

Международный конкурс исследовательских работ школьников «Research start»

Направление: естественно-научные дисциплины (биология)

Тема: «Получение саженцев различных сортов земляники садовой и земляники способом микроклонального размножения»

Джелядина Алиса Тимуровна

МБУДО ЦДО «Развитие» структурное подразделение «БиоТех-Пушино», городской округ Пушкино, Московская область
10 класс

Научный руководитель:
Видягина Е.О., к. б. н.

г. Пушкино, 2023/2024 учебный год

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Литературный обзор.....	5
1.1. Микроклональное размножение растений.....	5
1.2. Культивирование земляники в РФ.....	5
1.3. Что такое земклуника?.....	6
1.4. Способы размножения земляники.....	6
1.5. Опыт микроклонального размножения земляники в РФ.....	7
Глава 2. Материалы и методы.....	8
2.1. Объект исследования.....	8
2.1. Введение в культуру <i>in vitro</i>	8
2.3. Мультипликация растений в условиях <i>in vitro</i>	9
2.4. Укоренение растений в условиях <i>in vitro</i>	9
2.5. Адаптация растений к условиям <i>ex vitro</i>	10
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	11
3.1. Введение в культуру <i>in vitro</i>	11
3.2. Мультипликация растений в условиях <i>in vitro</i>	11
3.3. Укоренение растений в условиях <i>in vitro</i>	12
3.4. Адаптация растений к условиям <i>ex vitro</i>	12
3.5. Перспективы практического использования.....	13
Выводы:.....	15
Список литературы:.....	16

Введение

Земляника садовая, в народе называемая клубникой, является одной из самых популярных ягодных культур в России и в мире. По данным Министерства промышленности и торговли РФ, с каждым годом потребление свежей клубники увеличивается на 58%, а цена растёт на 30-60% в зависимости от сорта [11]. При этом всё большую популярность приобретает и гибрид земляники садовой – земклуника. В настоящий момент производители посадочного материала не могут удовлетворить растущий спрос. Поэтому поиск эффективных методов размножения земляники садовой и земклуники является **актуальным**. Научные достижения являются одними из ведущих факторов производства, с помощью их можно совершенствовать продукцию и стратегию её выработки. У растений есть несколько способов размножения, одним из них является микрклональное размножение. Благодаря нему можно получать редкие растения, вне сезона, сохраняя генетическую составляющую. При этом количество и качество получаемых растений будет достаточно высоко, в итоге мы получаем оздоровленный материал растения. Поэтому эта технология размножения является **новейшей** в области «зелёной» биотехнологии. Микрклональное размножение начали использовать сравнительно недавно, могут быть известны не все особенности этого способа для разных культур и сортов растений. С помощью подбора оптимальных условий микрклонального размножения можно сделать получение посадочного материала земляники садовой и земклуники более экономически выгодным и быстрым.

Цель: подобрать условия для эффективного микрклонального размножения различных сортов земляники садовой и земклуники и получить жизнеспособные саженцы.

Задачи:

- 1) Изучить тонкости микрклонального размножения земляники садовой и земклуники;
- 2) Отобрать маточные розетки различных сортов земляники садовой и земклуники, выбрать нужную среду и ввести растения в культуру *in vitro*;
- 3) Подобрать условия культивирования для мультипликации введённых растений земляники садовой и земклуники;
- 4) Подобрать условия укоренения микрорастений земляники садовой и земклуники;
- 5) Адаптировать полученные укоренённые микропобеги земляники садовой и земклуники.

Объект исследования: сорта Кабрилло и Тоскана земляники садовой, сорт Купчиха земляники.

Гипотеза: саженцы, полученные микроклональным размножением, будут иметь низкую себестоимость растения.

