

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×ananassa Duch.*), при введении в культуру *in vitro*

.....
**Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»**
=====

УДК 634.75

Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×ananassa Duch.*), при введении в культуру *in vitro*

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В.

Костромская государственная сельскохозяйственная академия

Аннотация

*Предмет исследования — земляника садовая (*Fragaria x ananassa Duch.*) сортов «Мишутка», «Привлекательная», «Красный берег», «Элиани», «Хоней», «Эльсанта», «Флора», «Альбион». Цель исследования: оценка влияния различных вариантов стерилизации и типов меристем на приживаемость эксплантов земляники садовой. Исследования проводили в 2018...2019 гг. на базе лаборатории биотехнологии растений ФГБОУ ВО Костромская ГСХА. В результате установлено, что приживаемость эксплантов, полученных из меристем апикальных почек надземного ползучего укореняющегося побега, на 6,34% выше, чем из пазушных. Оптимальная продолжительность стерилизации эксплантов — 10 минут. Для введения в культуру земляники садовой рекомендуем использовать меристемы апикальных почек ползучих побегов донорного растения, стерилизованных в течение 10 минут в 5%-ном водном растворе препарата «НИКА-экстра М», что обеспечивало приживаемость 73,0% эксплантов *in vitro* в питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 6-БАП (0,5 мг/л), с фотопериодом 16 часов и температурой воздуха 22,0 ± 2,0 °С.*

Ключевые слова: ЗЕМЛЯНИКА САДОВАЯ, FRAGARIA ANANASSA, ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ ТКАНЕЙ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ, ПРИЖИВАЕМОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ

Введение

Земляника садовая является распространенной культурой благодаря ценным диетическим качествам и экологической пластичности. В настоящее время введение в культуру тканей и оздоровление земляники садовой является ключевым моментом при

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×anapassa* Duch.), при введении в культуру *in vitro*

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
=====

производстве посадочного материала, так как позволяет в сжатые сроки получить необходимое количество безвирусных и генетически однородных растений.

Известно, что на приживаемость эксплантов влияет размер меристемы, календарный срок введения в культуру, химический состав препарата и продолжительность стерилизации исходного материала. Влияние оказывают и генотипические различия, обусловленные сортом [1, 2, 3].

Выделение изолированной меристемы размером менее 0,4...0,5 мм, как правило, позволяет освободить эксплант от вирусной инфекции. По мнению исследователей, это обусловлено тем, что в меристемах отсутствует проводящая ткань, поэтому вирусные агенты мигрируют по растению более медленно, используя симпластную и апопластную транспортные системы растения [4, 5].

В промышленном производстве безвирусного посадочного материала земляники садовой основным показателем эффективности является объем производства посадочного материала и его себестоимость, зависящие от количества прижившихся эксплантов, стоимости препаратов для стерилизации и производительности труда.

Jemmalı и др. установили морфологические и гормональные различия между эксплантами земляники, полученными из почек различного расположения на растении. В своем исследовании они отметили, что экспланты, полученные из апикальных почек, имели больший коэффициент размножения и более высокое содержание цитокининов сравнительно с эксплантами из пазушных [6].

Для стерилизации исходного материала земляники обычно применяется относительно недорогой гипохлорит натрия (NaOCl), обладающий бактерицидной и противовирусной активностью. Препарат «НИКА-экстра М» (алкилдиметилбензиламмоний хлорид) эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, ряда вирусов, грибковых заболеваний, плесневых грибов и обычно используется для стерилизации медицинских инструментов, поверхностей предметов. Публикаций по применению этого препарата на землянике нами не обнаружено.

Продолжительность экспозиции растительного материала в дезинфицирующем растворе рекомендуется от 10 до 20 минут, поскольку длительное воздействие на растительные клетки приводит к их гибели, а недостаточное — не освобождает от

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.), при введении в культуру *in vitro*

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

инфекции [1].

В связи с вышеизложенным **цель исследования** заключается в оценке влияния различных вариантов стерилизации исходного материала материнских растений и типов меристем на приживаемость эксплантов земляники садовой.

Объекты, материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2018...2019 гг. на базе лаборатории биотехнологии растений ФГБОУ ВО Костромская ГСХА Костромского района Костромской области. Объектом исследования являлась земляника садовая сортов «Мишутка», «Привлекательная», «Красный берег», «Элиани», «Хоней», «Эльсанта», «Флора», «Альбион». Ежегодно в начале июня из растений каждого сорта выделяли по 30 пазушных и 30 апикальных меристем из надземных ползучих побегов (рис. 1).

