

УДК 582.681.26:57.085:2

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ГИБРИДНЫХ ФОРМ *SAINTPAULIA IONANTHA WENDL.*

Н.Н. ИВАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН Украины
 98648, Украина, АР Крым, г. Ялта, пгт Никита,
 e-mail: in_vitro@ ukr.net

Приведены результаты изучения морфогенетического потенциала листовых эксплантов зеленолистных (сортов *Alocha Orchid*, *Ruffled Skyes*, *Ruffles Snow Rose*) и пестролистных (сортов *Apachi Midnight*, *Margery's Melody*, *Ness Orange Pekoe*) гибридных форм сенполии (*Saintpaulia ionantha Wendl.*). Установлены основные закономерности процесса органогенеза сенполии в культуре *in vitro*, и на их основе разработан способ клонально-го микроразмножения шести сортов двух гибридных форм. Показано, что образование адвентивных почек и микророзеток в культуре листовых эксплантов осуществлялось через прямой органогенез в присутствии в среде в качестве регуляторов роста БАП и НУК. Укоренение микророзеток сенполии происходило на безгормональной среде. На этапе адаптации *in vivo* для полученных регенерантов был подобран эффективный адаптационный субстрат, что позволило получить максимальное количество развившихся растений.

Ключевые слова: сенполия, регенерация, клональное микроразмножение, регенерант, культура *in vitro*.

Введение. Среди горшечных цветочно-декоративных культур особый интерес представляют растения сенполии (*Saintpaulia ionantha Wendl.*), относящиеся к семейству *Gesneriaceae* [1]. Они отличаются высокой декоративностью, длительным цветением, большим разнообразием форм и окраски цветков и листьев. Пестролистные сенполии имеют листья с пятнистыми узорами белой, кремовой и розовой окраски. В результате успешной селекции в последние годы получено множество гибридных форм этих растений, что также способствует их широкому распространению [2–3]. Традиционно сенполии размножают семенами и листовыми черенками. Недостатком вегетативного способа является низкий коэффициент размножения, так как от одного листа можно получить 3–4 растения. Однако многие гибридные сорта и формы сенполии не размножаются вегетативно.

Успехи, достигнутые в области культивирования клеток, органов и тканей растений, привели к разработке эффективных методов размножения в условиях *in vitro*, которые позволяют быстро и в больших количествах получать растения, идентичные исходным генотипам [3, 4]. При использовании метода клонального микроразмножения появилась возможность получать до сотен тысяч и миллиона растений-регенерантов в год с одного маточного растения. Однако при клональном микроразмножении необходимо учитывать специфические особенности, которые возникают при работе не только с отдельными видами, сортами растений, но и с различными типами эксплантов. Имеется ряд публи-

каций, посвященных изучению различных путей морфогенеза *in vitro* и разработке отдельных биотехнологических приемов микроразмножения сенполии [5–9]. Однако эти приемы не являются универсальными для всех сенполий, так как разработаны в основном для отдельных сортов и гибридных форм.

Целью данной работы было изучение процесса органогенеза в условиях *in vitro* и получение регенерантов перспективных промышленных гибридных зеленолистных и пестролистных форм *Saintpaulia ionantha* Wendl.

Материалы и методы

Объектами исследования служили интродуцированные гибридные формы сенполии: сорта пестролистных форм – Apache Midnight, Margery's Melody, Ness Orange Pekoe; сорта зеленолистных форм – Alocha Orchid, Ruffled Skyes, Ruffles Snow Rose. В качестве эксплантов использовали высечки листа. Листья отбирали с 2–3-летних растений, выращиваемых в условиях закрытого грунта при невысокой влажности и ограниченном поливе. При проведении экспериментальных работ использовали общепринятые методы культуры изолированных клеток, органов и тканей растений *in vitro* [10–12].