Вклад автора: автор работы был инициатором исследования данного вопроса, лично проводил все экспериментальные исследования, помогал обработке результатов и в формулировке выводов.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Микрклональное размножение растений

Микрклональное размножение – это вегетативное размножение растений в условиях *in vitro*. Важнейшим преимуществом данного размножения является высокая степень воспроизводства и сохранение генетического статуса растений. Впервые оно было использовано в конце 50-ых годов двадцатого века Жоржем Морелем для размножения орхидей [10]. Метод заключается в том, что выделяется меристема с маточного растения, стерилизуется и переносится на питательные среды для дальнейшего увеличения количества получаемых клонов. Из достоинств этого способа можно выделить внесезонную работу, сохранение генетического материала, способность размножать трудноразводимые растения и получать большое количество оздоровленных саженцев одного возраста. Из трудностей микрклонального размножения можно отметить такие как высокая стоимость оборудования, трудоемкость процесса и непростую адаптацию растения к естественным условиям жизни. В итоге, в микрклональном размножении можно выделить 5 основных этапов [1]:

- 1) Выбор первоначального растения и питательной среды.
- 2) Ввод образцов в культуру;
- 3) Размножение (мультипликация);
- 4) Укоренение;
- 5) Адаптация выросших растений к естественным условиям

1.2. Культивирование земляники в РФ

Одной из самых распространенных ягодных культур в России является земляника садовая из-за скороплодности и высоких вкусовых качеств [2]. Первые образцы земляники садовой появились в 18 веке в результате скрещивания двух видов: чилийской и виргинской [5]. Земляника садовая является самой популярной ягодой по всему миру, Российская Федерация находится на 8-ом месте в рейтинге стран-производителей земляники садовой. В России её производят в среднем 210 тысяч тонн в год (рис.1). Общий объем нашего рынка составляет 250 - 300 тысяч тонн, где примерно 20% является импортным продуктом [12]. Использование определённых сортов зависит от региона выращивания и масштабов производства. Наиболее ценны сорта с крупными и сочными плодами, устойчивые к заболеваниям [15].

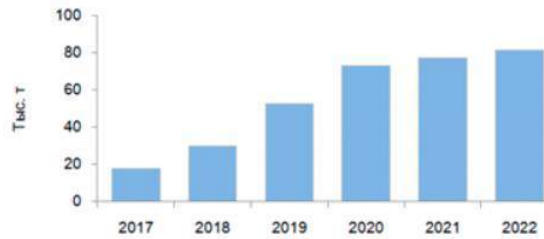


Рисунок 1. Потребление клубники в РФ за последние года («НЭО Центр») [14].

1.3. Что такое земклуника?

Земклуника – это гибрид лесной и садовой земляники (*Fragária vesca* × *Fragária × ananás*). Кусты земклуники внешне очень похожи на кусты земляники садовой, только у гибрида больше цветков, которые находятся над листьями на цветоносах. Также плоды земклуники имеют фиолетовый оттенок и продолговатую форму, что делает их похожими на клубнику [6]. По сравнению со своими родственниками, земклуника имеет большое количество преимуществ, что придаёт популярности среди садоводов этому гибриду. Плоды этого растения долго сохраняются в хорошем состоянии на ветках, они не гниют, а засыхают, как ирга. Растение после посадки рано плодоносит, хорошо переносит холода, и, в целом, неприхотливо к уходу. Ягоды земклуники большие, сочные, ароматные. Также благодаря их плотной мякоти плоды можно перевозить на дальнее расстояние, не боясь, что плоды помнутся [13]. В России самыми популярными сортами являются: Диана, благодаря её большому размеру, высокой устойчивости к морозам и серой гнили; Купчиха, из-за сочной мякоти, неприхотливости и декоративный вид кустов; Надежда Загорья также является распространенной среди садоводов благодаря мускатному привкусу, высокой устойчивости к различным болезням и необычному виду кустов – высокорослые растения с 18-20 цветками [18].

