

СТАТЬЯ

УДК 581.143.6: 582.579.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛУБНЕЛУКОВИЦ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ СОРТОВ ГЛАДИОЛУСА (*GLADIOLUS X HYBRIDUS* HORT.) СЕЛЕКЦИИ УЧЕБНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА ПГНИУ**Шибанова Н.Л., Чемарова Т.Д.***Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, e-mail: shibanova7@mail.ru*

Представлены результаты исследований по микроклональному размножению четырех сортов гладиолуса: «Пермский сувенир», «Селенит», «Седой Урал», «Уралочка». В качестве экспланта выбраны апикальные и пазушные почки клубнелуковиц. Для всех изученных сортов гладиолуса наиболее оптимальным оказался следующий порядок применения стерилизующих агентов: этап пререстерилизации включал использование раствора нейтрального детергента в течение 50–60 мин и промывку проточной водой в течение 15 мин; на этапе стерилизации использовался 7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») в течение 20–25 мин и 96% этиловый спирт в течение 60 с. Для всех изученных сортов отмечается высокий процент выхода стерильной культуры (более 80) на варианте питательной среды Мурасиге и Скуга при добавлении никотиновой кислоты 0,5 мг/л и регуляторов роста – 6-бензиламинопурина 0,5 мг/л и α -нафтилуксусной кислоты 1 мг/л. Жизнеспособность эксплантов у всех сортов оказалась низкой. Она варьирует от 0 до 50%. Только для сорта «Пермский сувенир» этот показатель был достоверно выше ($p = 0,00$, $p < 0,05$) на варианте среды Мурасиге и Скуга при добавлении β -индолилуксусной кислоты в концентрации 0,5 мг/л и составил 64%.

Ключевые слова: микроклональное размножение, клубнелуковицы, *Gladiolus x hybridus hort.*, «Селенит», «Уралочка», «Седой Урал», «Пермский Сувенир»

USE OF CORMS IN MICROPROPAGATION OF GLADIOLUS CULTIVARS (*GLADIOLUS X HYBRIDUS* HORT.) SELECTION OF THE EDUCATIONAL BOTANICAL GARDEN OF PSU**Shibanova N.L., Chemarova T.D.***Perm State University, Perm, e-mail: shibanova7@mail.ru*

The results of research on micropropagation of 4 cultivars of *Gladiolus x hybridus hort.*: «Selenite», «Uralochka», «Gray Ural», «Perm Souvenir» are presented. The apical and axillary germs of corms were selected as the explant. For all the studied cultivars, the following procedure for using sterilizing agents turned out to be the most optimal: at the pre-sterilization – a solution of neutral detergent with an exposure of 50–60 min, washing with running water for 15 min; at the stage of sterilization – 7% solution of sodium hypochlorite with an exposure of 20–25 min and 96% ethyl alcohol with an exposure of 60 sec. A high percentage of sterile culture (more than 80) for all cultivars is observed on the variant of solid culture medium Murashige and Skoog with the addition of nicotinic acid 0,5 mg/l and growth regulators – 6-benzylaminopurine 0,5 mg/l and α -naphthylacetic acid 1 mg/l. The viability of explants in all varieties was low. It varies from 0 to 50%. Only for the «Perm Souvenir» this indicator was significantly higher ($p = 0,00$, $p < 0,05$) on a variant of the Murashige and Skoog medium with the addition of β -indolylacetic acid at a concentration of 0,5 mg/l and was 64%.

Keywords: micropropagation, corms, *Gladiolus x hybridus hort.*, «Selenite», «Uralochka», «Gray Ural», «Perm Souvenir»

В последнее время в нашей стране много внимания уделяется развитию цветоводства и получению качественной цветочной продукции. Ведущее место среди растений, которые выращиваются в открытом грунте, принадлежит гладиолусу, так как это одна из наиболее декоративных цветочных культур [1]. Микроклональное размножение является одним из современных методов, который позволяет получать значительное количество материала из небольших фрагментов ткани в течение относительно короткого промежутка времени [2].

Гладиолус гибридный среди клубнелуковичных растений относится к одной из наиболее подверженных различным заболеваниям цветочных культур. Особое внимание в работах по клональному размноже-

нию уделяется разработке метода, который позволит повысить коэффициент размножения свободных от инфекции и генетически стабильных растений, в селекционных работах – для создания новых и улучшения существующих сортов [3, 4].

Цель исследования: оценить возможность использования клубнелуковиц (верхушечных и пазушных почек) в качестве первичного экспланта при клональном микроразмножении сортов гладиолуса селекции Учебного ботанического сада Пермского государственного национального исследовательского университета.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены в 2018 г. в лаборатории микроклонального размно-

жения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. Объектами исследования были выбраны 4 сорта *Gladiolus* × *hybridus* hort. (рис. 1).

Сорт «Селенит» (413-С-18 Черткова, Шумихин) получен в результате скрещивания сортов «Golden Wave» (416-С-89) и «Долгожданный дебют» (543-С-84). Высота растения в период массового цветения достигает 155–165 см, а длина соцветия – 55–65 см. Соцветие двурядное, плотное, имеет 16–19 цветков, из которых одновременно раскрыты 6–7. Цветки имеют нежно-желтый цвет и карминно-малиновое пятно на нижних долях околоцветника. Характерна плотная фактура листочков. Растение имеет средний срок цветения. Оценка декоративных признаков составляет 97 баллов, хозяйственно ценных признаков – 38 баллов [5].