Поверхностную стерилизацию листьев проводили 1 %-ным раствором Thimerosal (Merck, Германия) в течение 25 мин, 70 %-ным C_2H_5OH (Медасепт, Украина) – 1 мин, 0,08 %-ным раствором нитрата серебра $AgNO_3$ (Merck, Германия) – 3–5 мин, а затем четырежды промывали стерильной дистиллированной водой. Высечки листа сенполии исследуемых сортов размером 1 x 1 см культивировали на модифицированной питательной среде МС [13] (S 1) с половинным набором макро- и микросолей, витаминами, дополненной БАП в концентрации 1,33–3,11 мкМ, кинетином – 1,39–5,93 мкМ, 0,54 мкМ ИУК, 0,57

мкМ ИУК, 3 % сахарозы и 0,8 % агара, располагая экспланты абаксиально и адаксиально к поверхности питательной среды. Культуральные сосуды с листовыми эксплантами помещали в термостат при температуре 28 °С и после появления адвентивных почек и микророзеток переносили в климатическую камеру с температурой $23 \pm 1^\circ C$, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2–3 клк. Эксперименты проводили трижды в десятикратной повторности. Определяли среднее количество высечек листа, образующих микророзетки, среднее количество образующихся микророзеток на эксплант через 4 и 8 недель культивирования.

Укоренение микророзеток *S. ionantha* высотой 2–3 см осуществляли на агаризованной питательной среде S 3 в отсутствии фитогормонов. При этом учитывали количество укоренившихся микророзеток, количество корней на розетку, среднюю длину корней. Полученные регенеранты *S. ionantha* пересаживали на адаптацию *in vivo* в специально подготовленный субстрат: торф; перлит; «микрочапан» (торф, обогащенный микроэлементами); торф и перлит (1:1, 2:1); «микрочапан» и перлит (1:1, 2:1); перлит, торф и песок (1:6:4); торф и песок (1:1, 2:1, 3:1). Спустя 40 суток определяли число прижившихся растений. Адаптированные растения переносили в теплицу и высаживали в вазоны с соответствующими почвенными смесями.

Результаты и обсуждение

Одним из методов клонального микроразмножения является прямая регенерация. Метод основан на способности изолированных частей растений при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать новые растения. Известна стимулирующая роль регуляторов роста, которые индуцируют

образование адвентивных почек из тканей листа [14].

Образование адвентивных почек сенполии происходило в области центральной жилки и по краю высечки листа, помещенных на поверхность агаризованной питательной среды S 1 (табл. 1), содержащей макро- и микроэлементы по МС в поло-

винной концентрации и дополненной различными комбинациями и концентрациями регуляторов роста: (1,39–5,93 мкМ кинетина и 0,57 мкМ ИУК, 1,33–3,11 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК). Подобные результаты были получены и при работе с листовыми эксплантами каладиума [15] и антуриума [16]. Известно, что необходимым усло-

Таблица 1. Составы агаризованных питательных сред для различных этапов морфогенеза в культуре листовых эксплантов *S. ionantha*

Компоненты	Индукция побегообразования S 1	Собственно микроразмножение S 2	Ризогенез S 3
Макросоли, мг/л:			
NH_4NO_3	825	825	825
KNO_3	950	950	950
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220	220	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185	185	185
KH_2PO_4	85	85	85
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13,9	13,9	13,9
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18,65	18,65	18,65
Микросоли, мг/л:			
H_3BO_3	3,1	3,1	3,1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11,2	11,2	11,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0125	0,0125	0,0125
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125	0,0125	0,0125
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,3	4,3	4,3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125	0,125	0,125
KI	0,415	0,415	0,415
Витамины, мкМ:			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-НСI	0,29	0,29	0,29
Пиридоксин-НСI	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	4,06	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
Регуляторы роста, мкМ:			
БАП	2,22	0,44	–
НУК	0,54	–	–
Сахароза, г/л	30,0	30,0	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0	8,0