1.4. Способы размножения земляники

Существует несколько способов размножения земляники садовой. Во-первых, размножение семенами, которое чаще всего используется для выведения новых сортов, а также для мелкоплодной земляники альпийской, так как у них нет усиков [16]. Плюсы семенного размножения: можно долго хранить семена, их удобно перевозить, а также семена будут без вредителей и болезней. Из минусов: все ещё возможно наличие каких-либо вирусов, а также у земляники с крупными плодами отсутствует постоянство в сохранении сортовых признаков. Ещё, при покупке семян, можно нередко встретить подделки: семена старые, и уже не могут взойти. Во-вторых, есть способ размножения усиками, самый распространенный. Он заключается в том, что укореняются дочерние

розетки на видоизмененных побегах. При благоприятных условиях розетки могут укореняться сами, что весьма удобно. Но чаще всего приходится «помогать» растениям. Для этого надо срезать розетку с 2-3 листьями и зачатками корней, замочить дочернее растение в регуляторе корнеобразования, а затем высадить в специальном парнике с рыхлым грунтом. Одно из основных достоинств этого способа – это быстрота, ведь первые ростки появляются спустя 4-5 недель после обрезания с маточного растения. Простота и минимальные финансовые затраты способа делают его очень удобным и привлекательным для садоводов и фермеров. Но у этого способа есть и недостатки. К сожалению, когда мы срезаем розетку, ей передаются все болезни и вредители, которые были у первоначального растения. Также, если использовать образцы с большим количеством усов и в течение пары лет срезать с них розетки, то можно получить землянику с потерянными ценными особенностями сорта [17]. И, в-третьих, способ микроклонального размножения, ранее описанный.

1.5. Опыт микроклонального размножения земляники в РФ

В РФ часто используют метод микроклонального размножения для земляники, так как он оздоравливает посадочный материал. Из-за большого количества различных вирусных заболеваний и переносчиков-вредителей уменьшается урожай земляники. Но благодаря микроклональному размножению в посадочном материале не копят болезни [2]. Этот метод применим больше в научных целях или на производстве с привлечением научных ресурсов. К примеру, этим способом размножения пользуются исключительно в лабораториях или на научно-производственных предприятиях. Впервые микроклональное размножение в России начали применять в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР [10]. В наше время также активно развивается наука в сфере микроклонального размножения. В 2012 году открыли способ стерилизации эксплантов и апикальных почек, который помогает повысить коэффициент генетически стабильных и устойчивых к инфекциям растений. Способ состоит в том, что проводится стерилизация эксплантов и апикальных почек 0,5%-ным спиртовым раствором хлоргексидина в течение пяти минут, а затем они промываются 5-6 раз в стерильной дистиллированной воде в течение 1 часа. После этого у эксплантов вырезаются листовые фрагменты и делаются надсечки для увеличения площади соприкосновения ткани растения с питательной средой [3].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

Для нашей работы мы выбрали маточные растения земляники садовой сортов Кабрилло и Тоскана, земклуника сорта Купчиха. Маточные растения были взяты из частной коллекции.

Кабрилло – сорт, сравнительно молодой, был выведен селекционерами Калифорнийского университета в 2009 году. На российский рынок пришёл в 2018 году и достаточно быстро стал популярен среди садоводов и фермеров. Ягоды у данного сорта в форме конуса, расширенные по бокам. Плоды ярко-красного цвета, с глянцевой кожицей и желтыми семенами. Мякоть Кабрилло сочная, без хруста, тоже насыщенного красного цвета. Вкус у ягод сладкий, их используют как для потребления в свежем виде, так и для консервирования и готовки [8].

Тоскана была выведена итальянской фирмой ABZ seeds в 2011 году. Сорт известен и привлекателен не столько благодаря ароматным плодам, сколько декоративным ярко-красным большим цветкам. Само растение низкорослое, может достигать 20 см, но в ширину разрастается до 45 см. Ягоды у Тосканы сладкие, но могут иметь кисловатый привкус. По цвету они в основном ярко-красные, но бывают и темно-алого оттенка [4].

