

УДК 634.75:57.085.2:57.017.35

**ПОВЫШЕНИЕ ЧАСТОТЫ
РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ
ЗЕМЛЯНИКИ В КУЛЬТУРЕ
КАЛЛУСА И АНАЛИЗ СТЕПЕНИ
ИХ ИЗМЕНЧИВОСТИ**

Расторгуев Сергей Леонидович
д-р с.-х. наук, профессор
зав. кафедрой биотехнологии
и биологии растений

*Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
Мичуринский государственный аграрный
университет, Мичуринск, Россия*

Культивирование каллусных тканей с последующим получением регенерантов – новое направление в селекционных исследованиях. Для успешного проведения исследований с использованием каллусных культур земляники необходимо разработать технологию надежного получения растений-регенерантов. Этот метод откроет пути высокоэффективной массовой селекции с помощью культуры *in vitro*. Цель работы – разработка методических аспектов повышения частоты регенерации в системе *in vitro* и анализ изменчивости растений из каллусной культуры земляники. В качестве индукторов стеблевого органогенеза использовались регуляторы роста цитокининовой, ауксиновой и гибберелловой природы. Приведены результаты исследований по регенерации растений в культуре каллуса земляники (возраст каллуса от 30 до 160 суток). Установлено, что частота регенерации побегов составляла от 6,7 до 64% и зависела от присутствующих в среде регуляторов роста, их концентрации и исходного генотипа. Разработано несколько вариантов индукционных сред на основе прописи Мурасиге-Скуга с оптимальным сочетанием регуляторов роста. Предложен эффективный двухэтапный прием повышения регенерационной способности каллусной

UDC 634.75:57.085.2:57.017.35

**INCREASING THE PLANT
REGENERATION FREQUENCY
IN THE CALLUS CULTURE
OF STRAWBERRY AND ANALYSIS
OF THEIR VARIABILITY**

Rastorguev Sergey
Dr. Sci.Agr., Professor
Head of Faculty of Biotechnology
and Biology of Plant

*Federal State Educational Institution
of Higher Professional Education
Michurinsk State Agrarian University,
Michurinsk , Russia*

Cultivation of callus tissue with the subsequent receiving of regenerants is a new direction in a breeding research. It is necessary to develop the technology of reliable receiving of regenerated plants for successful carrying out of research with use the callus cultures of wild strawberry. This method will open the ways of high effective mass breeding *in vitro* culture. The work's purpose is the development of methodical aspects of increase of regeneration frequency *in vitro* system and the analysis of variability of plants from callus culture of wild strawberry. The growth regulators of cytokinin, auxin and gibberellic nature are used as inductors of a stem organogenesis. The results of research on regeneration of plants in the callus culture of wild strawberry (callus age is from 30 to 160 days) are given. It is established that the frequency of shoot regeneration was from 6,7 to 64% and depended on present of growth regulators in the medium, their concentration and an initial genotype. Some variants of induction medium on the basis of Murashige-Skoog recipe with an optimum combination of growth regulators are developed. The effective two-stage method of increase

ткани. Анализ растений-регенерантов показал значительную степень изменчивости некоторых признаков, которая сохранялась в R₁ и R₂ вегетативных поколениях. Разработанные методические подходы к повышению морфогенетического потенциала каллусных культур могут быть использованы для других сортов, относящихся к виду *F. ananassa* Duch, с целью повышения эффективности и направленности селекционного процесса земляники.

Ключевые слова: ЗЕМЛЯНИКА, РЕГЕНЕРАЦИЯ, ФИТОГОРМОНЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИЗМЕНЧИВОСТЬ

of regeneration ability of callus tissue is developed. The analysis of regenerated plants showed the considerable degree of variability of some traits which remained in R₁ and R₂ vegetative generations. The developed methodical approaches to increase of morphogenetic potential of callus cultures can be used for other varieties relating to a type of *F. ananassa* Duch. for increase of efficiency and direction of wild strawberry breeding process.

