

УДК 581.085

И.Д. Бородулина<sup>1</sup>, Т.В. Плаксина<sup>2</sup>**АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ  
СОРТА МОСКОВСКИЙ ДЕЛИКАТЕС К УСЛОВИЯМ EX VITRO**

ФГБОУ ВПО Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия.

Email: [borodulina.irina@gmail.com](mailto:borodulina.irina@gmail.com)

ФГБНУ «НИИСС имени М.А. Лисавенко», Барнаул, Россия.

Email: [tplaksina@mail.ru](mailto:tplaksina@mail.ru)

Адаптацию растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес после условий *in vitro* проводили на гидропонной установке «Минивит 0,35» и в прокаленном речном песке. Регенеранты, адаптированные на гидропонной установке характеризовались интенсивным развитием побегов и листьев, которые в 1,5–2 раза превышали таковые показатели у регенерантов, адаптированных в песке. При этом корневая система, сформированная в условиях гидропоники, имела корни второго порядка. Перед посадкой в грунт растения-регенеранты обрабатывали 0,1% раствором сульфата хитозана и ультразвуком. Ультразвуковое облучение проводили с помощью аппарата «Волна» с частотой механических колебаний  $22 \pm 1,65$  кГц. Опрыскивание листьев 0,1% раствором сульфата хитозана практически не повлияло на рост и развитие растений. Замачивание корневой системы в этом же растворе также незначительно повышало количество усов (на 1,75 шт.) и листьев (на 0,35 шт.), длину усов (на 1,86 см) и достоверно увеличивало высоту розетки на 1,79 см. Обработка растений ультразвуком в течение 10 минут незначительно повышала количество усов (на 1,54 шт.) и их длину (на 1,26 см) и достоверно увеличивала высоту розеток (на 1,79 см). Поставленный эксперимент для оценки способности к размножению растений земляники садовой, полученной традиционным способом и *in vitro* показал, что растения, размноженные *in vitro* формировали  $6,43 \pm 0,99$  шт. усов на розетку, а размноженные традиционным способом усов не имели.

Ключевые слова: регенеранты, адаптация к условиям *ex vitro*, гидропонная установка, раствор сульфата хитозана, ультразвук.

I. D. Borodulina<sup>1</sup>, T.V. Plaksina<sup>2</sup>**EX VITRO ADAPTATION OF REGENERATED STRAWBERRY  
(MOSCOW DELICACY VARIETY)**

Altai State University, Barnaul, Russia.

Email: [borodulina.irina@gmail.com](mailto:borodulina.irina@gmail.com)

M.A. Lisavenko Siberian Horticulture R&amp;D Institute, Barnaul, Russia.

Email: [tplaksina@mail.ru](mailto:tplaksina@mail.ru)

Adaptation of regenerated plants of strawberry (variety Moscow Delicacy) towards conditions *in vitro* were performed on a hydroponic installation "minivan 0.35" and calcined river sand. Plants were adapted to hydroponic installation characterized by intensive development of shoots and leaves, which are 1.5-2 times higher than those figures have regenerated, adapted in the sand. Thus the root system formed in hydroponic conditions had roots of the second order. Before planting in the ground regenerated plants were treated with

0.1% sodium sulfate, chitosan and ultrasound. Ultrasonic irradiation was carried out using the apparatus of "Wave" with a frequency mechanical vibrations of  $22 \pm 1,65$  kHz. Spraying the leaves of 0.1% sodium sulfate chitosan virtually had no impact on plant growth and development. Soaking the root system in the same solution also significantly increased the number of whiskers (1.75 pcs.) and leaves (0.35 pcs.), the length of the whiskers (1.86 cm) and significantly increased the height of the outlet 1.79 cm. Treatment of plants with ultrasound for 10 minutes slightly increased the amount of whiskers (1.54 pcs.) and length (1.26 cm), and significantly increases the height of the slots (1.79 cm). Designed experiments aimed to assess the ability of reproduction of plants of strawberry produced in the traditional way and *in vitro* studies have shown that plants propagated *in vitro* formed  $6,43 \pm 0,99$  whiskers per socket, while the plants produced by conventional method had no whiskers.

