ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ГЛОКСИНИИ ГИБРИДНОЙ

**Зарипова А.А., Мухаметвафина А.А.,
Уразбахтина К.А., Шигапова А.И.,
Ахметова А.Ш., Шигапов З.Х.**

Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: zaripova.al@mail.ru

CLONAL MICROPROPAGATION OF HYBRID GLOXINIA

**Zaripova A.A., Mukhametshina A.A.,
Urazbakhtina K.A., Shigapova A.I.,
Akhmetova A.Sh., Shigapov Z.Kh.**

South Ural Botanical garden - Institute of the Ufa Federal
Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: zaripova.al@mail.ru

В статье представлены результаты клонального микроразмножения декоративно-цветущего сорта глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream'. Разработаны условия введения в культуру *in vitro* фрагментов листовых пластинок, позволяющие получить 97 % жизнеспособных эксплантов. Выявлен оптимальный состав питательной среды Мурасиге и Скуга, содержащий БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК в концентрации 0,2 мг/л, обеспечивающие высокую регенерацию адвентивных побегов. Укоренение происходит на питательной среде без дополнительной гормональной стимуляции для образования корней. Достигнута высокая (95 %) приживаемость растений-регенерантов при переводе их в условия *ex vitro*.

Ключевые слова: *Gloxinia hybrida*, культура *in vitro*, регенерация, ризогенез, клональное микроразмножение, перевод растений-регенерантов *ex vitro*

The article presents the results of clonal micropropagation of the decorative flowering variety gloxinia hybrid *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream'. The conditions for the introduction of leaf blade fragments into the culture *in vitro*, allowing to obtain 97 % of viable explants. The optimal composition of the nutrient medium Murashige and Skoog, containing BAP at a concentration of 0.5 mg/l and IAA at a concentration of 0.2 mg/l providing high regeneration of adventive shoots were revealed. Rooting occurs in the nutrient medium without additional hormonal stimulation for root formation. A high (95 %) survival rate of regenerating plants was achieved when they were transferred to *ex vitro* conditions.

Keywords: *Gloxinia hybrida*, *in vitro* culture, regeneration, rhizogenesis, clonal micropropagation, the transfer of regenerated plants to *ex vitro*

Поступила в редакцию: 16.09.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-4-533-539](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-533-539)

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в промышленном производстве размножения цветочных культур во всем мире наиболее перспективным является метод культуры тканей и органов растений. Этот метод имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения растений, такие как: получение генетически однородного посадочного материала; получение безвирусных растений за счет использования меристемной культуры; высокий коэффициент размножения; возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала; пробирочные растения легко транспортировать на любые расстояния [Основы биотехнологии..., 2017].

Использование технологий микроклонального размножения позволяет сократить время выращивания до реализации товара, к примеру, для декоративно-лиственных бегоний и декоративно-цветочных сенполий, глоксиний на 1-1,5 мес., для хризантем, лилий, гвоздик и орхидей – на 3-4 месяца. Размножая какой-либо новейший сорт, можно вырастить несколько миллионов растений за один год, и, достигнув их в течение 2-3 лет, получить

качественный посадочный материал. При обычных методах размножения для этого понадобилось бы более 10 лет [Катаева, Бутенко, 1983].

В мировом масштабе большая часть декоративно-цветочного ассортимента массового производства выпускается с применением технологий микрклонального размножения. Лидером микроразмножения растений в Западной Европе являются Нидерланды (около 70 лабораторий занимается микроразмножением). Это связано с традиционной ориентацией на производство декоративных культур, где Нидерланды доминируют на мировом рынке (около половины мирового экспорта цветов на срезку и декоративных растений экспортируется из этой страны) [Милехин, Рубцов, 2015]. Наиболее важными группами растений, размножаемых *in vitro* в этой стране, являются такие декоративные культуры, как горшечные растения, орхидеи и луковичные.

В России накоплен большой опыт по микрклональному размножению наиболее востребованных культур. Практически во всех научно-исследовательских институтах, селекционных центрах созданы лаборатории биотехнологии, одна из главных задач которых оздоровление и микрклональное размножение ценного селекционного материала и перспективных сортов [Бутенко, 1999; Милехин, Рубцов, 2015].