Key words: STRAWBERRY, REGENERATION, PLANT HORMONES, NUTRIENT MEDIUM, VARIABILITY

Введение. У растений, индуцированных из каллусных культур, возрастает вероятность появления генетических изменений как на уровне качественных, так и на уровне количественных признаков, что ведет к независимому от традиционных методов селекции созданию новых форм и сортов растений. Поэтому культивирование каллусных тканей с последующим получением регенерантов – это принципиально новое направление в селекционных исследованиях и дополнительный источник генетической изменчивости растений. Однако в этой работе возникает немало трудностей и важнейшая из них – проблема индукции морфогенеза при регенерации растений.

Для успешного проведения селекционных исследований с использованием каллусных культур земляники необходимо разработать технологию надежного получения растений-регенерантов. Это значительно повысит результативность селекции на уровне клеток и тканей, включая индукцию соматклонов, экспериментальную гаплоидию, клеточную селекцию на устойчивость к стрессам, соматическую гибридизацию и другие направления применения метода культуры ткани.

Обсуждая значение биотехнологических методов в решении научных и производственных задач плодоводства, исследователи отмечают, что наиболее сложной остается проблема регенерации растений.

Овладение методом регенерации открывает пути высокоэффективной массовой селекции с использованием культуры *in vitro*. Поэтому необходимо максимально увеличить выход целых растений и, тем самым, вероятность отбора ценных в хозяйственном отношении мутантных форм садовых растений.

В ряде научных публикаций указывалось, что даже при культивировании различных соматических тканей, изолированных с одного и того же растения, подчас приходится каждый раз корректировать состав питательной среды [1].

Один из ключевых факторов, способствующий реализации потенций каллусных тканей к регенерации – гормональный баланс питательной среды. Присутствующие в регенерационной среде регуляторы роста цитокининовой и ауксиновой природы (концентрация и соотношения) являются основными индукторами, вызывающими адвентивный органогенез при регенерации из каллусных культур. Стеблевой органогенез обычно вызывают введением в состав среды различных концентраций цитокининов или их сочетанием с ауксинами [2].

Важнейшее физиологическое свойство цитокининов в культуре *in vitro* заключается в способности вызывать дифференциацию меристематических очагов и заложение стеблевых почек у недифференцированных каллусных тканей. Морфогенетическая особенность цитокининов довольно часто зависит от уровня других регуляторов роста, и прежде всего ауксинов, при взаимодействии с которыми они наиболее активны [3].

Изменяя соотношение уровней цитокининов и ауксинов, можно управлять процессом морфогенеза в культуре каллусных клеток, регулировать и оптимизировать заложение зачатков растительных органов. Варьи-

руя количества цитокинина и ауксина, F. Skoog, C.O. Miller наблюдали разные типы органогенеза, в частности изменение соотношения кинетин / индолилуксусная кислота в сторону увеличения цитокинина, приводило к дифференциации меристематических очагов апексов, дающих начало роста адвентивных побегов [4].

Аналогичные результаты получили ряд других исследователей при регенерации адвентивных побегов из каллусной ткани земляники [5-10].

Не менее важными факторами, определяющими успех регенерации, являются генетические особенности растения – донора, условия культивирования и воздействия на клетки эксплантов.

Каллусная ткань земляники характеризуется определенным морфогенетическим потенциалом, реализация которого позволяет получать растения-регенеранты. Однако не во всех случаях удается достаточно надежно воспроизвести регенерацию *in vitro*.

Поэтому проблема регенерации не потеряла своей актуальности, так как не были отработаны приемы стабильного получения растений-регенерантов в культуре каллусов земляники. Процесс создания биоразнообразия растений методом культуры ткани часто связан с необходимостью неоднократного субкультивирования каллусов, что оказывает негативное влияние и снижает выход регенерантов.

В то же время возрастает число полиплоидных, анеуплоидных и других генетически аберантных клеток, а следовательно, и возможность индукции из каллусов растений, отличающихся от прототипа. Разработка и усовершенствование приемов регенерации для представителей рода *Fragaria L.* позволит шире применять методы тканевых культур для получения ценных генотипов земляники.

В связи с этим исследования посвящены разработке методических вопросов повышения частоты регенерации в системе *in vitro* и анализу изменчивости растений из каллусной культуры земляники.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов исследований использовали каллусную ткань земляники сортов Урожайная ЦГЛ, Фейерверк, Рубиновый кулон, Холидей, Консервная плотная. В экспериментах культуру каллусных тканей получали из диплоидных тканей листьев (листовых дисков), культивируемых в условиях *in vitro*. Возраст каллуса перед регенерацией составлял от 30 до 160 суток.