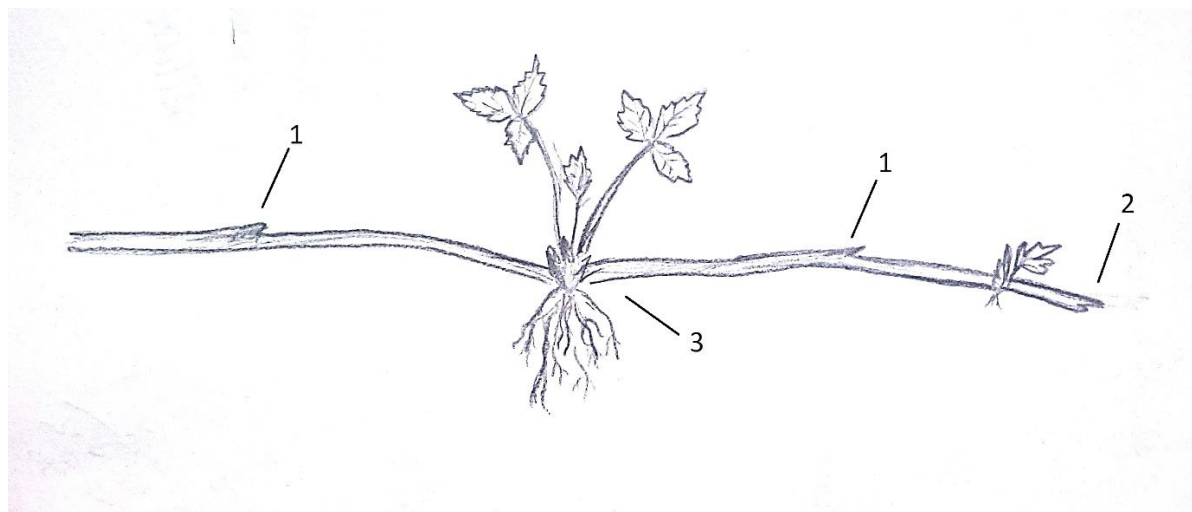


Рис. 1. Схема морфологического строения растения земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.). Надземный ползучий побег:

1 — пазушная почка; 2 — апикальная почка. 3 — укоренившаяся розетка

Отделенные от растения побеги помещали на 20 минут в раствор моющего средства Domestos (1 капля на 100 мл воды) с последующим многократным промыванием стерилизованной дистиллированной водой. Далее стерилизацию исходного материала проводили в зависимости от варианта опыта:

1. Гипохлорит натрия 5%-ный водный раствор, экспозиция 10 минут (контроль).
2. Гипохлорит натрия 5%-ный водный раствор, экспозиция 20 минут.

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×anapassa Duch.*), при введении в культуру *in vitro*

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

3. «НИКА-экстра М» 5%-ный водный раствор, экспозиция 10 минут.
4. «НИКА-экстра М» 5%-ный водный раствор, экспозиция 20 минут.
5. «НИКА-экстра М» 10%-ный водный раствор, экспозиция 10 минут.
6. «НИКА-экстра М» 10%-ный водный раствор, экспозиция 20 минут.

После стерилизации растительный материал промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 20 минут. Изоляцию меристем размером 0,5 мм проводили при помощи стереомикроскопа и препаровальной иглы. Экспланты помещали *in vitro* на питательную среду Мурасиге и Скуга [7] с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и культивировали в условиях световой комнаты с 16-часовым фотопериодом и температурой 22 ± 2 °С. Все работы производили в стерильных условиях ламинар-бокса.

Приживаемость эксплантов учитывали на тридцатые сутки культивирования. Математическую обработку результатов проводили на основе усредненных по сортам данным.

Результаты исследований

Анализ результатов исследования проводился по приживаемости эксплантов в зависимости от места расположения почки на побеге растения, ассортимента, концентрации и продолжительности экспозиции в препарате, применявшемся для стерилизации.

Расположение почки на стебле. В результате исследования установлено, что регенерационная способность эксплантов из меристем апикальных почек превышала таковую сравнительно с пазушными, в среднем по опыту, на 6,34%, в том числе при экспозиции 10 минут — на 5,57%, 20 минут — 7,12% (табл. 1). Исключение наблюдалось только в контрольном варианте, где приживаемость эксплантов из обоих типов почек была практически одинакова.

Судя по данным предыдущих исследователей [8], наблюдавшийся эффект связан с проявлением апикального доминирования, когда присутствие верхушечной почки подавляет активность боковых в результате синтеза в ней ауксинов и последующего транспорта их к основанию стебля. Следовательно, повышенная концентрация ауксинов и пониженное содержание цитокининов в пазушных почках препятствует процессам инициации и роста побегов растений, несмотря на присутствие цитокининов в питательной

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.), при введении в культуру *in vitro*

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

среде *in vitro*.

Таблица 1. Приживаемость эксплантов земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch) в зависимости от вариантов стерилизации, среднее за 2018...2019 гг.

