

С.Э. Семенас, научный сотрудник
Белорусский НИИ плодородства
УДК 634.75:581.16

Влияние концентрации бензиламинопурина на коэффициент размножения IN VITRO некоторых сортов земляники садовой

*Изучалось влияние различных концентраций бензиладе-
нина на клональное микро размножение in vitro 16 сортов зем-
ляники садовой. Была установлена оптимальная concentra-
ция для размножения изученных сортов.*

*The article studies the effect of various BA concentrations on
the clonal in vitro micro propagation of 16 varieties of straw berry.
The optimal concentration for the studied varieties propagation
has been established.*

Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук № 3, 2002

Введение

Метод клонального микроразмножения растений широко используется во всем мире для размножения более чем 100 видов растений [24]. Земляника была введена в культуру *in vitro* в 60-х годах; основы были заложены Р. Voxus [10]. К преимуществам этого метода относятся высокий коэффициент размножения и независимость работ от погодных условий и сезона, что позволяет получать нужное количество растений к определенному сроку. При этом возможно массовое размножение гибридных растений с сохранением генотипа, а также растений, вегетативное размножение которых традиционными способами невозможно или затруднено (например, при стерильности пыльцы). Немаловажно и то, что в культуре *in vitro* происходит оздоровление растений, в том числе от вирусных и фитоплазменных заболеваний, что позволяет получить здоровое потомство от инфицированных растений [6, 9, 13, 15]. Кроме того, в литературе имеются многочисленные сообщения о том, что растения-регенеранты отличаются повышенной жизнеспособностью, дают больший урожай и образуют большее количество усов на одно растение по сравнению с маточниками, размноженными традиционным способом [11, 12, 14, 30, 28]. Поэтому метод клонального микроразмножения *in vitro* используется прежде всего для производства суперэлитных маточных растений и постепенно замещает традиционный [9, 18]. Так, во Франции метод размножения земляники садовой *in vitro* является обязательным, а в Бельгии и Германии – факультативным, причем во всех развитых странах большинство маточных плантаций закладывается растениями, полученными *in vitro* [8, 21]. В различных научных учреждениях в культуре *in vitro* поддерживаются большие коллекции растений. Так, в Институте садоводства и цветоводства в г. Скерневице (Польша) в культуре *in vitro* сохраняется коллекция из 59 сортов земляники садовой [16], в Главном ботаническом саду России – около 200 сортов мировой коллекции [2]. Культура *in vitro* позволяет упростить обмен растениями без риска переноса карантинных инфекций и облегчает их транспортировку [23].

В то же время у растений, размноженных *in vitro*, иногда наблюдаются фенотипические изменения, которые могут быть следствием соматоклональных мутаций или влияния компонентов искусственных питательных сред [9, 19]. Отмечено, что риск таких нежелательных эффектов, как гиперцветение, измельчание плодов, хлороз листьев, возрастает с увеличением количества пассажей и при высоких концентрациях регуляторов роста [30, 31]. В мировой практике принято ограничивать число пассажей до 12, однако некоторые авторы рекомендуют ограничиваться 5 пассажами [5].

В процессе клонального микроразмножения *in vitro* выделяют три основных этапа: 1) инициация культуры *in vitro* и ее стабилизация; 2) этап собственно размножения *in vitro*; 3) укоренение *in vitro*, в некоторых случаях заменяемое укоренением *ex vitro*.

По литературным данным, земляника садовая в культуре *in vitro* может адаптироваться к средам с различным составом солей [22]. Для культивирования земляники садовой применяют питательные среды на основе макросолей Мурасиге – Скуга, Гамборга, Боксуса и др., дополненные фи-

тогормонами в различной концентрации. Так, на втором этапе в среду добавляют цитокинины, чаще всего бензиладенин (БА). Используются различные концентрации БА: 0,1 мг/л БА [4, 7,], 0,2, 0,3 0,7 мг/л [21], 0,4 мг/л [26], 1 мг/л [29], 2,0 мг/л [17, 20]. При этом сообщаемые значения коэффициентов размножения варьируют в широких пределах и не всегда прямо пропорциональны концентрации цитокининов.