Для индукции адвентивных побегов из каллусной ткани применяли среду, получившую название среды морфогенеза или регенерационной. Питательная среда, разработанная Т. Мурасиге и Ф. Скугом, – это базовая среда, используемая нами в экспериментах по регенерации.

В качестве индукторов стеблевого органогенеза применяли регуляторы роста цитокининовой, ауксиновой и гибберелловой природы.

Были испытаны варианты регенерационных сред с содержанием 6-БАП (1,0-15,0 мг/л) и его сочетание с одним из препаратов с ауксиновой активностью – 2,4-Д (0,1-0,5 мг/л), ИУК (0,1-4,0 мг/л), ИМК (0,1- 0,5 мг/л) и гибберелловой кислотой ГК₃ (0,1-0,5 мг/л). В вариантах опыта при одновременном введении в питательную среду цитокинина с ауксином или с гибберелловой кислотой концентрация 6-БАП была выше указанных регуляторов роста.

Каллус на среде морфогенеза культивировали при длине светового дня 16 часов и интенсивности освещения до 3000 люкс. Температуру поддерживали на уровне 23±2 °С. В процессе исследований были модифицированы стандартные условия культивирования за счет изменения физических факторов воздействия на клетки каллусов. При анализе изменчивости растений-регенерантов применяли коэффициент вариации.

Обсуждение результатов. По нашим данным, для получения в достаточном количестве каллусной культуры у опытных сортов земляники использование питательных сред, где в качестве индуктора роста присутствует синтетический аналог ИУК – ауксин 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л,

является более предпочтительным. По-видимому, 2,4-Д обладает более высокой физиологической активностью, направленной на стимуляцию процесса дифференцировки клеток, подготавливающего их к делению, растяжению и превращению в каллусные. Индуцированный в опытах каллус по внешним признакам был в основном светло-желтого цвета, блестящим и имел достаточно плотную консистенцию.

В результате проведенных исследований отобраны варианты питательных сред, на которых наблюдали формирование адвентивных побегов (табл. 1). Возраст каллусных культур в опыте 30-40 суток.

Таблица 1 – Влияние регуляторов роста на регенерацию адвентивных побегов из каллуса разных сортов земляники (питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга)

Сорт	Регуляторы роста, мг/л	% регенерации	Всего регенерировано побегов, шт.	Среднее число побегов на экплант, шт.
Урожайная ЦГЛ	БАП 2,0+2,4-Д 0,1	29,2	16	2,3
	БАП 3,0+ИМК 0,5	35,0	14	2,0
	БАП 5,0+ИМК 0,5	64,0	34	2,1
	БАП 10,0+ИМК 0,5	59,3	40	2,5
	БАП 10,0+ИУК 0,5	35,7	13	1,3
Фейерверк	БАП 2,0+2,4-Д 0,1	47,8	31	3,1
	БАП 3,0+ИМК 0,5	45,0	16	1,8
	БАП 5,0+ИМК 0,5	60,0	35	2,3
	БАП 10,0+ИУК 0,5	56,5	32	2,5
Рубиновый кулон	БАП 2,0+2,4-Д 0,1	40,7	22	2,0
	БАП 10,0+2,4-Д 0,5	53,6	44	2,9
	БАП 15,0+ИУК 1,0	9,7	17	2,8
	БАП 10,0+ГК 0,1	7,1	2	1,5
Холидей	БАП 15,0+ИУК 1,0	12,5	10	2,0
	БАП 3,0+ИМК 0,5	26,1	10	1,7
	БАП 5,0+ИМК 0,5	28,0	13	1,9
	БАП 10,0+ГК 0,1	6,7	2	1,0
НСР ₀₅				0,83

Частота регенерации побегов различалась по вариантам, составляла от 6,7 до 64% и зависела от присутствующих в среде регуляторов роста, их концентрации и исходного генотипа. Следует отметить, что не все испытанные регенерационные среды, которые планировались как способствующие стимуляции процессов морфогенеза, оказались эффективными.