Цель работы состояла в разработке приёмов клонального микроразмножения глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream' в культуре *in vitro*. Для достижения этой цели поставлены следующие задачи: определить способ получения стерильной культуры, выявить оптимальный состав питательной среды, обеспечивающие регенерацию и укоренение адвентивных побегов *in vitro*, подобрать условия перевода растений-регенерантов *ex vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для клонального микроразмножения глоксинии гибридной использован метод культуры тканей и органов растений [Бутенко, 1964].

Глоксиния гибридная (*Gloxinia hybrida* hort.) – многолетнее травянистое клубневое растение семейства геснериевые (*Gesneriaceae*) с укороченным стеблем. Листья цельные овальные, темно-зеленые, опушенные, собраны в розетку. Цветки крупные, на сочных цветоносах. Венчик с широко открытой воронковидной трубкой и шестилепестным отгибом, разнообразной окраски, с пятнами и штрихами в зеве или каймой по краю лепестков. Основным достоинством глоксинии является их неопишемое по красоте и форме цветение. Яркие цветки достаточно крупные, имеют широкую гамму окрасок, могут быть простыми и махровыми. Большинство видов способно цвести на протяжении 6 месяцев подряд, после сделать небольшой перерыв на 3-4 месяца и снова зацвести [Глоксиния гибридная..., 2019].

Объектом нашего исследования являлся махровый сорт глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream' голландской селекции, восхищающий крупными махровыми цветками цвета клубничного сока и белой каймой по краю лепестков. Цветонос крепкий средней длины. Куст компактный. Сорт предрасположен к букетному цветению. Произрастает в коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института г. Уфы.

В эксперимент отбирали неповрежденные листья генеративных растений, которые отмывали в слабом мыльном растворе в течение 15 мин с последующим промыванием проточной водопроводной водой 30 мин. Далее поверхностную обработку посадочного материала проводили в асептических условиях ламинар-бокса с использованием в качестве стерилизующих растворов 0,1 % диацид и 70 % этанол. Экспозиция воздействия

стерилизующих агентов составляла от 0,5 до 20 мин. Далее трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой по 15 мин. В качестве эксплантов использовали фрагменты листовых пластинок вместе с центральной жилкой размером 2-4 см².

Экспланты помещали на питательную среду в пробирки или колбы. Приготовление и стерилизацию питательных сред проводили согласно имеющимся рекомендациям [Бутенко, 1964; Калинин с соавт., 1980]. Для культивирования использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) [Murashige, Skoog, 1962], модифицированную по составу и концентрации регуляторов роста 6-бензиламинопурина (БАП), кинетина (Кин), 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) и индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Размножение проводили в контролируемых условиях 16-часового фотопериода, температуры 24°C, влажности воздуха не менее 70 %.

Растения-регенеранты пересаживали в контейнеры с почвенным субстратом и содержали в вегетационной комнате.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одним из главных факторов при введении в культуру *in vitro* является состояние экспланта. При этом нужно учитывать физиологический возраст экспланта и его размер.

В ходе наблюдений выявлено, что зрелые сформированные листья глоксинии, закончившие рост проявляли большую способность к морфогенезу по сравнению с молодыми и стареющими листьями.

Размер экспланта является еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Более крупные экспланты глоксинии дольше сохраняли жизнеспособность, не усыхала ткань листа и, соответственно, больше образовывалось меристематических очагов.

Известно, что процесс микроразмножения начинается с выделения и обеззараживания экспланта для дальнейшего получения асептической культуры. Экспланты листа глоксинии имели нежные и мягкие ткани, дезинфекцию растительного материала в асептических условиях проводили аккуратно, не травмируя их поверхность с использованием разных схем, приведенных в таблице 1.