Многие авторы сообщают о существовании сортовой и даже клоновой специфичности по отношению к концентрации физиологически активных веществ, в частности, цитокининов [1, 2, 3, 16, 21].

Целью настоящего исследования было определение оптимальной концентрации БА для получения достаточного количества хорошо развитых регенерантов за один пассаж применительно к некоторым сортам земляники садовой, содержащимся в коллекции *in vitro* в лаборатории биотехнологии БелНИИ плодоводства.

Материалы и методы

Работы были проведены в 1996–2001 гг. Объектами исследования служили регенеранты стабилизированных культур *in vitro* следующих сортов: Былинная, Вента, Вола, Дачница, Зенга-Зенгана, Кама, Кокинская ранняя, Красный берег, Нида, Павловчанка, Рубиновый кулон, Сириуш, Сюрприз де Галля, Тенира, Трубадур, Фейерверк, Фламинго. Изучалось влияние концентрации бензиламинопурина (БА) на коэффициент размножения и развитие растений *in vitro*. Использовалась питательная среда на основе микро- и макросолей Мурасиге-Скуга [25], дополненная витаминами В₁, В₆, РР (по 0,5 мг/л), 100 мг/л мезоинозитола, 4 г/л агар-агара и 30 г/л сахарозы при pH=5,7 с добавлением 0,1 мг/л индоллижмасляной кислоты (ИМК), 0,01 мг/л гибберелловой кислоты (ГА) и бензиламинопурина (БА) в концентрации 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 мг/л. В качестве контроля использовалась среда без добавления БА (среда 0). Регенеранты земляники садовой культивировались при освещенности 1,5–2 тыс. люкс, температуре 20–25 °С и световом дне 16 часов.

Второй этап размножения *in vitro* обычно состоит из нескольких пассажей. После того, как из высаженного на искусственную питательную среду растения-регенеранта образуется конгломерат растеньиц, он разделяется на одиночные микророзетки или более мелкие конгломераты в зависимости от размеров растеньиц. Полученный таким образом материал помещается на свежую питательную среду. Для определения коэффициента размножения подсчитывалось количество регенерантов, пересаженных из одной пробирки. Приводимые коэффициенты размножения являются средними по 3–5 пассажам.

Результаты исследований

Отмечено, что разные сорта неодинаково реагируют на одну и ту же концентрацию БА (табл.), что согласуется с литературными данными [1, 16, 21].

Для сорта Зенга-Зенгана наибольший коэффициент размножения отмечен на средах 0,2 и 1, для сорта Трубадур – 0,5 мг/л, для сорта Былинная – на средах с концентрацией БА от 0,2 до 0,5 мг/л (различия в коэффициентах размножения между этими средами недостоверны). Вента и Красный бе-

рег лучше размножаются при добавлении БА в концентрации 0,3–0,5 мг/л, Кама и Фламинго – при 0,5, Кокинская ранняя – при 0,7, Тенира, Нида и Вола – при 1 мг/л БА. Сорта Павловчанка и Рубиновый кулон размножались плохо, наиболее приемлемой для Павловчанки оказалась среда 0,7, для сорта Рубиновый кулон не удалось подобрать оптимальной концентрации БА. Для сортов Сириуш и Фейерверк можно рекомендовать среды с добавлением 0,3–0,5 и 0,2–0,3 мг/л БА соответственно. Наибольшие количества регенерантов на одно высаженное растение сорта Сюрприз де Галля наблюдались на средах 0,2 и 0,5, сорт Дачница лучше размножался на средах 0,5 и 1.

Установлено, что процесс размножения *in vitro* сортов Вента, Кокинская ранняя и Сюрприз де Галля угнетается при высоких концентрациях БА, что проявляется в уменьшении коэффициента размножения и высоком проценте некроза регенерантов (так, у сорта Вента на среде 0,7 доля пробирок с некрозом достигала в некоторых пассажах 60,0%, у сорта Кокинская ранняя на этой же среде – 61,54, у сорта Сюрприз де Галля на среде 1 – 14,30%). Однако у других изученных сортов земляники садовой при повышении концентрации этого цитокинина величина коэффициента размножения, как правило, возрастает, причем регенеранты развиваются хорошо и некроз практически не наблюдается.