Так, введение в состав питательной среды 6-БАП в различных концентрациях не вызывало заложения в каллусе адвентивных почек и развития побегов. Этот факт заставил искать другие пути, вызывающие активную регенерацию каллусных культур, посредством добавления в индукционные среды представителей других классов фитогормонов, но с обязательным присутствием цитокинина. В последующих экспериментах удалось подобрать оптимальные сочетания ростовых веществ, вызывающих заложение почек в каллусе и развитие из них побегов.

В опытах были использованы четыре группы регенерационных сред с различным гормональным составом. Первая группа сред включала одновременное добавление 6-БАП и 2,4-Д, вторая – 6-БАП и ИМК, третья – 6-БАП и ИУК, четвертая – 6-БАП и ГК₃.

Наибольшая частота регенерации была характерна для вариантов с включением 6-БАП в сочетании с ИМК или ИУК (сорта Урожайная ЦГЛ, Фейерверк, Холидей). Менее интенсивно при этом сочетании регулятора роста протекал процесс регенерации придаточных побегов у сорта Рубиновый кулон (частота регенерации менее 5 %). Замена ИМК и ИУК на более сильный по физиологической активности синтетический аналог ауксина – 2,4-Д способствовала значительному повышению регенерационной способности каллусов этого сорта.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала тканевых культур при индукции растений в системе *in vitro* оказывают сортовая и видовая специфика исходного экспланта. Нашими исследованиями установлено, что каллусные культуры ряда сортов земляники

по-разному реагировали на присутствие в среде морфогенеза регуляторов роста. Для сорта Урожайная ЦГЛ оптимальной являлась концентрация 5,0 и 10,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИМК; для сорта Фейерверк – 5,0 и 10,0 мг/л 6-БАП с 0,5 мг/л ИМК или ИУК. Каллусы сорта Рубиновый кулон активно пролиферировали адвентивные побеги при культивировании на среде с 10,0 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л 2,4-Д. Наиболее низкая потенция к регенерации характерна для сорта Холидей, хотя и были испытаны различные добавки и концентрации регуляторов роста.

В вариантах испытанных сред, дополненных цитокинином и ауксином, отмечено положительное влияние на индукцию стеблевого органогенеза 6-БАП в концентрации 5,0 и 10,0 мг/л, что свойственно для всех изученных генотипов. Относительно высокая (15,0 мг/л) или низкая (1,0 мг/л) концентрация 6-БАП в сочетании с ауксинами не стимулировала регенерацию *in vitro* или процент формирования адвентивных побегов был невысок. Следовательно, по способности к регенерации исследуемые сорта можно расположить в следующем порядке (по среднему показателю частоты регенерации): Фейерверк > Урожайная ЦГЛ > Рубиновый кулон > Холидей.

Варианты питательных сред с установленным оптимальным сочетанием регуляторов роста были опробованы для получения адвентивных побегов из каллусных тканей земляники сортов Фейерверк и Урожайная ЦГЛ четвертого-пятого пассажей (140-160 суток непрерывного культивирования в условиях *in vitro*).

Известно, что при длительном культивировании каллусной ткани *in vitro* способность каллусов многих растений формировать адвентивные побеги снижается или даже теряется. При культивировании каллусов, возраст которых перед регенерацией составлял 140-160 суток, 47,8-57,1% эксплантов сорта Фейерверк и 26,9-59,2 % сорта Урожайная ЦГЛ индуцировали придаточные микропобеги (табл. 2).

Таблица 2 – Стеблевой органоогенез в культуре каллусных тканей сортов земляники 4-5 пассажей (регенерационная среда по прописи Мурасиге-Скуга)

Вариант среды с регуляторами роста, мг/л	Фейерверк		Урожайная ЦГЛ	
	% регенерации	поб./экспл., шт.	% регенерации	поб./экспл., шт.
6-БАП 2,0 + 2,4-Д 0,1	47,8	2,9	26,9	2,3
6-БАП 5,0 + ИМК 0,5	57,1	2,3	59,2	2,0
6-БАП 10 + ИУК 0,5	52,0	2,2	35,1	1,5
НСР ₀₅		0,82		0,94

В среднем, из каллуса формировалось 1,5-2,9 побегов. Из испытанных добавок цитокинина и ауксинов наиболее эффективной для стимуляции процесса органоогенеза *in vitro* оказалась среда, содержащая 5,0 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л ИМК (10:1), на которой в 57,1-59,2 % случаев каллусные ткани образовывали адвентивные побеги.