вием регенерации микророзеток является наличие регуляторов роста в питательной среде. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что для высечек листа пестролистных и зеленолистных форм наиболее эффективным оказалось введение в состав питательной среды 2,22 мкМ БАП и 0,54 мкМ ИУК. В этом случае 96 % высечек листа зеленолистных форм и 90 % – пестролистных были способны к активной регенерации микророзеток (рис. 1). При этом среднее количество микророзеток на эксплант у зеленолистных форм *S. ionantha* составило 20–25 штук, а у пестролистных – 15–20 шт. Использование 1,39–5,93 мкМ кинетина и 0,57 мкМ ИУК для исследуемых сортов сенполии оказалось менее эффективным. Из данных, представленных на рис. 2, следует, что частота регенерации микророзеток у пестролистных форм составляла в среднем 43 %, у зеленолистных – 50 %. По сравнению с БАП и ИУК кинетин и ИУК в среднем на 8–10 суток замедляли процесс побегообразования. Количество микророзеток составляло 8–10 шт./эксплант у пестролистных и 10–13 шт./эксплант у зеленолистных форм. В основании микророзеток формировались корни длиной 0,4–0,6 см.

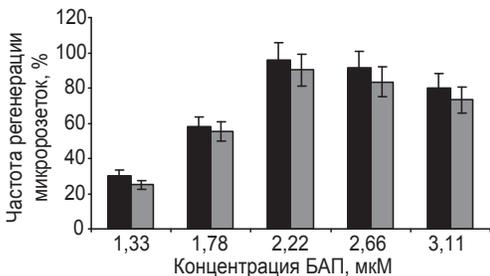


Рис. 1. Влияние концентрации БАП в питательной среде на частоту регенерации микророзеток *S. ionantha* спустя 8 недель культивирования (0,54 мкМ ИУК): ■ – зеленолистные; ▒ – пестролистные

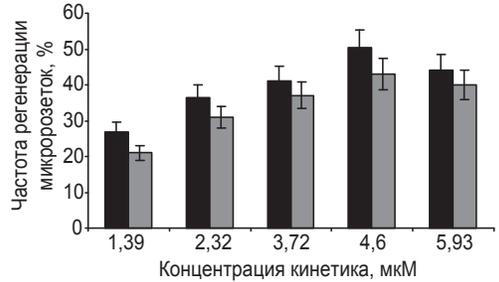


Рис. 2. Влияние концентрации кинетина на частоту регенерации микророзеток зеленолистных и пестролистных форм сенполии спустя 8 недель культивирования (0,57 мкМ ИУК): ■ – зеленолистные; ▒ – пестролистные

Известно, что высокие концентрации цитокининов и ауксинов оказывают негативное действие на морфогенетические особенности получаемых растений, а также на возможность длительного микроразмножения в условиях *in vitro*. В наших исследованиях увеличение концентрации БАП до 2,66–3,11 мкМ приводило к угнетению процесса регенерации микророзеток. Наблюдали деформацию листовых пластинок и формирование рыхлого каллуса. Возможно, в процессе культивирования микророзеток происходит постепенное накопление регуляторов роста в культивируемых тканях выше необходимого физиологического уровня и при этом они оказывают токсическое действие. Симптомы такого действия проявились в изменении морфологии растений и подавлении адвентивного побегообразования.

Выявлены некоторые особенности процесса органогенеза у сортов растений *S. ionantha* с пестрыми листьями. Установлено, что пестролистность сохранялась при размножении сортов, листовые экспланты которых на этапе введения на питательную среду содержали не меньше 45–50 % хлорофильных участков. Способность к регенерации микророзеток у таких эксплантов была ниже, чем у зеленолистных при культивировании на средах одина-

кового состава. Основная масса микророзеток регенерировала в зеленоокрашенных участках эксплантов.