*Key words:* regenerates, *ex vitro* adaptation, plant culturing unit, chitosan sulphate solution, ultrasound.

Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) – одна из наиболее популярных и широко распространенных ягодных культур в мире. На ее долю приходится свыше 70% общемирового производства ягод (Линник, 2014). Крупнейшими производителями ягод земляники по данным ФАО являются США (825 тыс.т/год), Испания (305 тыс.т/год), Япония (209 тыс.т/год). Лидером по производству ягод на душу населения является Испания (7,3 кг/чел.). Россия по этому показателю занимает 21 место (1,47 кг/чел.).

Использование метода клонального микроразмножения *in vitro* позволяет получать оздоровленные от фитопатогенов и других инфекций растения земляники не только хорошо размножаемых традиционными способами сортов, но и ремонтантных сортов, то есть плохо размножаемых вегетативно из-за низкой усообразующей способности. В основе клонального микроразмножения растений лежат два принципиально разных этапа: *in vitro* и *ex vitro*. На первом из них жизнедеятельность размножаемого материала происходит в стерильном замкнутом пространстве, на питательной среде в строго контролируемых условиях. В условиях *ex vitro* растения вынуждены перейти с гетеротрофного типа питания на автотрофный, что сопряжено со структурной и функциональной перестройкой организма в новых условиях (Кутас, 2012).

После того, как растения укоренились в культуре *in vitro*, их адаптируют к условиям *ex vitro*. Этап адаптации растений-регенерантов к выращиванию *ex vitro* считается одним из самых ответственных и трудоемких во всем процессе размножения растений *in vitro*, является критическим и связан с гибелью растений. Это завершающий этап микроразмножения растений. Поэтому основной целью этапа адаптации растений-регенерантов является создание таких условий, при которых они будут способны перейти с миксотрофного типа питания на автотрофный и, следовательно, смогут продолжить свой рост и развитие в новых для них условиях – *ex vitro* (Вечернина, 2004; Вечернина и др., 2008).

Сущность процесса адаптации заключается в создании, во-первых, высокой влажности для наземной части растений с последующим её

понижением; во-вторых, оптимальных условий для роста корневой системы. Несмотря на то, что накоплен значительный материал, касающийся различных аспектов исследования выживаемости растений-регенерантов при адаптации (Мартыненко, Круглова, Дубровная, 2011; Зайцева, Новикова, Эрст, 2013), многие вопросы остаются открытыми. Так, для повышения приживаемости растений в условиях *ex vitro* используют обработки ультразвуком и растворами низкомолекулярного биологически активного соединения – сульфата хитозана (Хмелёва, 2009; Плаксина и др., 2011).

Цель работы - подбор оптимальных способов адаптации растений-регенерантов земляники садовой к условиям *ex vitro*.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Объектом исследования являлись растения-регенеранты ремонтантного сорта Московский Деликатес земляники садовой, укорененные на агаризованных питательных средах, содержащих различные концентрации ауксина 3-индолилмасляной кислоты (ИМК) – 0,5; 1; 3 и 5 мкМ. Растения вынимали из культуральных сосудов, отмывали корни в дистиллированной воде от агара, закрепляли в кассетах и помещали в вегетационную кювету гидропонной установки «Минивит 0,35», заполненную питательным раствором по прописи Мурасига-Скуга (Калинин и др., 1980). Период адаптации растений-регенерантов на гидропонной установке составил 20 суток.

На гидропонной установке создавалась повышенная влажность воздуха путем укрытия регенерантов земляники садовой полиэтиленом (7 суток). Затем укрытие снимали и растения продолжали расти в условиях 40–50%-ной влажности, чего невозможно достичь в условиях теплицы.

При переносе растений в открытый грунт проводили предпосадочную обработку розеток земляники. Использовали несколько вариантов обработки: 1 – контроль без обработки; 2 – опрыскивание листьев розеток земляники 0,1% раствором сульфата хитозана; 3 – замачивание корневой системы розеток в 0,1% растворе сульфата хитозана в течение 10 минут; 4 – обработка растений ультразвуком с удельной мощностью 75 Вт/дм<sup>3</sup> и временем воздействия 10 минут. Для ультразвуковой обработки был использован аппарат «Волна», специализированный для обработки растительных объектов, конструкции В.Н. Хмелёва, с частотой механических колебаний 22±1,65 кГц (Верещагин, Хмелёва, 2010).