Проведенные эксперименты позволили разработать несколько вариантов индукционных сред на основе прописи Мурасиге-Скуга с оптимальным сочетанием регуляторов роста, которые способствовали получению побегов из каллусов первого пассажа, а также прошедших неоднократное субкультивирование (четвертый-пятый пассаж).

Развитие побегов в культуре каллусов происходило при температурном режиме 23 ± 2 °С и 16-часовом фотопериоде, что характерно для большинства растений умеренного климата.

В наших исследованиях мы модифицировали условия культивирования за счет использования предварительного выращивания каллусных культур земляники на регенерационной среде в полной темноте при экспозиции 3 недели и $t = 23 \pm 2$ °С. После темнового стресса экспланты помещали в стандартные условия (16-часовой фотопериод, интенсивность освещения – до 3000 люкс и $t = 23 \pm 2$ °С).

В опыте использовали отобранную индукционную среду, которая способствовала более высокой регенерации побегов растений земляники (6-БАП 5,0 мг/л + ИМК 0,5 мг/л).

Экспериментальные данные, представленные в табл. 3, показали, что изменение основных параметров светового режима влияло на уровень стеблевого органогенеза, и этот прием оказался достаточно эффективным.

Таблица 3 – Реакция каллуса на способность к регенерации при предварительном культивировании в темноте (среда Мурасиге – Скуга, 6-БАП 5,0мг/л + ИМК 0,5мг/л)

Сорт	t=23±2 °C, 16-ч фотопериод (контроль)		t=23±2 °C, темнота 3 недели		НСР ₀₅ поб./экспл.
	% регене- рации	поб./экспл., шт.	% регене- рации	поб./экспл., шт.	
Урожайная ЦГЛ	60,0±8,9	2,1	80,0±7,3	3,6	0,77
Фейерверк	57,1±9,0	2,3	76,9±7,8	3,9	1,07
Холидей	26,6±8,1	1,8	40,0±8,9	2,5	0,8
Консервная плотная	46,7±9,1	1,4	55,2±9,1	1,9	0,48

Так, в контроле адвентивные побеги образовались у 60% каллусов сорта Урожайная ЦГЛ. В варианте опыта с предварительным культивированием эксплантов в темноте в течение 3 недель и t= 25 °C отмечено значительное повышение частоты регенерации до 80%. Среднее число побегов на каллусе в опыте было выше, чем в контроле, и достигало 3,6 шт.

Среди опытных сортов каллусные культуры сорта Холидей имели наименьшую регенерационную способность. Разработанный прием предварительного инкубирования в темноте позволил повысить частоту формирования адвентивных почек и побегов до 40% (в контроле 26,6%).

Аналогичную реакцию на индукцию морфогенеза при регенерации наблюдали в вариантах опыта у сортов Фейерверк и Консервная плотная.

Следует подчеркнуть, что способность к регенерации, как известно, свойство чрезвычайно лабильное и регулируется уровнем метаболизма. Различные воздействия оказывают влияние на регенерацию растений через изменение темпов и направленности обменных процессов. Поэтому управление процессами регенерации сводится к поиску оптимальных условий для перестройки метаболизма в благоприятном направлении.

По-видимому, повышение морфогенетической активности каллусов земляники связано с воздействием на предварительном этапе культивирования определенного физического фактора (внешнего «раздражителя»), такого как отсутствие освещения, что вызвало активацию и изменение метаболизма в клетках в направлении регенерации.

Для того чтобы избежать возможность потери и сохранить для дальнейшего изучения сформировавшиеся генотипы, провели тиражирование и укоренение побегов с использованием клонального микроразмножения. На этапе размножения в культуральную среду вводили 6-БАП в количестве 1,0 мг/л. Ризогенез стимулировали добавлением в состав питательной среды ИМК в концентрации 0,5 мг/л. В результате проведенных работ были размножены полученные из каллуса генотипы земляники.