При проведении экспериментов была выявлена зависимость регенерационной способности высечек листа *S. ionantha* двух форм от размера и расположения экспланта на поверхности питательной среды. В среднем 92 % листовых эксплантов зеленолистных форм и 89 % – пестролистных форм размером 1 × 1 см регенерировали микропобеги. Установлено, что адаксиальное расположение эксплантов на поверхности питательной среды увеличивало частоту регенерации по сравнению с абаксиальным до 98 % у зеленолистных и до 95 % у пестролистных форм.

Сформировавшиеся микророзетки быстро разрастались по всей поверхности экспланта. Для дальнейшего роста и развития микророзетки отделяли, разделяли и переносили на питательную среду S 2 для собственно микроразмножения, содержащую половинную концентрацию макро- и микросолей, витамины и сахарозу по МС, дополненную 0,44 мкМ БАП.

Укоренение микропобегов и адаптация растений к нестерильным условиям выращивания являются завершающими и часто наиболее сложными этапами клонального микроразмножения растений. Ризогенез индуцировали добавлением в питатель-

ную среду S 3 НУК в различных концентрациях, а также использовали безгормональную среду S3. Укоренение микропобегов *S. ionantha* по сравнению с другими культурами не вызывало особых трудностей. Корни часто формировались спонтанно на среде для размножения, однако в дальнейшем при адаптации такие регенеранты оказались нежизнеспособными. Применение НУК оказалось неэффективным: наряду с появлением корней происходило формирование рыхлого каллуса в основании микророзетки, ее рост и формирование новых листьев. Данные признаки в дальнейшем отрицательно влияли на адаптацию растений, что связано с высокой транспирацией. Использование безгормональной питательной среды S 3 с витаминами по прописи S МС и 20 г/л сахарозы способствовало формированию нормальных корней. Корнеобразование происходило на 12–14 сутки культивирования. Среднее количество корней на побег у зеленолистных форм составило 5–6 шт. длиной 1,8–2,0 см, у пестролистных – 4–5 шт. длиной 1,5–2,0 см. При этом процент укоренившихся микропобегов зависел от сортовых особенностей (табл. 2). Частота укоренения микророзеток сортов зеленолистных форм составляла 91–98 %, пестролистных – 73–88 %. Во всех вариантах отмечали формирование в

Таблица 2. Морфологические особенности растений двух форм *S. ionantha* на безгормональной среде S 3 (через 40 суток культивирования)

Сорт	Длина микророзетки, см	Число корней, шт.	Длина корня, см	Частота укоренения, %
Зеленолистные формы				
Alocha Orchid	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,6	2,0 ± 0,7	97,3 ± 2,9
Ruffled Skyes	4,0 ± 0,6	5,3 ± 0,7	2,1 ± 0,7	91,6 ± 2,7
Ruffles Snow Rose	5,0 ± 0,5	6,1 ± 0,8	1,8 ± 0,8	98,4 ± 0,9
Пестролистные формы				
Apachi Midnight	3,5 ± 0,6	5,4 ± 0,7	1,5 ± 0,6	75,4 ± 2,4
Margery's Melody	4,0 ± 0,7	5,1 ± 0,7	2,0 ± 0,8	73,5 ± 2,6
Ness Orange Pekoe	3,8 ± 0,5	4,0 ± 0,5	1,7 ± 0,7	88,4 ± 1,7

Таблица 3. Частота приживаемости регенерантов *S. ionantha* на различных субстратах в условиях *in vivo*

Тип субстрата	Частота приживаемости, %			
	Зеленолистные формы		Пестролистные формы	
	7 суток	40 суток	7 суток	40 суток
Перлит	65,2 ± 4,5	59,0 ± 4,3	62,0 ± 4,5	54,0 ± 4,6
Торф	22,3 ± 2,3	6,7 ± 3,4	19,0 ± 2,9	17,0 ± 2,9
«Микропарник»	40,1 ± 3,7	22,0 ± 2,5	35,3 ± 3,9	20,2 ± 2,6
«Микропарник:» перлит 1:1	95,3 ± 4,7	90,1 ± 3,8	84,0 ± 4,2	78,0 ± 3,7
«Микропарник:» перлит 2:1	89,5 ± 3,8	83,0 ± 4,2	79,3 ± 3,8	72,2 ± 3,9
Перлит: торф: пе-сок 1:6:4	50,0 ± 2,5	50,0 ± 2,5	52,0 ± 2,7	46,0 ± 4,7

среднем от 4,0 ± 0,6 шт. до 6,1 ± 0,8 шт. корней на микророзетку со средней длиной 1,5 ± 0,6 см – 2,1 ± 0,7 см. Через 3 недели регенеранты переносили на адаптацию.

