

Е.Н. БАРСУКОВА, Т.Н. ЧЕКУШКИНА

Перспективы выращивания земляники садовой (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) в Приморском крае с использованием микрклонального размножения

Приведены результаты изолирования в культуру *in vitro* трех генотипов земляники ремонтантной нейтрального светового дня. Установлено, что сорта Мурано, Флорентина, Кабрилло отличаются по регенерационной способности и возможностям к микрклональному размножению. На этапе изолирования *in vitro* экспланты сорта Флорентина показали наиболее высокую жизнеспособность (80 %) и низкую контаминацию (20 %). Из изученных генотипов максимальной регенерационной способностью обладает сорт Кабрилло, у которого коэффициент размножения во втором пассаже составил 1 : 13,2.

Ключевые слова: земляника садовая, *in vitro*, микрклональное размножение, ремонтантный сорт, регенерационная способность, оздоровленный посадочный материал.

Prospects of growing garden strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) in the Primorsky Krai using microclonal propagation. E.N. BARSUKOVA, T.N. CHEKUSHKINA (Federal Scientific Center of Agrobiotechnology in the Far East named after A.K. Chaika, Ussuriysk, Timiryazevsky village).

The article presents the results of isolating three genotypes of perpetual strawberry with neutral daylight hours into *in vitro* culture. It was found that the varieties Murano, Florentina and Cabrillo differ in their regeneration capability and the possibility of microclonal propagation. At the stage of *in vitro* isolation, the explants of the Florentina variety showed the highest viability (80 %) and the lowest contamination (20 %). Of the studied genotypes, the Cabrillo variety is characterized by the maximum regeneration capability of 1 : 13.2 in the second passage.

Key words: garden strawberry, *in vitro*, microclonal propagation, propagation rate, everbearing variety, regeneration capability, improved planting material.

Введение

Земляника садовая – широко распространенная ягодная культура, отличающаяся способностью к быстрому вегетативному размножению, скороплодностью, высокой урожайностью и пластичностью [5]. Ценность земляники определяется ее высокими вкусовыми качествами, привлекательным видом и красивой окраской, а также богатым биохимическим составом и лечебными свойствами [9].

Валовое производство земляники в мире постоянно растет. В 2017 г. урожай земляники садовой составил 72 % валового сбора всех ягод в мире (9,7 из 13,4 млн т). Крупнейшими производителями земляники являются: Китай (3801,9 тыс. т), США (1420,6 тыс. т), Мексика (468,3 тыс. т), Египет (465,0 тыс. т), Турция (415,2 тыс. т). В России в 2016 г.

*БАРСУКОВА Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией, ЧЕКУШКИНА Татьяна Николаевна – младший научный сотрудник (Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск, пос. Тимирязевский).

*E-mail: enbar9@yandex.ru

собрано 197,5 тыс. т земляники. Лидером по производству ягод на душу населения является Белоруссия (9,21 кг/чел.). Россия по этому показателю занимает 29-е место (1,35 кг/чел.) [12]. В 2020 г. в России, по данным Минсельхоза, собрано 3,6 млн т плодов и ягод, что на 2,2 % выше показателя 2019 г.¹ Крупными производителями культуры в России являются Краснодарский и Ставропольский края, Республика Крым, Волгоградская, Ростовская, Московская, Липецкая, Воронежская, Белгородская, Рязанская, Нижегородская и Самарская области, республики Кабардино-Балкария, Адыгея и Татарстан.

В Приморском крае зарегистрировано более 80 тыс. личных подсобных хозяйств, 250 сельскохозяйственных организаций, 225 тыс. садовых хозяйств, 39 тыс. огородных участков и 532 дачных садоводческих и огороднических объединений, 830 КФХ и ИП, в которых земляника выращивается или может выращиваться в будущем. Государственная поддержка сельскохозяйственной отрасли исчисляется сотнями миллионов рублей. При этом плодово-ягодные хозяйства предоставлены сами себе². Чаще всего предприниматели, занимающиеся ягодным бизнесом, не имеют агрономического образования и учатся в процессе работы, зачастую на своих ошибках. Специалистов по данному профилю не хватает.