Одним из перспективных направлений клеточной инженерии является улучшение растений путем культивирования клеток *in vitro*. Культивирование изолированных каллусных групп клеток и регенерация из них целых растений позволяет индуцировать соматоклональные вариации, которые основаны на спонтанных генетических изменениях, возникающих в выращиваемых *in vitro* клетках.

Механизм соматоклональной изменчивости пока точно неизвестен, но показана важность в данном процессе двух факторов [11]. Первый фактор заключается в том, что культура клеток должна пройти через дезорганизованную фазу роста (например, каллус) для того, чтобы в дальнейшем появились варианты растений, отличные от прототипа.

Второе существенное обстоятельство – частота и степень изменчивости, проявляющейся в регенерирующих растениях пропорционально времени нахождения их в фазе неорганизованного роста.

Методы индукции и отбора соматоклональных вариантов для плодовых культур пока еще разработаны слабо [12]. Исследования по изучению соматоклональной изменчивости в регенерировавших растениях земляники провели ряд авторов [5, 10, 12-14].

Установлено, что подавляющая часть измененных форм земляники не имеет практической ценности, но некоторые регенеранты представляют интерес для селекции, что свидетельствует о значении соматоклональной изменчивости для улучшения существующих сортов.

Проведена оценка степени изменений некоторых признаков растений-регенерантов земляники, полученных из каллусных культур сорта Урожайная ЦГЛ. Контролем в экспериментах служили растения, индуцированные из меристематических верхушек и размноженных в условиях *in vitro*. У опытных и контрольных регенерантов была проанализирована динамика изменчивости таких признаков, как количество цветоносов и сформировавшихся ягод на одном растении в R_0 , R_1 , R_2 вегетативном поколениях (R_1 изучали в течение двух вегетационных периодов).

Приведенные в табл. 4 данные анализа показывают, что варьирование признаков количества цветоносов и ягод у регенерировавших в каллусной культуре сорта Урожайная ЦГЛ растений выражено значительно сильнее, чем у контрольных. Причем это наблюдалось у регенерантов всех изученных вегетативных поколений.

В R_0 количество растений – регенерантов из каллуса, сформировавших более пяти цветоносов, составляло 11,0%, и в последующих поколениях этот показатель был примерно на одном уровне (12,7-10,9%), то есть изменчивость сохранялась. Аналогичная динамика отмечена и у опытных регенерантов, у которых не наблюдали развития цветоносов на растениях.

В R_1 и R_2 наблюдалась значительная степень изменчивости признаков количества цветоносов и ягод на опытных растениях по сравнению с контрольными. Так, в R_1 коэффициент вариации количества цветоносов на растении был на уровне 28,2-30,0%, а в контроле 11,3-2,7%.

По количеству ягод на растении показатель изменчивости был в пределах 29,4-24,5% (у контрольных регенерантов 3,6-4,5%). Подобная динамика отмечена в R_2 .

Таблица 4 – Изменчивость растений-регенерантов, полученных из каллуса земляники сорта Урожайная ЦГЛ (количество цветоносов и ягод на растении)

Вегетативное поколение	Вариант	% растений с цветоносами, шт.								Количество ягод на растении, шт.	Коэффициент вариации (V), %
		0	1	2	3	4	5	>5	Коэффициент вариации (V), %		
R_0	опыт	3,6	20,0	21,8	18,2	12,7	12,7	11,0	20,2	6,2	19,3
	контроль	0	16,4	34,5	43,6	5,5	0	0	6,8	6,8	4,0
R_1	опыт	3,6	18,2	21,8	16,4	12,8	14,5	12,7	28,2	4,3	29,4
	контроль	0	18,2	34,5	40,0	7,3	0	0	11,3	7,6	3,6
	опыт	3,6	16,4	21,8	25,5	9,1	10,9	12,7	30,0	2,5	24,5
	контроль	0	10,9	43,6	29,2	14,5	1,8	0	2,7	6,6	4,5
R_2	опыт	3,6	10,9	23,6	18,2	21,8	11,0	10,9	27,2	3,8	17,2
	контроль	0	10,9	38,2	40,0	9,1	1,8	0	2,7	6,4	3,8
Среднее за 4 года	опыт	3,6	16,8	22,3	19,6	14,1	12,3	11,8	26,4	4,2	22,6
	контроль	0	14,1	37,7	38,2	9,1	0,9	0	5,9	6,9	4,0

В среднем за 4 года наблюдений коэффициент вариации количества цветоносов в опыте составил 26,4% и ягод – 22,6%, а в контроле – 5,9% и 4,0 соответственно. Довольно низкий коэффициент вариации каждого признака в контроле у сорта Урожайная ЦГЛ показывает, что меристематические верхушки и индуцированные из них растения генетически наиболее стабильны и организованы.