Следует отметить, что фактическое число вновь образованных микророзеток выше, чем количество пересаженных на свежую среду, так как для пересадки отбирались только хорошо развитые розетки, а те, что образовывались из каллуса или были деформированы, отбраковывались по причине большей вероятности соматональных мутаций в регенерантах такого типа. При использовании относительно низких концентраций БА образование каллуса сводится к минимуму; на средах, содержащих БА в концентрации до 0,5 мг/л, каллус практически не образуется. На изученных средах практически не наблюдалось витрификации регенерантов, за исключением сортов Вента, Павловчанка и Кокинская ранняя на средах 0,7 и 1.

Немаловажно и то, что растения земляники садовой, полученные в культуре *in vitro* при использовании высоких концентраций фитогормонов, часто не зацветают в первый год после высадки в поле. В нашей практике, при использовании достаточно низких концентраций бензиламинопурина (0,2–0,5 мг/л), регенеранты часто цветут уже на первом этапе адаптации к нестерильным условиям, в климатической комнате. С другой стороны, в полевых условиях не отмечено и явления гиперцветения.

Вследствие вышеизложенного для размножения *in vitro* лучше использовать такие концентрации БА, которые не только обеспечивают большой коэффициент размножения за один пассаж, но и снижают до минимума риск возникновения соматональных мутаций, таким образом из нескольких концентраций БА следует выбирать наименьшую, обеспечивающую приемлемый коэффициент размножения, что согласуется с мнением некоторых авторов [21].

Как видно из таблицы, в некоторых случаях вследствие достаточно большого значения ошибки средней арифметической не представляется возможным сделать однозначный вывод об оптимальной концентрации БА. Такие результаты, вероятно, являются следствием неоднородности при отборе однородного растительного материала для опыта вследствие особенностей культуры *in vitro*. В конгломерате растений-регенерантов, образующемся в пробирке, растения имеют разный возраст, размер и степень развития; концентрация регуляторов роста в отдельных регенерантах зависит от положения растения в конгломерате. В результате после пересадки реакция отдельных регенерантов на состав среды, как качественная, так и количественная, варьирует в достаточно широких пределах [27].

Выводы

Установлена неоднородная реакция различных сортов земляники садовой на концентрацию бензиламинопурина в

Таблица. Зависимость коэффициента размножения земляники садовой от концентрации БА в питательной среде

Сорт	Коэффициент размножения за 1 пассаж при различных концентрациях БА, мг/л						
	0,0 (контроль)	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0
Былинная	1,00	-	4,55±0,54	5,30±0,03	4,06±0,47	-	-
Вента	1,00	1,09±0,02	3,76±0,47	4,39±0,89	4,17±0,61	1,00*	1,00*
Вола	1,00	1,33±0,07	4,96±0,77	5,92±0,62	4,64±0,41	-	13,61±0,78
Дачница	1,00	1,71±0,22	3,66±0,34	3,51±0,32	4,55±0,14	-	7,16±0,47
Зенга-Зенгана	1,00	2,00*	5,66±0,52	4,12±0,25	4,38±0,33	-	8,50±1,01
Кама	1,00	-	2,65±0,35	3,63±0,41	11,03±0,34	-	-
Кокинская ранняя	1,00	3,89±0,33	5,19±0,61	4,65±0,35	5,68±0,41	8,48±0,34	2,45±0,21
Красный берег	1,00	2,43±0,40	3,95±0,44	4,69±0,38	5,81±0,54	2,86*	-
Нида	1,00	3,72±0,52	7,09±0,45	9,97±0,80	4,50±0,61	-	20,70±1,17
Павловчанка	1,00	1,00*	1,00*	1,00*	-	3,03±0,90	-
Рубиновый кулон	1,00	-	2,68±0,74	2,61±0,48	2,03±0,25	-	-
Сириуш	1,00	-	2,91±0,77	3,56±0,26	4,59±0,72	-	-
Сюрприз де Галля	1,00	2,23±0,45	3,74±0,45	2,21±0,58	3,44±0,62	2,00*	3,25*
Тенира	1,00	1,27*	4,54±0,35	6,51±0,50	4,08±0,70	-	13,33±0,47
Трубатур	1,00	-	6,02±0,42	6,64±0,53	8,08±0,66	-	-
Фейерверк	1,00	3,60±0,28	4,60±1,24	4,09±0,98	2,83±0,62	-	-
Фламинго	1,00	-	3,65±0,56	1,89±0,12	5,00±1,54	-	-