В связи с недостатком собственного посадочного материала при росте площадей земляничных плантаций Россия довольно активно импортирует рассаду земляники. По данным статистики, в 2018 г. в страну ввезено 17,7 млн экз. посадочного материала [11]. В Дальневосточном регионе и Приморском крае, в частности, питомники размножения посадочного материала земляники садовой отсутствуют. Сельхозпроизводители вынуждены приобретать и завозить рассаду из южных и центральных регионов России или из-за рубежа.

В Государственном реестре селекционных достижений за 2020 г. представлено 138 сортов земляники садовой, в том числе 17 ремонтантных, допущенных к выращиванию на территории России [3], из них в Приморском крае районированы пять сортов: Богота, Боровицкая, Коррадо, Орлец, Торос. В то же время количество сортов земляники отечественной и иностранной селекции постоянно растет и составляет, по разным источникам, 2500–4000. В край ежегодно завозятся и выращиваются новые, нерайонированные сорта земляники. В этой связи актуальным становится вопрос о научном сопровождении этой отрасли, включающем всестороннюю оценку ввозимых в край сортов земляники садовой на продуктивность, адаптивность, устойчивость к болезням и вредителям в наших климатических условиях.

Интенсивная технология возделывания земляники садовой наряду с подбором высокопродуктивных сортов подразумевает использование очищенного от комплекса патогенов посадочного материала. Такой материал обеспечивает повышение продуктивности агроценозов земляники в 3–5 раз и существенно снижает для производителей инвестиционные риски [7]. Одним из путей увеличения производства рассады земляники является микроклональное размножение, которое также способствует освобождению от болезней и вирусов и позволяет в короткие сроки получить большое количество здоровых растений. Ценность такого посадочного материала неизмеримо выше, чем вегетативно размножаемого. Маточные и промышленные плантации, засаждаемые базисным и сертифицированным посадочным материалом, максимально реализуют генетический потенциал сортов по сравнению с рядовым посадочным материалом [13].

Цель настоящего исследования – оценка регенерационной способности и биологических особенностей трех ремонтантных сортов земляники садовой нейтрального светового дня при размножении в условиях *in vitro*.

¹ <https://mex.gov.ru/press-service/news/v-rossii-sobran-rekordnyy-urozhay-plodov-i-yagod/> (дата обращения: 23.01.2021).

² <https://novostivl.ru/post/66453/> (дата обращения: 26.01.2021).

Материал и методика исследований

Объектом исследования являлась земляника садовая *Fragaria × ananassa* Duch., а именно: ремонтантные сорта нейтрального светового дня Мурано, Флорентина, Кабрилло. Маточные растения в ограниченном количестве (2–3 шт. каждого сорта) для микроклонального размножения предоставлены тепличным хозяйством Приморского края. Сорта не внесены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ.

Ремонтантный сорт земляники садовой нейтрального светового дня Мурано (Murano) выведен в Италии в 2005 г. Ягоды крупные, плотные, конической формы, с отменным вкусом и ароматом, хорошо транспортируются и хранятся. Сорт Мурано обладает устойчивостью к большинству болезней и вредителей, особенно к пятнистостям и паутинному клещу. Устойчив к низким температурам. К недостаткам сорта можно отнести слабое образование усов. Сорт хорошо подходит для выращивания в туннелях и контейнерах³.

Флорентина (Florentina) – сорт земляники, выведенный в Нидерландах в 2011 г. Ягода темная, красно-бордового цвета, по форме напоминает раздутый конус, пригодна для транспортировки на большие расстояния (лежкость ягод до 5–7 сут). Средняя масса ягод в первой волне урожая – около 30 г, во второй увеличивается до 40–50 г. Ягоды чрезвычайно сладкие, с едва уловимой освежающей кислинкой и характерным ароматом. Первый

Таблица 1
Состав питательной среды для микроклонального размножения земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.)