Рост микророзеток на этапе укоренения также зависел от генотипа. Для зеленолистных форм *S. ionantha* этот показатель находился в пределах 4–5 см, в то время как пестролистные проявляли пониженную активность к росту микророзеток (3,5–4 см). По-видимому, это связано с физиологическими особенностями растений.

Наряду с этим важное значение при разработке способа клонального микроразмножения имеет адаптация растений, полученных в культуре *in vitro*. Поскольку субкультивируемые растения находятся длительное время в условиях с высоким содержанием органических и неорганических веществ, регуляторов роста, высокой влажности – все это вызывает структурные и физиологические изменения в растениях. Поэтому важную роль играет постепенный переход растений из условий *in vitro* в условия *in vivo*. Как показали результаты экспериментов, процесс предадаптации растений к условиям *in vivo* способствовал снижению риска гибели

регенерантов в период адаптации. Культуральные сосуды оставляли в полуткрытом виде в течение 3–4 суток при температуре 24 °С и повышенной интенсивности освещения до 6–8 клк. За этот период нами не было отмечено попадания инфекции из окружающей среды на питательную среду. Полностью сформированные растения высаживали в перлит, накрывая тонкостенными прозрачными изоляторами на 10–14 суток, а затем в пластиковые стаканчики диаметром 7 см с субстратами разного состава (табл. 3).

Оптимальным субстратом оказалась смесь «микропарника» и перлита (1:1). В этом случае отмечена максимальная частота приживаемости регенерантов *in vivo*. Установлено, что 78,0–90,1 % растений, находящихся в течение 1,5–2 месяцев на СУВРе при температуре 21–22 °С, интенсивности освещения 2–3 клк, относительной влажности воздуха 70 % и фотопериоде 14–16 часов, адаптировались к условиям *in vivo*. После адаптации растения *S. ionantha* изучаемых сортов переносили в теплицу, где после высадки в вазоны через 3–3,5 месяца вступали в цветение.

Выводы

Таким образом, в процессе исследований установлены особенности гормональ-

ной регуляции морфогенеза в условиях *in vitro* листовых эксплантов сенполии и подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста в питательных средах для этапов индукции развития эксплантов, регенерации микророзеток и их укоренения. Определены состав адаптационной смеси и условия дорастивания растений-регенерантов *in vivo*. Разработан способ клонального микроразмножения для сортов Apache Midnight, Margery's Melody, Ness Orange Пекое; Alocha Orchid, Ruffled Skyes и Ruffles Snow Rose начиная от введения эксплантов в условия *in vitro* до получения укорененных растений, адаптированных к условиям закрытого грунта.