Розетки земляники после указанных обработок высаживали в теплицу, сверху закрывали укрывным материалом – спанбонтом. Один раз в неделю проводили подкормку всех исследуемых розеток растений раствором минерального удобрения «Растворин» (1,5 г на 1 л воды). «Растворин» – комплексное водорастворимое удобрение с микроэлементами, содержащее по 18% азота, фосфора, калия и не имеющее в своем составе хлор. Показания по опытам фиксировались через каждые 10 дней в течение двух месяцев.

Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием *Microsoft Excel*. В таблицах показаны средние арифметические величины с ошибкой

средней. Достоверность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости  $P < 0,05$  (Лакин, 1990).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях для адаптации растений-регенерантов земляники была использована гидропонная установка «Минивит 0,35» и прокаленный речной песок. Розетки высаживали в пластиковые контейнеры, сверху закрывали полиэтиленовой пленкой, создавая эффект минитеплицы. Контейнеры размещали на стеллажах в вегетационной комнате при фотопериоде 16/8 ч свет/темнота.

В табл. 1 представлены показатели роста и развития растений-регенерантов земляники, адаптированных разными способами.

**Таблица 1. Сравнительная характеристика растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес, адаптированных разными способами (n=10).**

Способ адаптации	Показатели		
	высота розетки, см	количество листьев, шт.	корни второго порядка(+/-)
Гидропонная установка	9,50±0,79	10,26±0,48	+
Песок	5,92±0,73	5,00±0,25	-

Растения-регенеранты, адаптированные на гидропонной установке, характеризовались интенсивным развитием побегов и листьев: высота розеток и количество листьев в 1,5–2 раза превышали таковые показатели у растений-регенерантов, адаптированных в прокаленном песке (рис. 1). Кроме того, корневая система, сформированная в условиях гидропоники, имела многочисленные корни второго порядка, что в будущем обеспечит высокую приживаемость растений в условиях открытого грунта.

Таким образом, использование гидропонной установки «Минивит 0,35» на этапе адаптации растений-регенерантов к условиям выращивания *ex vitro* достоверно повышает выход хорошо развитых адаптированных розеток земляники садовой сорта Московский Деликатес. Адаптированные растения земляники в дальнейшем высаживали в открытый грунт.

На этапе адаптации растений-регенерантов земляники садовой к нестерильным условиям, повышению приживаемости, укоренению и дальнейшему росту способствуют препараты хитозана и ультразвуковая обработка растений (Хмелева, 2009; Плаксина и др., 2011). Их правильное использование существенно повышает выход материала на этапе адаптации и улучшает его качество. Ультразвук и препараты хитозана являются природными стимуляторами и адаптогенами роста и развития растений. Одним из уникальных биологических свойств хитозана является его способность индуцировать устойчивость к вирусным заболеваниям у растений. Обработка листьев розеток земляники повышает стрессоустойчивость

растений к воздействию неблагоприятных внешних факторов таких как высокие или низкие температуры, недостаток атмосферной и почвенной влаги, что позволяет им более интенсивно развиваться в сложных для них условиях.