Компоненты среды	Концентрация, мг/л
Макроэлементы:	
CaCl ₂ безводный	440
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
Fe-хелат: FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA × H ₂ O	37,3
Микроэлементы:	
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KJ	0,83
MnSO ₄ × H ₂ O	16,9
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6
Мезоинозит	100
Пиридоксин × HCl	0,5
Тиамин × HCl	0,5
Аскорбиновая кислота	0,5
Глицин	2,0
6-бензиламинопурин (БАП)	0,5
Индолилмасляная кислота (ИМК)	0,1*
Сахароза	20 000
Агар	6000

*ИМК для ризогенеза добавляли в среду в количестве 0,5 мг/л, исключали при введении *in vitro*.

³ <https://sort-klubnika.ru/sorta/klubnika-sort-murano-odna-iz-samyh-yarkih-novinok/> (дата обращения: 25.01.2021).

урожай снимают в середине июня, сорт плодоносит до конца сентября (до первых заморозков). К недостаткам сорта относятся подверженность растений болезням и вредителям, а также низкая холодоустойчивость (выдерживает морозы до -10°C и нуждается в тщательном укрытии на зиму). В дождливую погоду существует риск загнивания корневой системы и ягод⁴.

Сорт Кабрилло (Cabrillo) выведен американскими селекционерами в 2009 г. Это один из лучших сортов ремонтантной земляники, имеющий рекордную урожайность – до 3 кг с растения. Ягоды у сорта Кабрилло средние и крупные, их масса составляет около 30 г, обладают отличным вкусом и привлекательным видом, лежкие, хорошо транспортабельные. Форма ягод симметричная, коническая, немного сплюснута (расширена по бокам). Окраска классическая ярко-красная. К минусам сорта можно отнести уязвимость к фитопторозу, требовательность в уходе, отсутствие информации о холодоустойчивости в условиях открытого грунта⁵.

Исследования проводились в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки» с применением общепринятых приемов работы с культурами изолированных тканей и органов растений *in vitro* [1, 8]. В качестве эксплантов использовали апексы из побегов-усов земляники. Стерилизацию отрезков усов осуществляли в мыльном растворе в течение 30 мин, затем в течение 30 мин промывали в проточной воде. Далее в условиях ламинар-бокса экспланты погружали сначала на 1 мин в 70%-й раствор этанола, затем на 3 мин в 0,1%-й раствор диоксида (с добавлением 1–2 капель Твина-80 на 1 л) и 3–4 раза промывали дистиллированной водой.

При микроклональном размножении земляники садовой использовали среду с минеральной основой по Мурасиге–Скугу [14], дополненную фитогормонами 6-бензиламинопурином (БАП) и индолилмасляной кислотой (ИМК) [9] (табл. 1).

Культивирование эксплантов земляники осуществляли в световой комнате при продолжительности дня 16 ч, освещенности 5,0 клк, температуре $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Статистическую обработку данных проводили с использованием средней арифметической (\bar{x}), ошибки средней арифметической ($S\bar{x}$), критерия Стьюдента (t) [4].

Результаты и обсуждение

В настоящее время среди производителей ягод земляники садовой и дачников Приморского края популярны ремонтантные сорта нейтрального дня, которые с успехом выращиваются в условиях как открытого, так и защищенного грунта. Сорта земляники садовой Мурано, Флорентина, Кабрилло были введены в культуру *in vitro* с целью ускоренного размножения для интродукции в условия Приморского края.

В табл. 2 приведена информация об эффективности применения 0,1%-го раствора диоксида на этапе изолирования эксплантов земляники *in vitro*. Максимальное число жизнеспособных, свободных от патогенных микроорганизмов меристем получено у земляники сорта Флорентина – 80 %. У эксплантов сортов Кабрилло и Мурано частота контаминации была выше – 36,4 и 42,9 % соответственно.