У контрольных растений земляники сорта Урожайная ЦГЛ варьирование анализируемых признаков в среднем за 4 года было незначительным. Вариабельность между такими растениями – регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. Поэтому спектр вышеприведенных изменений, которые установлены у опытных растений, в контроле не отмечены.

Каллусные клетки, в отличие от соматических дифференцированных клеток, возникают путем неорганизованной пролиферации и не являются дифференцированными. По каллусным культурам приводится много данных о кариотипических нарушениях, происходящих в их клетках.

Поэтому в клетках каллусной ткани сорта Урожайная ЦГЛ более вероятно возникновение генетических изменений и формирование мутантных растений-регенерантов, в результате чего изолированные линии отличаются от исходных родительских форм по некоторым признакам, как это было показано в наших экспериментах.

Выводы. Процессы индукции адвентивных побегов зависят от используемых генотипов. Для изолированных каллусных эксплантов характерны сортовые различия в морфогенетических реакциях на присутствие в питательной среде регуляторов роста. Для успешной регенерации побегов необходимо, чтобы количество добавляемых в среду экзогенных регуляторов роста находилось в тесной связи с балансом эндогенных гормонов, синтезируемых конкретным генотипом.

Разработаны индукционные питательные среды с оптимальным сочетанием регуляторов роста, повышающие морфогенетический потенциал каллуса. Изменение стандартных условий культивирования путем воздействия на клетки каллуса внешним «раздражителем» (освещение) позволило значительно повысить выход побегов-регенерантов (опыт 55,2-80,0 %, контроль 46,7-60,0 %).

Анализ регенерантов, полученных в каллусной культуре земляники сорта Урожайная ЦГЛ, показал значительную изменчивость некоторых признаков, а именно, количества цветоносов ($V=26,4\%$) и ягод ($V=22,6\%$) на растении, которая сохранялась в вегетативных поколениях, что, возможно, является следствием фенотипического выражения непостоянства ядерного генома клетки.

Разработанные методические подходы к повышению морфогенетического потенциала каллусных культур могут быть использованы для других сортов, относящихся к виду *F. ananassa Duch*, с целью повышения эффективности и направленности селекционного процесса земляники.

Литература

1. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 93 с.
2. Калашникова, Е.А. Клеточная инженерия растений / Е.А. Калашникова. – М.: Изд-во РГАУ – МСХА, 2012. – 317 с.
3. Кефели, В.И. Рост растений / В.И. Кефели. – М.: Колос, 1973. – 120 с.
4. Skoog, F. Chemicol regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro/F. Shoog, C.O. Miller//Symp.Soc.Exptl.Biol.– 1957.– vol.11 – P. 118-131.
5. Jones, O.P. The production of strawberry plants from callus cultures/O.P. Jones, B.J. Waltes, M.G. Beech//Plant Cell Tissne Cult. – 1988. – vol.12. – №3. – P. 235-241.
6. Nehro, N.S. Regeneration of plant from immture leaf – derived callus of strawberry (*Fragaria ananassa*) / N.S. Nehro, C. Strushnoff, K.K. Katha // Plant Sci. – 1990. – vol.66. - №1. – P.119-126.
7. Высоцкий, В.А. Возможности регенерации растений земляники и малины из каллусов различного происхождения / В.А. Высоцкий, Ф.М. Хамукова // Ягодководство в Нечерноземье. – 1993. – С. 19-24.
8. Расторгуев, С.Л. Разработка способов индукции растений-регенерантов земляники и малины в культуре тканей /С.Л. Расторгуев // Доклады и сообщения XVIII Мичуринских чтений «Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем». – Мичуринск, 1998. – С. 49-52.