Купчиха – самый известный, урожайный и крупноплодный сорт земклуники. По сравнению с остальными двумя сортами, Купчиха самый «старый» сорт, так как была выведена в 1980-х годах московскими и брянскими селекционерами [9]. Ягоды могут достигать по массе 40 грамм. Форма у плодов трапецеидальная, цвет варьируется от красного до бордового. Вкус у них сладкий, без кислинки, с выраженным ароматом лесной земляники [7].

2.1. Введение в культуру *in vitro*

Растения мы вводили в культуру *in vitro* осенью (октябрь) 2023 года. Для введения в культуру мы использовали верхушечную почку розетки. Для введения были взяты по 4 почки для каждого сорта. Для введения использовали среда Мурасиге-Скуга (MS) [19]. В качестве желирующего агента был использован агар-агар в концентрации 8г/л. Для введения и восстановления растительной культуры использовались регуляторы роста 6-бензиламинопурин (БАП) 0,3 мг/л, зеатин 0,3 мг/л, гиббереллиновая кислота (ГК) 0,1мг/л, аскорбиновая кислота 0,3мг/л. Стерилизацию проводили с помощью раствора белизны (гипохлорит натрия), потом промывали два раза водой по 5 минут [20]. Среда была проавтоклавирована при давлении 1 атм в течение 60 минут, разлита в полипропиленовые

ёмкости объёмом 150 мл, среды добавляли по 20 мл. Стерильно пересаживали растения в ламинарном боксе (Lamsystems, Россия) с использованием гласперленового стерилизатора (Glass bead sterillzer, Китай).

2.3. Мультипликация растений в условиях *in vitro*

Для мультипликации мы использовали среды: MS, 9 г/л агар-агара, ВАР 0,5%. Для элонгации MS, 9 г/л агар-агара без добавления гормонов.

Мы переносили растения в среду для мультипликации – для увеличения количества розеток после их адаптации к условиям *in vitro*. В стерильные стеклянные сосуды объёмом 330 мл сажалось по 10 розеток земляники. Мы проводили культивирование при освещении 2500 люкс с режимом освещения 16 «день» и 8 «ночь». Коэффициент мультипликации и общее состояние растений мы оценивали спустя 14 дней (рис.2)