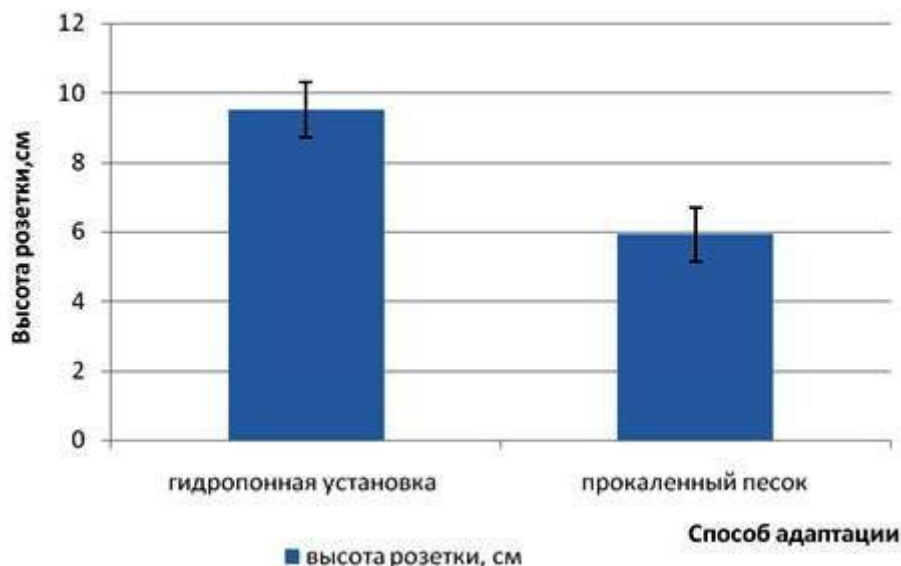


Рис.1. Высота розеток растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес в зависимости от способа адаптации.

В наших исследованиях перед высадкой растений-регенерантов земляники в открытый грунт применяли 0,1% раствор сульфата хитозана для опрыскивания листьев и замачивания корней (табл. 2). Сравнительный анализ полученных данных показал, что опрыскивание листьев раствором 0,1% сульфата хитозана практически не повлияло на рост и развитие растений в сравнении с контролем.

**Таблица 2. Влияние 0,1% раствора сульфата хитозана и ультразвука на адаптацию регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес в условиях *in vivo* (n=10).**

Признаки	Контроль	0,1% сульфат хитозана		Обработка ультразвуком (10 минут)
		опрыскивание листьев	замачивание корней	
Количество усов, шт.	6,43±0,99	6,71±1,17	8,14±1,58	7,97±1,26
Длина усов, см	2,98±0,80	2,89±1,11	4,84±1,29	4,24±1,19
Количество листьев, шт.	6,35±0,26	6,17±0,35	6,71±0,16	6,18±0,25
Высота розетки, см	6,52±0,43	6,68±0,93	8,31±0,94	8,28±0,89

Замачивание корней в 0,1% растворе сульфата хитозана незначительно повышало количество усов (в среднем на 1,71) и листьев (на 0,36) – см. рис. 2, длину усов (на 1,86 см) и увеличивало высоту розетки на 1,79 см (рис. 3).