Таблица 1. Влияние стерилизующих растворов на показатели стерильности и жизнеспособности эксплантов *Gloxinia hybrida hort. 'Strawberry Ice-Cream'*

№	Стерилизующий раствор	Экспозиция, мин.	Число стерильных эксплантов, %	Число жизнеспособных эксплантов, %
1.	70% этанол 0,1% диацид	0,5 8	80	80
2.	70% этанол 0,1% диацид	0,5 10	97	97
3.	70% этанол 0,1% диацид	0,5 20	100	30

В результате опыта выявлено, что в первом варианте стерилизации экспозиция в растворе диацита была мала, на что указывает недостаточно высокая доля стерильных эксплантов. При использовании третьей схемы стерилизации, несмотря на высокий процент стерильности, жизнеспособных эксплантов получено мало. Оптимальным вариантом стерилизации является выдерживание растительных объектов в 70% растворе этанола в

течение 0,5 мин и 0,1% растворе диацета в течение 10 мин. При данной схеме стерилизации получено максимальное число жизнеспособных и стерильных эксплантов.

Многие представители семейства геснериевые: сенполия, стрептокарпус, эписция, глоксиния и др. регенерируют растения из листовых пластинок, черенков, стеблей. При традиционном вегетативном размножении из одного листа глоксии получают одно растение. Использование метода культуры тканей позволяет добиться массового размножения выбранного сорта глоксии индукцией возникновения адвентивных почек *de novo* из небольших сегментов листьев, а именно – возникновение организованных структур непосредственно из специализированных тканей эпидермиса, субэпидермальных тканей, мезофилла листа и т.д.

При оптимальных условиях стерилизации все экспланты глоксии сорта 'Strawberry Ice-Cream', прошедшие асептическую обработку оставались способными к регенерации. Образования адвентивных почек из тканей растения можно добиться за счет внесения различного количества регуляторов роста в питательную среду. Этот процесс, как правило, происходит на культуральных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином. В качестве цитокинина применяют БАП или кинетин, как ауксин наиболее часто используют ИУК [Ахметова с соавт., 2015].

Стерильные экспланты глоксии помещали на пять вариантов питательной среды MS (табл. 2). Первые морфологические изменения наблюдались уже в первую неделю культивирования. Экспланты утолщались, особенно по местам срезов. Через две недели наблюдалось формирование первых адвентивных побегов. Через 1 месяц культивирования без проведения пассажа побеги образовывали 2-4 листочка (рис. 1).

Таблица 2. Влияние регуляторов роста на морфогенез *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream' в условиях *in vitro*

№	Регуляторы роста, мг/л				Тип морфогенеза
	БАП	Кин	ИУК	ИМК	
1.	-	-	-	-	Рост единственного побега с множеством корней (гемморизогенез)
2.	0,5	-	0,2	-	Бесконечная регенерация побегов (геммогенез)
3.	-	-	0,5	0,5	Рост корней (ризогенез)
4.	1,0	1,0	1,0	-	Бесконечная регенерация побегов (геммогенез), через две недели после их формирования наблюдалась витрификация
5.	0,5	-	0,5	-	Бесконечная регенерация побегов (геммогенез)

Оптимальными средами для формирования побегов являлись варианты питательной среды, содержащие БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК в концентрации 0,2 и 0,5 мг/л (таб. 2). На этих средах получен самый высокий коэффициент регенерации. На 1 см² листового экспланта формировалось около 50 побегов в течение одного месяца с начала визуальной регенерации. Далее наблюдали бесконечную закладку почек, пока ткань экспланта не отмирала. На питательной среде MS, содержащей БАП, кинетин и ИУК в равновесной концентрации по 1,0 мг/л наблюдалась еще более высокая образование адвентивных побегов. Однако культивирование эксплантов на этой среде в течение 6 недель приводило к частичной витрификации образующихся побегов. При этом наблюдается утолщение стебля, удлинение и искривление листьев из-за морфологического изменения тканей и увеличения размера клеток, что, прежде всего, связано с нарушением водного обмена. Одной из причин индукции таких изменений может быть низкая транспирация, вызванная аномальным развитием устьиц и строением покровных тканей. Для решения проблемы витрификации

Рис. 1. Регенерация адвентивных побегов *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream' на питательной среде MS, содержащей БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,2 мг/л через 1 месяц

снижали концентрацию БАП в среде до 0,5 мг/л, либо пересаживали на безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга (MSO), на которой через две недели культивирования побеги обретали нормальную морфологию. Еще через 4 недели более крупные побеги формировали корневую систему.