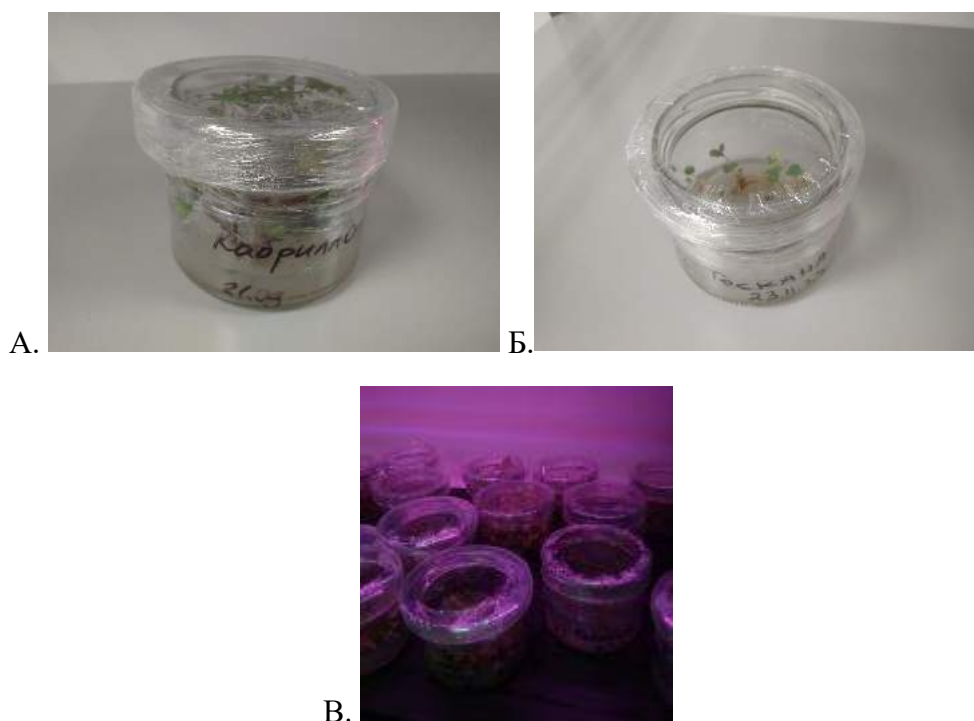


Рисунок 2. Мультипликация земляники садовой. А – Кабрилло, Б – Тосканы, В - инкубация ёмкостей для культивирования с посаженными растениями.

2.4. Укоренение растений в условиях *in vitro*

Для укоренения растений мы использовали безгормональную среду 1/2MS, 9 г/л агар-агара. Укоренение земляники мы проводили при освещении 2500 люкс с режимом освещения 16 «день» и 8 «ночь».

2.5. Адаптация растений к условиям *ex vitro*

Когда пришло время высаживать растения, сначала мы очищали их корневую систему от остатков среды, в которой они росли, затем обмывали в слабом растворе перманганата калия. После этого землянику высаживали в кассеты с хорошо увлажнённым грунтом («Гера», Россия). Затем помещались в теплицу из полиэтилена, где растения росли при температуре +25°C и освещённости 2500 люкс с режимом освещения 16 «день» и 8 «ночь» (рис.3). Также грунт регулярно увлажнялся.



Рисунок 3. Адаптация растений к условиям *ex vitro*

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Введение в культуру *in vitro*

Мы вводили по 1-2 почки от каждого растения в ламинарном боксе в стерильных условиях. Для введения в культуру *in vitro* мы использовали среду MS БАП 0,3 мг/л мы использовали его, так как он является регулятором роста для растений, имеет способность их омолаживать, а также стимулирует образование хлорофилла. Зеатин регулирует переработку питательных веществ, деление клеток растения, стимулирует цветение и другие важные процессы. Гиббереллиновая кислота является естественным гормон роста растений, также влияет на прорастание семян. Аскорбиновая кислота также стимулирует рост растений, повышает его плодоношение, помогает стать растению более устойчивым к болезням. В результате в культуру *in vitro* ввелись Кабрилло - 2 почки, Тоскана - 1 почка, земклуника - 2 почки. Остальные почки были инфицированы грибной и бактериальной инфекцией и дальше не вегетировали.

3.2. Мультипликация растений в условиях *in vitro*

После введения сортов земляники Кабрилло и Тоскана и земклуники сорта Купчиха в культуру *in vitro* мы подобрали нужные условия культивирования для мультипликации, укоренения и адаптации растений. В связи с тем, что на среде для мультипликации использовался «сильный» цитокинин 6-бензиламинопурин, то мы наблюдали его пагубное влияние. Растения переставали расти, листья оставались маленькими, а корни неразвитыми. В целом наблюдалась витрификация микропобегов (рис. 4). Поэтому мы использовали среду для элонгации без добавления регуляторов роста, с помощью которой микропобеги могут вытягиваться, и дальнейшая мультипликация не происходит. Подобный подход ранее не был описан в литературе.

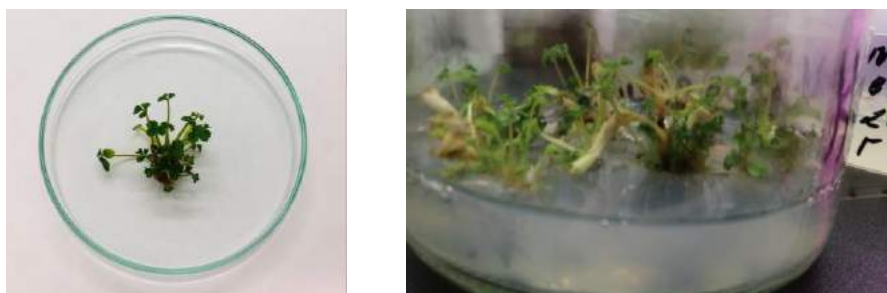


Рисунок 4. Пример образование кластеров и дальнейшая витрификация растений.