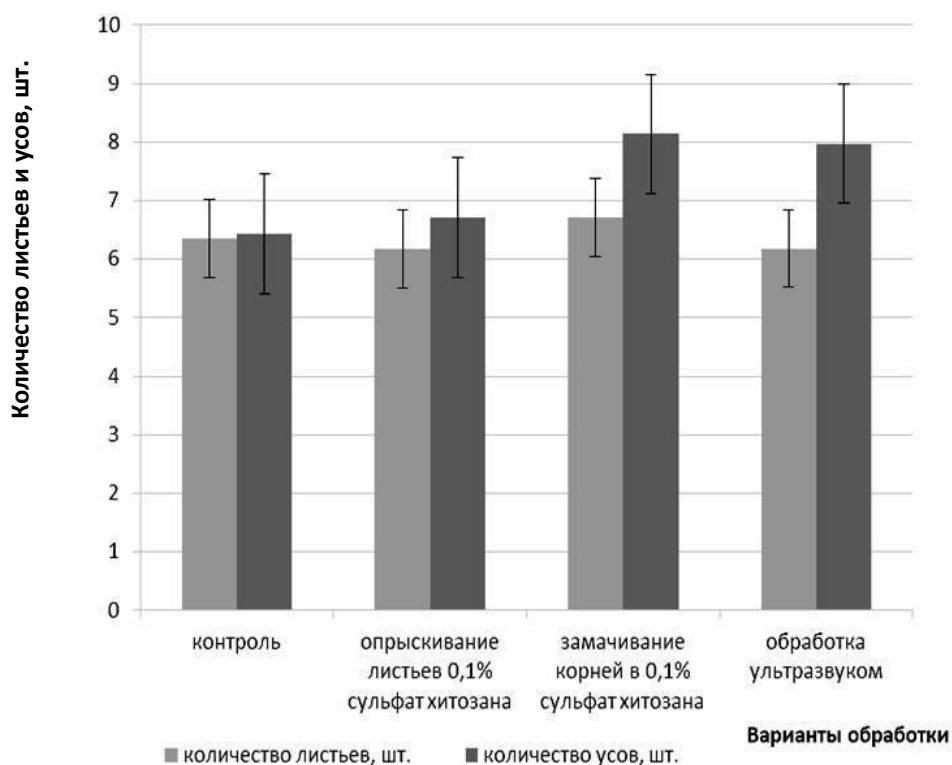


Рис. 2. Влияние 0,1% раствора сульфата хитозана и ультразвука на развитие растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес при адаптации к условиям *in vivo*

Обработка растений ультразвуком в течение 10 минут также незначительно повышала количество усов (в среднем на 1,54), их длину (на 1,26 см); увеличивало высоту розетки на 1,76 см. При этом количество листьев уменьшилось на 0,17.

Благоприятное влияние ультразвуковой обработки на рост и развитие корней и надземной части розеток земляники сорта Сельва наблюдали в своих экспериментах и другие исследователи (Плаксина и др., 2011).

Таким образом, обработка растений ультразвуком использованной частоты и замачивание корней в растворе 0,1% сульфата хитозана оказали в целом благоприятное действие на рост и развитие надземной части розеток земляники садовой сорта Московский Деликатес при переносе их в условия открытого грунта.

Как известно, способность растений к размножению, как и любой признак растительного организма, является генетически обусловленным. В литературе существуют сведения о том, что черенки с клонально размноженных *in vitro* подвоев сливы и вишни укореняются лучше, чем таковые, с растений, выращенных *in vivo*. Земляника садовая, размноженная с помощью культуры

тканей в дальнейшем в открытом грунте дает больше усов по сравнению с земляникой садовой, размноженной вегетативным способом (Высоцкий, 2011).

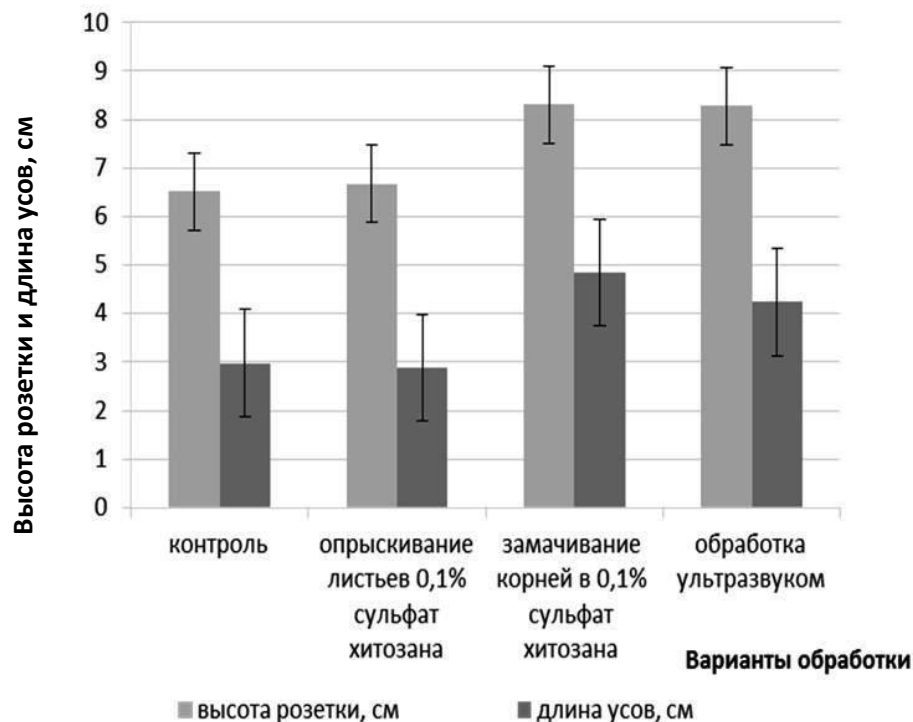


Рис. 3. Влияние 0,1% раствора сульфата хитозана и ультразвука на развитие растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес при адаптации к условиям *in vivo*