Примечание. * – по техническим причинам выборка недостаточна для статистических расчетов

среде для размножения *in vitro*. Для клонального микро размножения изученных сортов рекомендуются среды с добавлением БА в следующих концентрациях: 0,2 мг/л (Зенга-Зенгана), 0,2–0,3 (Фейерверк), 0,2–0,5 (Былинная, Стурприз де Галля, Трубадур), 0,3–0,5 (Вента и Сириуш), 0,5 (Дачница, Кама, Фламинго), 0,7 (Кокинская ранняя) и 1,0 мг/л (Вола, Нида, Тенира).

Литература

- Джигадло М.И. Некоторые вопросы микроклонального размножения плодовых и ягодных культур // Пути интенсификации садоводства и селекции плодовых и ягодных культур. – Тула, 1989. – С. 129-134.
- Захаренкова И.А., Сучкова Н.К. Массовое размножение *in vitro* сортов садовой земляники. Создание банка *in vitro* сортов земляники мировой коллекции // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тезисы докладов. – Новосибирск, 1988. – Т.2. – С. 315-316.
- Иванова Й. Физиологические основы микроклонального размножения растений // Международный агропромышленный журнал. – 1990. – Т.3. – С. 35-40.
- Клоконос Н.П. Получение безвирусного посадочного материала ягодных культур // Микро размножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: Сб. научн. трудов ВНИИ садоводства им.И.В.Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С.23-25.
- Огольцова Т.П., Джигадло М.И. Апробация сортов земляники при микроклональном размножении // Садоводство и виноградарство. – 1988. – Т.11. – С. 26-29.
- Приходько Д.П. Оздоровление растений земляники от нематод, трахеомикозов и других системных патогенов методом культуры апикальных меристем // Селекция и агротехн. выращ. плод. и ягоды. культур в Ср. Пол. – 1989. – С.55-62.
- Рогозина Т.А., Колесниченко В.М. Использование метода культуры тканей при размножении земляники // Пробл. интродукции и экологии Центр. Черноземья. – Воронеж, 1997. – С. 133-135.
- Borkowska B. Mikrorozmnaianie truskawek // Ogronictwo. – 1997 – № 3. – P. 15-16.
- Boxus P. Assainissement des arbres fruitiers et du fraisier par culture de meristemes. Parasitica. – 1984. – V.40. – №2/3. – P. 139-154.
- Boxus P. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation // J. Hort. Sci. – 1974. – V.49. – P. 209-210.
- Cameron J.S., Hanckck J.F., Flore J.A. Enhanced vigor in vegetative progeny of micropropagated strawberry plants // Hort. Sci. – 1986. – V.21. – P. 1225-1226.
- Cameron J.S., Hancock J.F., Nourse T.M. The field performance of strawberry nursery stock produced originally from runners of micropropagation // Adv. Strawberry product. – 1985. – V.4. – P. 56-58.
- Dai O., He F.T., Liu P.Y. Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plant (*Morus alba*) with dwarf disease // Plant Pathol. – 1997. – V.46. – P.56-61.
- Damiano C. Strawberry Micropropagation // Proc. Conf. Nurcery production of fruit plant trough tissue culture. Application and feasibility. – April 21-23, 1980, Beltsville MD. – P. 11-22.
- Gabryszewska E., Kamieska M. Technika *in vitro* – metoda uwalniania roslin od fitoplazm czy tej metoda rozmnaiania fitoplazm? // Rozmnaianie roslin *in vitro*: Materiaiy konferencji. – 2001. – Skierniewice. – P. 29-35.