Нами перекладывались полученные кластеры из мультиплицирующих растений. В дальнейшем растения из кластеров вытягивались и увеличивали размер. При такой манипуляции удаётся получить максимальное количество живых розеток для дальнейшего

укоренения (рис. 5). Коэффициент мультипликации для Купчихи – 7, для Кабрилло – 5, для Тосканы – 5.



Рисунок 5. Растения на среде для элонгации.

3.3. Укоренение растений в условиях *in vitro*

На этапе укоренения среднее количество корней для всех сортов было примерно одинаково и составило 7-10 на одно растение (рис. 6). Зависимость эффективности укоренения от сорта не было обнаружено.



Рисунок 6. Укоренённые растения зеляники садовой сорта Кабрилло.

3.4. Адаптация растений к условиям *ex vitro*

Важным этапом является переход растений от условий *in vitro* к условиям *ex vitro*. Ростки должны быть адаптированы к автотрофной жизни, так как в условиях *in vitro* они являлись гетеротрофами. Чтобы растения привыкали к условиям *ex vitro* без резких перепадов, мы пытались сохранять высокую влажность. Для этого мы использовали самодельную теплицу, покрытую полиэтиленом для сохранения влажности, сажали растения в кассеты с хорошо увлажненным грунтом (рис.7). Все растения смогли удачно адаптироваться к условиям *ex vitro*.



Рисунок 7. Самодельная теплица на этапе адаптации.

В результате нами было получено по 4 растения каждого сорта (рис. 8), большая часть растений осталась в культуре *in vitro* на стадии мультипликации. В дальнейшем мы планируем увеличить производительность сортов, используя другие среды и условия культивирования.



Рисунок 8. Полученные адаптированные растения земляники садовой сортов Тоскана и Кабрилло и земклуника Купчиха.

3.5. Перспективы практического использования

Земляника садовая – одна из самых популярных ягодных культур в наше время, ее появление на рынке нетерпеливо ждут каждый год. С каждым сезоном потребление клубники растет, цены также становятся выше. С помощью отработанного нами способа можно получить большое количество различных сортов здоровой земляники садовой в любое время года, при этом снижая расходы на выращивание.

Нами были подобраны наиболее подходящие среды для мультипликации и укоренения, на которых мы вырастили сорта земляники садовой Тоскана и Кабрилло, а также сорт земклуники Купчиха. Нами было подсчитано, что средняя цена одного растения при предложенном способе выращивания в среднем 10-15 рублей за растение, что является очень

экономически выгодным показателем. Одним из главных плюсов микроклонального размножения является способность получать растения круглый год. Наше учреждение организует ежегодные городские ярмарки в начале посадочного сезона, в настоящий момент полученные адаптированные растения планируются к продаже на данных мероприятиях.

Выводы:

В ходе нашей работы были сделаны следующие выводы:

1) Были изучены особенности микрклонального размножения земляники садовой и земклуники, благодаря чему была выбрана стратегия культивирования экспериментальных сортов.

2) Для эксперимента были выбраны 2 сорта земляники садовой: Тоскана и Кабрилло, земклуника сорта Купчиха для ввести растения в культуру *in vitro*;

3) Были подобраны условия культивирования для мультипликации введённых растений. На этапе мультипликации было использовано 2 пассажа и 2 типа сред: для мультипликации (MS, 9 г/л агар-агара, ВАР 0,5%), для элонгации (MS, 9 г/л агар-агара без добавления гормонов). Коэффициент мультипликации для Купчихи – 7, для Кабрилло – 5, для Тосканы – 5.