Нами был поставлен эксперимент для оценки способности к размножению растений земляники садовой сорта Московский Деликатес традиционным способом и *in vitro*. Результаты эксперимента показали, что растения земляники садовой, размноженные традиционным способом, усов не имели, а размноженные *in vitro* образовали  $6,43 \pm 0,99$  усов на розетку. Количество листьев у растений альтернативного способа размножения незначительно превышало таковое при традиционном размножении ( $6,35 \pm 0,26$  против  $5,23 \pm 0,19$ ). Высота розетки в изучаемых группах была практически одинакова –  $6,77 \pm 0,92$  и  $6,52 \pm 0,43$  см.

В Казахском НИИ плодоводства и виноградарства (г. Алма-Ата) в течение нескольких лет проводили сравнение урожайности плантаций земляники, заложенной оздоровленным посадочным материалом, полученным через культуру ткани и обычной рассадой. Было отмечено, что урожайность плантации, заложенной оздоровленным посадочным материалом, повысилась с 40–60 до 100–145 ц/га. Улучшилось состояние растений, уменьшилось поражение их болезнями. Выявлено, что у растений, полученных из меристем, увеличилось количество цветоносов и усов, что также важно при производстве

земляники. Отмечено небольшое увеличение массы ягод растений-регенерантов, их большая выравненность (Плаксина, 1996).

Исходя из выше сказанного, можно сделать вывод, что закладку маточных насаждений земляники садовой целесообразно и экономически выгодно проводить растениями, размноженными микроклонально, особенно это актуально для ремонтантных сортов, которые практически не дают усов.

### ВЫВОДЫ

1. Использование гидропонной установки «Минивит 0,35» наиболее эффективно на этапе адаптации растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес к условиям выращивания *ex vitro*.

2. Обработка ультразвуком с частотой механических колебаний  $22 \pm 1,65$  кГц и замачивание растений-регенерантов в растворе 0,1% сульфата хитозана незначительно повышает количество усов (на 1,54 и 1,71 соответственно), их длину (1,26 и 1,86 см), а также увеличивает высоту розетки (на 1,76 и 1,79 см).

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Верещагин А.Л., Хмелёва А.Н. Влияние ультразвукового облучения и регуляторов роста на ризогенную активность растительных объектов. – Бийск: Изд-во АГТУ им. И.И. Ползунова, 2010. – 72 с.

Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2004. – С. 56–60.

Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Бородулина И.Д., Эрст А.А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропонии // Известия АГУ, 2008. – № 3. – С. 7–10.

Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. работ / ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии. – М., 2011. – Т. XXVI. – С. 3–10.

Зайцева Ю.Г., Новикова Т.Н., Эрст А.А. Использование гидропонной системы для укоренения и акклиматизации микроклонов представителей родов *Rhododendron* в культуре *ex vitro* / Ботаническое образование России: прошлое, настоящее, будущее: материалы I Всероссийской научно-практической конференции (Новосибирск, 13–15 мая, 2013 г.). – Новосибирск: Изд. НГПУ, 2013. – С. 37–38.

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка. – 1980. – 488 с.

Кутас Е.Н. Адаптация регенерантов интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной, регенерированных в культуре *in vitro*, к условиям *ex vitro* / Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы. Материалы Республиканской научно-практической конференции (17 августа 2012 г., Минск, Беларусь). – Минск, 2012. – С. 29–35.

Линник Т.А. Повышение эффективности сортов земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.), характеризующихся низкой усообразующей способностью. Дисс. на соиск... канд. с.-х. наук. – Москва, 2014. – 141 с.



Мартыненко Е.В., Круглова Н.Н., Дубровная О.В. Адаптация растений-регенерантов пшеницы к условиям *ex vitro*: работа устьиц // Известия самарского научного центра Российской академии наук, 2011. –Т.13. – № 5(3). – С. 164–166.