- Golis A., Korbin M., ĩurawicz E. Zastosowanie techniki *in vitro* w hodowli roslin sadowniczych // Rozmnaianie roslin *in vitro*: Materiaiy konferencji. – 2001. – Skierniewice. – P. 45-49.
- Hae-Boong Jeong, Ssang-Hee Ha, Kwang-Yoon Kang. *In vitro* multiplication of strawberry by vertical rotary culture of shoot tip // RDA J.agr.Sc.Biotechnol. – 1996. – V.38. – № 1. – P. 273-278.
- Jundnickel F. Strawberries (*Fragaria* spp and hybrids) / Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry / Crops II. Springer, Berlin Heidelberg New York. – 1988. – Vol.6. – P.38-103.
- Kondakova V. Biological and economic evaluation of strawberry plants recovered by tissue culture method // Plant science. – 1995 – V.XXXII. – № 4. – P. 55-57.
- Kwang-Yoon Kang, Ssang-Hee Ha, Hae-Boong Jeong, Jong-Sung Jeong, Su-Sung Lee. Study on the tissue culture on strawberry (*Fragaria x ananassa*) // RDA J.agr.Sc.Biotechnol. – 1994.-V.36. – №1. – P.196-200.
- Lopez Aranda J.M., Pliego Alfaro F., Lopez Navidad I., Barcelo Mucos M., Cermeco Sacriston P., Grana Enciso E., Jurado Grana F., Verdier Martin M., Flores Dominguez A., Moreza Reyes., Ruiz Bocanegra M., Sónchez Sevilla J., Media Munguez J.J. Micropropagacion de fresa. Estudio de los factores que afectan a la estabilidad fenotipica del material durante el proceso de multiplicacion. Valoracion agronomica de material obtenido / Resultados de los proyectos de investigacion terminados en 1992./ Inst.nac.de investigacion y tecnologia agraria y alimentaria. – Madrid, 1995. – T.1. – P. 133-138.
- Martinelli A.. Micropropagation of strawberry (*Fragaria* spp.) // Biotechnology in Agriculture and forestry. – 1992. – V.18 – P.334-370.
- Mullin R. H., Schlehel D.E. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets // Hort. Science – 1976 – № 11(2). – P. 100-101.
- Murashige T. Plant propagation by tissue culture. A practice with unrealized potential // Handbook of Plant Cell Culture. – 1990. – V.5. – P. 3-9.
- Murashige T, Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V.15. – P. 473-497.
- Neculae L., Teodorescu A. Contributii la stabilirea tehnologiei de inmultire *in vitro* a cinci soiuri de capsun // Lucr.sti. Inst.Cerc.Product.Pomic.Pitesti-Maracineni. – Bucuresti, 1994. – V.17. – P. 137-140.
- Orlikowska T. Sposoby poprawienia jakosci mikro-sadzzonek. // Rozmnaianie roslin *in vitro*. Materiaiy konferencji. – 2001. – Skierniewice. – P. 40-44.
- Petrevica L., Heimanis P. Effect of *in vitro* propagation on field behavior f two strawberry cultivars // Modern orchards: achievements and tendencies. – Babtai, 1997. – P.212-215.
- Riquelme C., Guicazъ M.E., Tizio R. Preacondicionamiento y aclimatation, en condiciones de invernaculo, de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid // Fyton. – 1991. – V.52. – № 1. – P. 73-81.
- Swartz M.J., Galletta G.J., Zimmerman R.H. Field performance and phenotypic stability of tissue culture – propagated strawberries // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1981. – V.106(5). – P.667-673.
- Swartz M.J., Lindstrom J.T. Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: commercialization of the technique // Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. – Nijhoff, Dordrecht, 1986. – P. 201-220.