4) Для укоренения использовалась среда использовали среду 1/2MS, 9 г/л агар-агара без добавления гормонов. Количество корней для каждого сорта было примерно одинаковым и равнялось 7-10 штук.

5) Полученные укоренённые микропобеги успешно адаптировали к условиям *ex vitro* и получили по 4 растений каждого сорта, оставив большую часть растений в культуре *in vitro* в стадии мультипликации. Себестоимость одного саженца составляет в среднем 10-15 рублей.

Список литературы:

1. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. — М., 1983. 95 с.
2. Степанов В.В., Московенко Н.В. Изучение показателей качества земляники садовой, выращенной путем биотехнологии микрочлонирувания //Научные труды КубГТУ, № 14, 2016, с. 621-628.
3. Холопцов В.Ф., Простенко А.Н., Навальнева И.А. Способ поверхностной стерилизации эксплантов и апикальных почек земляники садовой, винограда, хурмы сорта «Королек» *in vitro*, патент №2490871 от 06.04.2012.
4. Ампельная клубника Тоскана [Электронный ресурс] URL: <https://agro-market.net> Дата обращения: 10.01.2024
5. Все об инвестициях в АПК [Электронный ресурс] URL: <https://we-agro.ru> Дата обращения: 12.12.2023
6. Земклуника. Что это такое? [Электронный ресурс] URL: <https://ped-kopilka.ru> Дата обращения: 09.01.2024 Земклуника. Что это такое? [Электронный ресурс] URL: <https://ped-kopilka.ru> Дата обращения: 09.01.2024
7. Земклуника Купчиха: описание сорта [Электронный ресурс] URL: <https://sad-i-ogorod.ru> Дата обращения: 10.01.2024
8. Клубника сорта Кабрилло [Электронный ресурс] URL: <https://vashnil.ru> Дата обращения: 10.01.2024
9. Клубника Купчиха [Электронный ресурс] URL: <https://plantland.ru> Дата обращения: 10.01.2024
10. Микрочлональное размножение растений [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru> Дата обращения: 06.02.2024
11. Министерство промышленности и торговли Российской Федерации [Электронный ресурс] URL: minpromtorg.gov.ru Дата обращения: 06.03.2024
12. Сколько клубники съедают россияне [Электронный ресурс] URL : <https://journal.tinkoff.ru/statistic-strawberry/#:~:text=%D0%9E%D0%B4%D0%BD%D0%B0%D0%BA%D0%BE%20%D0%B8%D0%B7%D0%B2%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%BD%D0%BE%2C%20%D1%87%D1%82%D0%BE%20%D0%B2%20%D0%A0%D0%BE%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%B8,%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%8C%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%BE%20210%20%D1%82%D1%8>

- В%D1%81%D1%8F%D1%87%20%D1%82%D0%BE%D0%BD%D0%BD Дата обращения: 06.02.2024
13. О клубнике [Электронный ресурс] URL: <https://clubnikaexpert.ru> Дата обращения: 09.01.2024
 14. Популярные виды клубники в России [Электронный ресурс] URL: <https://dzen.ru/a/ZJqUXg10v3sCeYnf> Дата обращения: 08.01.2024
 15. Потребление клубники в РФ («НЭО Центр») [Электронный ресурс] URL: <https://neoconsult.ru> Дата обращения: 08.01.2024
 16. Размножение земляники [Электронный ресурс] URL: <https://obrezka-sada.ru> Дата обращения: 10.01.2024
 17. Размножение земляники – способы и их плюсы и минусы [Электронный ресурс] URL: <https://vsaduidoma.com> Дата обращения: 10.01.2024
 18. Самые популярные сорта земляники [Электронный ресурс] URL: <https://www.ogorod.ru/ru/sad/strawberry/9706/Samye-populjarnye-sorta-zemkluniki.htm> Дата обращения: 25.02.2024
 19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures// *Physiol Plant*, 1962, 15(3): 473—497.
 20. Niedz R.P., Evens T.J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition// *Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2007, 43, 370–381.