Плаксина Т.В. Здоровая земляника // Времена года. – Барнаул, 1996. – № 4(13). – С.49–50.

Плаксина Т.В., Мочалова О.В., Верещагин А.Л., Хмелёв В.Н. Влияние ультразвукового облучения на корнеобразование у земляники и вишни // Ползуновский вестник, 2011. – № 4–1. – С. 250–254.

Хмелёва А.Н. Влияние ультразвукового облучения на ризогенную активность растительных объектов в присутствии регуляторов роста. Автореф. дисс. на соиск.... канд. биол. наук. – Барнаул, 2009. – 20 с.

### REFERENCES

Vereshhagin, A.L., Hmeljova, A.N. (2010). Vlijanie ul'trazvukovogo obluchenija i reguljatorov rosta na rizogennuju aktivnost' rastitel'nyh ob#ektov. Bijsk: I.I. Polzunov University Press.

Vechernina, N.A. (2004). Metody biotehnologii v selekcii, razmnozhenii i sohranении genofonda rastenij. Barnaul: Altai State University.

Vechernina, N.A., Tavartkiladze, O.K., Borodulina, I.D., Jerst, A.A. (2008). Adaptacija rastenij-regenerantov s ispol'zovaniem gidroponiki. Bulletin Altai State University. 3, 7–10.

Vysockij, V.A. (2011). Biotehnologicheskie priemny v sovremennom sadovodstve. Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii: Sbornik nauchnykh rabot. XXVI, 3–10.

Zajceva, Ju.G., Novikova, T.N., Jerst, A.A. (2013). Ispol'zovanie gidroponnoj sistemy dlja ukorenenija i akklimatizacii mikroklonov predstavitelej rodov Rhododendron v kul'ture ex vitro. Botanicheskoe obrazovanie Rossii: proshloe, nastojashhee, budushhee: materialy I Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii. Novosibirsk.

- Kalinin, F.L., Sarnackaja, V.V., Polishhuk, V.E. (1980). Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. Kiev: Naukova dumka.
- Kutas, E.N. (2012). Adaptacija regenerantov introducirovannyh sortov golubiki vysokoj i brusniki obyknovennoj, regenerirovannyh v kul'ture in vitro, k uslovijam ex vitro. Golubikovodstvo v Belarusi: itogi i perspektivy. Materialy Respublikanskoj nauchno-prakticheskoy konferencii. Minsk.
- Linnik, T.A. (2014). Povyszenie jeffektivnosti sortov zemljaniki sadovoj (Fragaria × ananassa Duch.), harakterizujushhihsja nizkoj usoobrazujushhej sposobnost'ju. Thesis of Doctoral Dissertation. Moscow.
- Martynenko, E.V., Kruglova, N.N., Dubrovnaja, O.V. (2011). Adaptacija rastenij-regenerantov pshenicy k uslovijam ex vitro: rabota ust'ic. Izvestija samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk. 5(3), 164–166.
- Plaksina, T.V. (1996). Zdorovaja zemljanika. Vremena goda. 4(13), 49–50.
- Plaksina, T.V., Mochalova, O.V., Vereshhagin, A.L., Hmeljov, V.N. (2011). Vlijanie ul'trazvukovogo obluchenija na korneobrazovanie u zemljaniki i vishni. Polzunovskij vestnik. 4–1, 250–254.
- Hmeljova, A.N. (2009). Vlijanie ul'trazvukovogo obluchenija na rizogennuju aktivnost' rastitel'nyh ob'ektov v prisutstvii reguljatorov rosta. Thesis of Doctoral Dissertation. Barnaul.

*Поступила в редакцию 10.07.2015*

**Как цитировать:**

Бородулина, И.Д., Плаксина, Т.В. (2015). Адаптация растений-регенерантов земляники садовой сорта Московский Деликатес к условиям *ex vitro*. *Acta Biologica Sibirica*, 1 (1-2), 74-84.

**crossref** <http://dx.doi.org/10.14258/abs.v1i1-2.832>

© Бородулина, Плаксина, 2015

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)