Список литературы

1. Котовщицкова Н.И. К вопросу культивирования сенполий (биология и экология) // Труды Никит. ботан. сада. – 1976. – Т. 68. – С. 98–107.
2. Shibata M. Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding // Plant Biotechnology. – 2008. – № 25. – Р. 3–8.
3. Basal S.K. Ornamental Plant and Biotechnology. – Jaipur: Book Enclave, 2007. – VIII. – 308 p.
4. Geneve Eds. R. L., Preece J. E., Merkle S. A. Biotechnology of ornamental plants. – Wallingford CAB International, 1977. – 412 p.
5. Сабурова В., Охрименко Г., Гапоненко А. Сенполии *in vitro* // Цветоводство. – 1995. – № 1. – С. 7.
6. Bilkey P.C. McCown B.H., Hildebrandt A.C., Bilkey P.C. Micropropagation of African Violet from petiole cross sections // Hort Science. – 1978. – Vol. 13. – Р. 37–38.
7. Grout B.W.W. African violet // Handbook of plant cell culture : editors Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. – New York: MacGraw–Hill Publ. Co., 1990. – Vol. 5. – P. 181–205.
8. Grunewaldt J. Adventivknospenbildung und Pflanzenregeneration bei Gesneriaceae *in vitro* // Gartenbauwissenschaft. – 1977. – В. 42, № 4. – С. 171–175.
9. Mithila J., Hall J., Victor J.M.R., Saxena P.K. Thidiazuron induced shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet *Saintpaulia ionantha* Wendl. // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 408–414.
10. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
11. Калинин Ф.Л., Кушнер Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
12. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189–199.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
14. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК – Пресс. – 1999. – 160 с.
15. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Пути реализации морфогенетического потенциала каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) и цветной каллы (*Zantedeschia hybrida*) в условиях *in vitro* // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 64–67.
16. Иванова Н.Н. Микроразмножение *Anthurium andreaeanum* Lind. и *Begonia Riger Elatior* в условиях *in vitro* // Булл. Никит. ботан. сада. – 2002. – Вып. 86. – С. 40–42.

Представлена Е.Н. Бублик
Поступила 8.06.2011

МИКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ГІБРИДНИХ ФОРМ *SAINTPAULIA IONANTHA* WENDL.

Н.М. Иванова

Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр НААН України
Україна, 98648, АР Крим, м. Ялта, смт Нікіта
e-mail: in_vitro@ukr.net

Наведені результати вивчення морфогенетичного потенціалу листових експлантів зеленолистих (сортів Alocha Orchid, Ruffled Skyes, Ruffles Snow Rose) та строкатолистих (сортів Apache Midnight, Margery's Melody, Ness Orange Пекое) гібридних форм сенполії (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Встановлені основні закономірності процесу органогенезу сенполії в культурі *in vitro* та на їхній основі розроблено спосіб клонального мікророзмноження шести сортів гібридних форм. Показано, що утворення адвентивних бруньок та микророзеток у культурі листових експлантів здійснювалося через прямий органогенез за присутності в середовищі як регуляторів росту БАП і НОК.

Укорінення мікророзеток відбувалося на безгормональному середовищі. На етапі адаптації *in vivo* для одержаних регенерантів було підбрано ефективний адаптаційний субстрат, що дало змогу одержати максимальну кількість розвинутих рослин.

Ключові слова: сенполія, регенерація, клональне мікророзмноження, регенерант, культура *in vitro*.

MICROCLONAL PROPAGATION OF SAINT-PAULIA IONANTHA WENDL. HYBRID FORMS

N. Ivanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre NAAS of Ukraine
Ukraine, 98648, Crimea, Jalta, Nikita
e-mail: in_vitro@ukr.net

The results of investigation into the morphogenetic potential of leaf explants from green-leaved (cv. Alocha Orchid, Ruffled

Skyles, Ruffles Snow Rose) and variegated (cv. Apachi Midnight, Margery's Melody, Ness Orange Pekoe) hybrids of *Saintpaulia* (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) have been presented. The main regularities underlying the process of *Saintpaulia* organogenesis *in vitro* were established and method of clonal micropropagation in six varieties of two hybrid forms was developed. The formation of adventitious buds and leaf microrosettes in culture of leaf explants was shown to realize through the direct organogenesis in the nutrient medium supplemented with BAP and NAA growth regulators. The microrosettes rooting occurred in hormone-free nutrient medium. To adapt the derived regenerants to conditions *in vivo* an efficient adaptive substrate was specified to allow obtaining the developed plants.

Key words: *S. ionantha*, regeneration, clonal micropropagation, regenerant, culture *in vitro*.