9. Расторгуев, С.Л. Клеточные технологии в селекции плодовых и ягодных культур/С.Л. Расторгуев // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2001. – Т. 1. – №1. – С. 99-103.

10. Тюленев, В.М. Соматоклональная изменчивость земляники / В.М. Тюленев, Н.В. Соловых // Биотехнология. – 1999. – №2. – С. 34-40.

11. Харченко, П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.

12. Высоцкий, В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве / В.А. Высоцкий // Садоводство и виноградарство. – 2006. – №2. – С. 2-3.

13. Simon, I. Preliminary notes on somaclonal variation of strawberry // I. Simon, E.Racz, J.M.Zatyko // Fruit. Sci. Rep. Skierniewice. – 1987. – vol.14. - №4. – P. 151-154.

14. Расторгуев, С.Л. Регенерация растений и применение культуры тканей в селекции земляники / С.Л. Расторгуев, В.М. Тюленев // Аграрная наука. – 2005. – №12. – С. 16-19.

References

1. Kataeva, N.V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rasteniy / N.V. Kataeva, R.G. Butenko. – М.: Nauka, 1983. – 93 s.

2. Kalashnikova, E.A. Kletochnaya inzheneriya rasteniy / E.A. Kalashnikova. – М.: Izd-vo RGAU – MSHA, 2012. – 317 s.

3. Kefeli, V.I. Rost rasteniy / V.I. Kefeli. – М.: Kolos, 1973. – 120 s.

4. Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro/F. Skoog, C.O. Miller//Symp.Soc.Exptl.Biol. – 1957. – vol.11 – P. 118-131.

5. Jones, O.P. The production of strawberry plants from callus cultures/O.P. Jones, B.J. Waltes, M.G. Beech//Plant Cell Tissue Cult. – 1988. – vol.12. – №3. – P. 235-241.

6. Nehro, N.S. Regeneration of plant from immature leaf – derived callus of strawberry (*Fragaria ananassa*) / N.S. Nehro, C. Strushnoff, K.K. Katha // Plant Sci. – 1990. – vol.66. - №1. – P.119-126.

7. Vysotskiy, V.A. Vozmozhnosti regeneratsii rasteniy zemlyaniki i maliny iz kallusov razlichnogo proishozhdeniya / V.A. Vysotskiy, F.M. Hamukova // Yagodovodstvo v Nechernozem'e. – 1993. – S. 19-24.

8. Rastorguev, S.L. Razrabotka sposobov induktsii rasteniy-regenerantov zemlyaniki i maliny v kul'ture tkaney /S.L. Rastorguev // Doklady i soobscheniya XVIII Michurinskih chteniy «Ispol'zovanie biotekhnologicheskikh metodov dlya resheniya genetiko-selektsionnykh problem». – Michurinsk, 1998. – S. 49-52.

9. Rastorguev, S.L. Kletochnye tehnologii v selektsii plodovykh i yagodnykh kul'tur/S.L. Rastorguev // Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2001. – Т. 1. – №1. – С. 99-103.

10. Tyulenev, V.M. Somaklonal'naya izmenchivost' zemlyaniki / V.M. Tyulenev, N.V. Solovyh // Biotekhnologiya. – 1999. – №2. – С. 34-40.

11. Harchenko, P.N. DNK-tehnologii v razvitii agrobiologii / P.N. Harchenko, V.I. Glazko. – М.: Voskresen'e, 2006. – 480 s.

12. Vysotskiy, V.A. Biotekhnologicheskie priemy v sovremennom sadovodstve / V.A. Vysotskiy // Sadovodstvo i vinogradarstvo. – 2006. – №2. – С. 2-3.

13. Simon, I. Preliminary notes on somaclonal variation of strawberry // I. Simon, E.Racz, J.M.Zatyko // Fruit. Sci. Rep. Skierniewice. – 1987. – vol.14. - №4. – P. 151-154.

14. Rastorguev, S.L. Regeneratsiya rasteniy i primeneniye kul'tury tkaney v selektsii zemlyaniki / S.L. Rastorguev, V.M. Tyulenev // Agrarnaya nauka. – 2005. – №12. – С. 16-19.