Вариант стерилизации		Приживаемость эксплантов, %			В среднем по концентрации **
Стерилизующий агент	Концентрация, %/экспозиция, минуты	пазушные	апикальные	±, %*	
Гипохлорит натрия (контроль)	5/10	66,67	66,67	0,00	63,73 / 64,89
Гипохлорит натрия	5/20	60,78	63,11	2,33	
«НИКА-экстра М»	5/10	60,78	73,03	12,25	58,07 / 69,50
«НИКА-экстра М»	5/20	55,36	65,96	10,60	
«НИКА-экстра М»	10/10	57,80	62,26	4,46	53,90 / 60,34
«НИКА-экстра М»	10/20	50,00	58,42	8,42	
В среднем по опыту и экспозиции		58,57	64,91		
В среднем по экспозиции 10 минут		61,75	67,32		
В среднем по экспозиции 20 минут		55,38	62,50		

Примечание: * — разница приживаемости эксплантов апикальных меристем относительно пазушных; ** — приживаемость эксплантов (числитель — пазушных, знаменатель — апикальных).

Учитывая, что цитокинины снимают апикальное доминирование и индуцируют развитие пазушных почек [5, 8], можно сделать предположение, что использование питательных сред с повышенным относительно стандартного содержанием цитокининов позволит преодолеть негативный эффект и увеличить приживаемость и регенерационную способность пазушных эксплантов.

Продолжительность экспозиции. Увеличение продолжительности экспозиции с 10 до 20 минут отрицательно действовало на приживаемость эксплантов. В среднем по опыту этот показатель снижался на 5,60% (пазушные — на 6,37, апикальные — на 4,82%). Следует отметить, что угнетающее действие продолжительности экспозиции на экспланты из апикальных меристем было выражено несколько слабее.

Ассортимент и концентрация стерилизующего препарата. При сравнении эффективности препаратов в концентрации 5% (независимо от продолжительности

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×anapassa Duch.*), при введении в культуру *in vitro*

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
=====

экспозиции) наблюдалось снижение процента приживаемости эксплантов пазушных почек при стерилизации их препаратом «НИКА-экстра М». Однако этот же препарат оказал положительный эффект, сравнительно с гипохлоритом натрия, на приживаемость эксплантов из апикальных меристем.

Препарат «Ника-экстра М» при увеличении концентрации проявлял отрицательный эффект на приживаемость. Угнетающее действие повышения концентрации наблюдалось сильнее у апикальных эксплантов (9,16%), нежели у пазушных (4,17%).

В целом по опыту наибольший выход стерильных прижившихся эксплантов (73,03%) был получен при обработке апикальных эксплантов препаратом «НИКА-экстра М» (5%) в течение 10 минут. Во всех вариантах опыта, независимо от типа почек и состава дезинфицирующего препарата, стерилизация в течение 10 минут была предпочтительнее 20-минутной, вызывавшей повреждение растительных клеток.

Заключение

В результате исследования установлено, что приживаемость эксплантов, полученных из меристем апикальных почек, на 6,34% выше таковых из пазушных. Оптимальная продолжительность стерилизации эксплантов — 10 минут. Таким образом, при введении в культуру оздоровленного от вирусной инфекции исходного материала земляники садовой целесообразно использовать меристемы апикальных почек растений-доноров, выдержанные 10 минут в 5%-ном водном растворе препарата «НИКА-экстра М», что обеспечивало приживаемость 73,0% эксплантов в питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП, с фотопериодом 16 часов и температурой воздуха 22 ± 2 °С.

Список использованных источников

1. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: КолосС. – 2006. – 144 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России. – М. – 2011, т. 26. – С. 6-10.
3. Шевелуха В.С., Воронин Е.С., Калашникова Е.А. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учебник. – М.: Высш. шк. – 2008. – 710 с.

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×ananassa* Duch.), при введении в культуру *in vitro*

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
=====

4. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука. – 1983. – 96 с.

5. Белякова Л.В., Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В. Влияние некоторых факторов культивирования на развитие эксплантов земляники в процессе клонального микроразмножения // Садоводство и виноградарство. – 2010, № 2. – С. 23-26.

6. Jemmali A., Elloumi N., Kevers C. et al. Morphological and hormonal characterisation of strawberry vitroplants raised through axillary or stipular adventitious shooting // Plant Growth Regulation. – 38, 2002. – P. 273-278.

7. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962, v. 15, no. 13. – P. 473.

8. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология: в 3-х т. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Р. Сопера – 3-е изд. – М.: Мир. – 2004. – 436 с.

=====

Цитирование:

Бураменская М.В., Бородий С.А., Толоконцев Д.В. Приживаемость меристем, выделенных из почек надземного ползучего побега земляники садовой (*Fragaria×ananassa* Duch.), при введении в культуру *in vitro* // АгроЭкоИнфо. – 2020, №1. – http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2020/1/st_119.pdf.