На этапе введения в культуру *in vitro* активизацию ростовых процессов у изолированных апексов земляники наблюдали через неделю культивирования на питательной среде с цитокинином (БАП). Спустя 3–4 недели в нижней части апексов происходило формирование адвентивных побегов, которые далее разделяли и пересаживали на свежую питательную среду (см. рисунок, а). Культивирование эксплантов на питательной среде с БАП

⁴ <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/yagody/sort-klubniki-florentina-florentina-foto-opisanie-i-otzyvy.html> (дата обращения: 25.01.2021).

⁵ <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/yagody/opisanie-i-harakteristiki-remontantnoy-klubniki-cabrillo-kabrilo.html/> (дата обращения: 25.01.2021).

Результаты изолирования эксплантов ремонтантных сортов земляники садовой нейтрального светового дня в культуру *in vitro*

Сорт	Изолировано в культуру <i>in vitro</i> , шт.	Число жизнеспособных эксплантов, без инфекции		Частота контаминации, %
		шт.	%	
Мурано	14	8	57,1	42,9
Флорентина	10	8	80,0	20,0
Кабрилло	11	7	63,6	36,4

в течение первого пассажа способствовало пролиферации множественных почек и побегов размером 5–10 мм.

Регенерационная способность изученных сортов земляники представлена в табл. 3. В первом пассаже максимальное количество почек в среднем на 1 эксплант составляло 2,0 для сортов Мурано и Флорентина, 7,2 – для сорта Кабрилло. Начиная со второго пассажа наблюдалась регенерация побегов размером более 10 мм (см. рисунок, б). В процессе микроразмножения в одном конгломерате одновременно присутствовали почки и побеги разной длины. Пониженное содержание в регенерационной среде ИМК (0,1 мг/л) в сочетании с БАП (0,5 мг/л) способствовало индукции побегообразования и спонтанному ризогенезу (см. рисунок, в). Количество почек и побегов во втором пассаже возросло и составило у сорта Мурано и Флорентино 3,0, у сорта Кабрилло – 13,2 шт. на 1 эксплант. У сорта Флорентина образовалось в среднем 1,2 побега на 1 эксплант, способных к образованию корневой системы, у сорта Кабрилло – 1,8 (табл. 3). В эксперименте с учетом числа введенных *in vitro* неинфицированных эксплантов за два пассажа культивирования максимальное число готовых к укоренению побегов (размером более 25 мм) получено у сорта Кабрилло – 90,72 шт. Для сорта Флорентина этот показатель был в 4,7 раза, для сорта Мурано в 21 раз меньше. Такие побеги отделяли от остальных и для укоренения пасировали на среду, содержание ИМК в которой увеличивали до 0,5 мг/л, БАП из состава питательной среды исключали. Через 30 дней 100 % растений-регенерантов земляники формировали корневую систему и были готовы к переводу *ex vitro*.

Коэффициент размножения в культуре *in vitro* в значительной мере определяется генотипом растений. Необходимость подбора концентраций биологически активных веществ питательной среды для вновь вводимых сортов вызвана тем, что у земляники садовой особенно высока сортовая специфика по отношению к концентрации регуляторов роста. Различная реакция сортов вызвана эндогенным содержанием ростовых веществ в самом растении, которое является генетически обусловленным признаком не только вида, но и



а

Морфогенез земляники садовой в культуре *in vitro*: а – образование адвентивных побегов, б – пролиферация множественных почек и побегов, в – ризогенез



б



в

Регенерационная способность ремонтантных сортов земляники садовой нейтрального светового дня на среде с БАП (0,5 мг/л) в культуре *in vitro*

Сорт	Число введенных <i>in vitro</i> эксплантов	Образовалось в среднем, шт. на 1 эксплант $\bar{x} \pm S\bar{x}$			Получено регенерантов, готовых к укоренению, шт. \bar{x}
		1-й пассаж*	2-й пассаж		
		почек	почек	в том числе побегов, готовых к укоренению	
Мурано	8	2,0 ± 0,27	3,0 ± 0,25	0,27 ± 0,18	4,32
Флорентина	8	2,0 ± 0,33	3,0 ± 0,64	1,2 ± 0,26	19,2
Кабрилло	7	7,2 ± 0,36	13,2 ± 0,56**	1,8 ± 0,35	90,72

*Пассаж составлял 30 сут.