В асептических условиях ламинар-бокса из культуральных сосудов извлекали конгломерат побегов, отделяли побеги сформировавшие корни, побеги без корней пересаживали на среду MS для ризогенеза, содержащую ИУК

и ИМК по 0,5 мг/л. В течение 3-4 недель микропобеги образовывали корни и увеличивался габитус растений-регенерантов (рис. 2). Существенной разницы в развитии растений на питательной среде с добавлением гормонов и без них не наблюдалось. Использование на этапе укоренения питательной среды с ауксинами позволило ускорить ризогенез на 1-2 недели по сравнению с безгормональной питательной средой.

Дальнейшее дорастивание растений-регенерантов вызывало возникновение и развитие клубеньков. У всех растений глоксии на безгормональной среде продолжали формироваться дочерние побеги (рис. 3), хотя и не в таких объемах, как на среде размножения. Данный факт указывает на высокий морфогенетический потенциал у глоксии.

Рис. 2. Укоренение адвентивных побегов *Gloxinia hybrida* hort. 'StrawberryIce-Cream' на питательной среде MS, содержащей ИУК и ИМК в концентрации по 0,5 мг/л через 3 недели

Рис. 3. Развитие растений-регенерантов *Gloxinia hybrida* hort. 'StrawberryIce-Cream' на среде MSO

На следующем этапе размножения растения переводили в почвенный субстрат и содержали в условиях вегетационной комнаты. Растения глоксии с хорошо развитой корневой системой переносили в контейнеры с почвенной смесью (рис. 4), состоящей из равных частей садовой земли, перегноя и речного песка. Первые две недели растения *ex vitro* накрывали укрывным материалом "Агротекс". Полотно "Агротекс" пропускает воздух,

поддерживает влажность и защищает от колебания температуры, не пригибая их своей тяжестью. Приживаемость растений составила 90-95%. Через 3 недели растения-регенеранты рассаживали в отдельные вегетативные сосуды (рис. 5). Пересаженные глоксинии развивались образуя бутоны, спустя 1-1,5 месяца зацветали (рис. 6).

Рис. 4. Выращивание растений глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream' в почвенном субстрате

Рис. 5. Пересаженные в отдельные горшки растения-регенеранты глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream'

Рис. 6. Генеративные растения-регенеранты глоксинии гибридной *Gloxinia hybrida* hort. 'Strawberry Ice-Cream'

Махровые сорта глоксинии очень медленно размножаются. Размножая её листовыми черенками, с одного листа можем получить всего один побег. Зацветать растение будет через полтора года. В культуре *in vitro* с одного листа средней величины мы получаем 10-12 фрагментов размером 2 см². Далее на подобранной нами питательной среде на каждом экспланте вызываем регенерацию более 100 побегов.

Таким образом, благодаря использованию современных биотехнологических методов, а именно клонального микроразмножения, с одного листа мы получаем свыше тысячи идентичных растений за 6 месяцев, тем самым сокращая время размножения на целый год.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметова А.Ш., Миронова Л.Н., Зарипова А.А. Микроразмножение *Hosta albomarginata* (Hook) Ohwi изолированными зародышами // Агро XXI. 2015. № 4-6. С. 37-39.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
4. Глоксиния гибридная, синингия (*Sinningia hybrida* hort.) // Энциклопедия садовода-огородника / Режим доступа: <http://sadovnikonline.ru/gorshechnye-kultury/464-gloksiniya-gibridnaya-siningiya-sinningia-hybrida-hort.html>. Дата обращения: 06.09.2019 г.
5. Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
6. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
7. Милехин А.В., Рубцов С.Л. Технология микрклонального размножения хризантемы в условиях *in vitro* // Молодой ученый. 2015. № 24. С. 335-338. URL <https://moluch.ru/archive/104/24575/> Дата обращения: 20.07.2019 г.
8. Основы биотехнологии растений: учебное пособие / под ред. Р.Г.Фархутдинова. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 13. P. 473-497.