. Golovin, S.E. (2001). Basics of ensuring phytosanitary quality of certified planting material. In *Industrial production of improved planting material of fruit, berry and flower-ornamental crops: Proc.sci. Conf.* (pp 52-53). Moscow: VSTISP. (In Russian).
5. Kulikov, I.M. (2010). *Innovative technologies of cultivation of strawberries*. Moscow: Rosinformagrotech. (In Russian).

6. Kalashnikova, E.A., & Rodin, A.P. (2007). *Obtaining planting material of woody and herbaceous plants using cellular and genetic engineering methods: Textbook*. Edition 2. Moscow: MGUL. (In Russian).
7. Kulikov, I.M., Vysotsky, V.A., & Shipunova, A.A. (2005). Biotechnological methods in horticulture: economical aspects. *Horticulture & viticulture*, 5, 24-27. (In Russian, English abstract).
8. Kukharchik, N.V., Kastritskaya, M.S., Semenas, S.E., Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovei, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P., & Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian).
9. Matushkina, O.V., & Pronina, I.P. (2001). Clonal micro propagation of fruit and berry crops and prospects of its using. In *The basic results and prospects of scientific investigations of I.V. Michurin VNIIS: Proc. Sci. Conf.* (pp. 103-105). Tambov: VNIIS. (In Russian).
10. Matushkina, O.V., & Pronina, I.N. (2012). Regeneration ability of strawberries in isolated tissue culture. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 32 (1), 274-279. (In Russian, English abstract).
11. Matushkina, O.V., & Pronina, I.N. (2019). Technological aspects for in vitro propagation of strawberry. *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*, 6 (1), 74-77. (In Russian, English abstract).
12. Mazneva, O.V., & Tashmatova, L.V. (2018). Optimization of the terms of strawberry in vitro introduction. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 2, 78-83. <https://doi.org/10.24411/2218-5275-2018-10210>. (In Russian, English abstract).
13. Matsneva, O.V., Tashmatova, L.V., Hromova, T.M., & Shakhov, V.V. (2019). The introduction of strawberry varieties into in vitro culture. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 56, 29-36. <https://doi.org/10.31676/2073-4948-2019-56-28-34>
14. Muratova, S.A., & Horoshkova, Y.V. (2015). Clonal micropropagation plants - perspective method of modern nursery-garden. In *The basis for improving the productivity of agroecosystems: Proc. Sci. Conf.* (pp. 367-373). Michurinsk: BIS. (In Russian).
15. Nadelyuev, A.L. (2002). *Improvement of production technology of healthy planting material in the Leningrad region (Agri. Sci. Cand. Thesis)*. Sankt Petersburg State Agrarian University, Sankt Petersburg, Russia.
16. Rastorguev, S.L. (2012). Development of strawberry propagation methods in system in vitro. *Bulletin of Michurinsk State Agrarian University*, 1(1), 10-13. (In Russian, English abstract).
17. Semenas, S.E., & Kukharchik, N.V. (2000). The optimization of methods of clonal micropropagation of orchard crops. *Fruit-growing*, 13, 138-145. (In Russian).
18. Skovorodnikov, D.N., Leonova, N.V., & Andronova, N.V. (2013). Influence of nutrient medium composition on efficiency of strawberry propagation in vitro. *Vestnik OrelGAU*, 1, 89-92. (In Russian).
19. Anonymous (2012). *Development strategy of breeding and nursery practice of fruit, berry crops and grapes in Russian Federation for the period till 2020, Moscow*. (In Russian).
20. Suleymanova, S.D. (2016). Microclonal propagation of fruit crops. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe*, 11(2), 47-54. (In Russian, English abstract).
21. Boxus, P.H. (1974). The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *Journal of Horticultural Science*, 49(3), 209-210. <https://doi.org/10.1080/00221589.1974.11514571>.