** $P \leq 0,05$.

сорта [2]. Поэтому исследователи вынуждены проводить поиск оптимальных условий, учитывая особенности конкретного сорта при микроклональном размножении [6, 10].

В проведенном исследовании состав среды и условия культивирования *in vitro* были идентичными для всех генотипов. Выявленные у исследованных сортов земляники различия в регенерации и размножении в культуре *in vitro* могут быть связаны с биологическими особенностями, в частности со способностью к усообразованию. В обычных условиях сорта Мурано и Флорентина характеризуются образованием незначительного количества усов, этот признак контролируется на генетическом уровне. Возможно, поэтому при культивировании *in vitro* у данных генотипов способность к регенерации адвентивных побегов была ниже, чем у сорта Кабрилло, растения которого формируют большое количество усов.

Эксперименты по изолированию земляники садовой в культуру *in vitro* были начаты в октябре 2019 г. С помощью микроклонального размножения удалось к июню 2020 г. ускоренно размножить и передать для выращивания тепличному хозяйству 2000 растений земляники сорта Кабрилло, также реализовать садоводам-любителям более 100 шт. рассады сортов Мурано, Флорентина, Кабрилло.

Заключение

Таким образом, в результате исследования выявлено, что ремонтантные сорта нейтрального светового дня Мурано, Флорентина, Кабрилло отличаются по регенерационной способности и возможностям ускоренного микроклонального размножения в условиях культуры *in vitro*. На этапе изолирования в условия *in vitro* экспланты сорта Флорентина показали наиболее высокую жизнеспособность (80 %) и низкую контаминацию (20 %). Из изученных генотипов максимальной регенерационной способностью в культуре *in vitro* обладает сорт Кабрилло, у которого коэффициент размножения во втором пассаже составил 1 : 13,2. Для культивирования в условиях защищенного грунта в Приморском крае перспективным является сорт земляники садовой Кабрилло, который характеризуется ускоренным размножением в условиях *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
2. Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Земляника и клубника. М.: Проспект, 2016. 318 с.
3. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. М.: Росинформагротех, 2020. 680 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Стереотип. изд. М.: Альянс, 2014. 351 с.

5. Инновационные технологии возделывания земляники садовой / сост. В.А. Высоцкий, Л.В. Алексеенко, Л.А. Марченко и др. М.: Росинформагротех, 2010. 88 с.
6. Князева И.В. Клональное микроразмножение сортов земляники садовой // Вестн. науч. конф. 2016. № 2–6 (6). С. 52–53.
7. Козлова И.И. Система производства высокопродуктивной рассады земляники с программируемыми параметрами качества // Плодоводство и ягодоводство России. 2008. Т. 18. С. 183–187.
8. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенов 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*. Минск: Беларус. наука, 2016. 235 с.
9. Линник Т.А. Повышение эффективности способов размножения сортов земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.), характеризующихся низкой усообразующей способностью: дис. ... канд. с.-х. наук. М., 2014. 141 с.
10. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Орлова Н.Ю., Шахов В.В. Микрклональное размножение земляники садовой // Селекция и сортоведение садовых культур. 2017. Т. 4, № 1/2. С. 93–96.
11. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Хромова Т.М., Шахов В.В. Разработка протокола введения растений земляники в культуру *in vitro* // Вестн. аграр. науки. 2020. № 5 (86). С. 45–50.
12. Ожерельев В.Н., Ожерельева М.В., Гринь А.М., Сомин В.В. Динамика производства ягод земляники садовой по странам мира // Вестн. Брян. ГСХА. 2019. № 4 (74). С. 60–66.
13. Трунов Ю.В., Соловьев А.В., Козлова И.И., Муратова С.А. Технология выращивания высококачественного посадочного материала плодовых и ягодных растений. Мичуринск: БИС, 2018. 243 с.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. of Plant.* 1962. Vol. 15, N 13. P. 473–497.