Сорт «Уралочка» (201-ОР-18 Черткова, Шумихин) получен в результате скрещивания сортов «Abbie» (399-СР-79) и «Ленгвинис» (475-С-91). В период массового цветения высота растений достигает 110–125 см, длина соцветия – 54–57 см. Соцветие очередное, плотное, имеет 14–16 цветков, из которых одновременно раскрыты 6–8. Цветки бледно-пурпурно-розовые, имеют пурпурно-желтое пятно на нижних долях околоцветника, гофрированные с плотной фактурой листочков. Сорт имеет очень ран-

ний срок цветения. Оценка декоративных признаков составляет 98 баллов, хозяйственно ценных качеств – 41 балл [6].

Сорт «Седой Урал» (300-С-18 Черткова, Шумихин) получен в результате скрещивания сортов «Si Foam» (500-РС-80) и «Медовый Спас» (327-С-97). В период массового цветения высота растений достигает 105–120 см, длина соцветия – 55–60 см. Соцветие двурядное, плотное, имеет 13–16 цветков, из которых одновременно раскрыты 6–9. Цветки белого цвета, имеют пурпурно-красные полосы на нижних долях околоцветника, гофрированные, с плотной фактурой листочков. Растение имеет средний срок цветения. Оценка декоративных признаков составляет 96 баллов, хозяйственно ценных качеств – 37 баллов [7].

Сорт «Пермский сувенир» (365-ОР-18 Черткова, Шумихин) получен в результате скрещивания сортов «Si Foam» (500-РС-80) и «Медовый Спас» (327-С-97). В период массового цветения высота растений составляет 105–120 см, длина соцветия – 58–61 см. Цветки светло-сиреневые, имеют яркое желто-малиновое пятно на нижних долях околоцветника, край ровный, с небольшими зазипами. Соцветие очередное, плотное, содержит 14–17 цветков, из которых одновременно раскрыты 7–8. Оценка декоративных признаков составляет 97 баллов, оценка хозяйственно ценных качеств – 44 балла [8].



Рис. 1. Изученные сорта гладиолуса: а – «Селенит»; б – «Уралочка»; в – «Седой Урал»; г – «Пермский сувенир»

Таблица 1

Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга для микроклонального размножения гладиолуса

Вариант среды	Витамины, мг/л	Фитогормоны	
		Ауксины, мг/л	Цитокинины, мг/л
1	+	ИУК – 0,5	–
2	+	ИУК – 0,1	–
3	+	НУК – 1	6-БАП – 2
4	+	–	–
5	+	НУК – 10	6-БАП – 0,5

Примечание. + витамины по Р.Г. Бутенко 0,1 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксин, 0,5 мг/л никотиновая кислота; прочерк означает отсутствие витаминов и/или регуляторов роста.

В качестве эксплантов использовались апикальные или пазушные почки клубнелуковиц. Всего было высажено 327 эксплантов. Для стерилизации материала применяли 3 режима, отличающиеся по времени нахождения в нейтральном детергенте и стерилизующем агенте и времени вычленения почек.

Экспланты высаживали в пробирки на твердую питательную среду, наиболее часто используемую для культуры растительных тканей, имеющую минеральную основу по Т. Murashige и F. Skoog (MS) [9]. В среду добавлялись 2% (у первого варианта среды) или 3% сахароза и 0,7% агар. Также в среду вносились витамины по Р.Г. Бутенко [10] и регуляторы роста: β-индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрации 0,1 и 0,5 мг/л; α-нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрации 1 и 10 мг/л; 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрациях 0,5 и 2 мг/л. В исследовании использовались 5 вариантов среды, отличающихся соотношением витаминов и фитогормонов (табл. 1).

Стерилизацию питательной среды проводили в автоклаве под давлением 1,1 атм и при температуре +120 °С в течение 15 мин. Стерилизацию инструментов, культуральных сосудов и оборудования осуществляли согласно общепринятой методике [10]. Посадка эксплантов на питательную среду проводилась в ламинар-боксе при соблюдении правил работы со стерильным материалом. Пробирки с эксплантами помещались в климатическую камеру марки «Binder KBF LQC 240», в которой был установлен режим с фотопериодом 14/10 и температурой – +20 ± 2 °С.

Материал, который имел признаки инфицирования, выбраковывался через 7–21 день. Проводилось определение отношения числа стерильных эксплантов к общему числу объектов, подвергнутых стерилизации. Для оценки жизнеспособности эксплантов рассчитывалось в процентах

число стерильных объектов, имеющих признаки регенерации, к общему количеству стерильного материала. Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Office Excel. Различия по критерию Фишера считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Основными стерилизующими агентами выбраны 7% раствор гипохлорита натрия с экспозицией 15–25 мин и 96% этиловый спирт с экспозицией 30–60 с. Режимы стерилизации эксплантов представлены в табл. 2.

Фрагменты клубнелуковиц, имеющие 1 верхушечную или 1–2 пазушные почки, высаживались на питательную среду MS с 21 мая по 7 июня 2018 г. Использовались следующие режимы стерилизации: I (разделение на фрагменты после стерилизации) – для 1 и 2 варианта среды, II (разделение на фрагменты после стерилизации) – для 3 варианта, II (разделение на фрагменты до стерилизации) – для 4 варианта, III (разделение на фрагменты до стерилизации) – для 5 варианта. Выход стерильной культуры представлен на рис. 2.

Исходя из данных, представленных на рис. 2, можно сделать заключение, что все экспланты были стерильными у сорта «Селенит» на четвертом варианте среды MS без добавления регуляторов роста и у сорта «Уралочка» на пятом варианте среды MS с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и НУК в концентрации 1 мг/л. Наиболее высокий процент выхода стерильной культуры у сорта «Пермский сувенир» наблюдался на пятом варианте среды MS и составил 94. Для сорта «Седой Урал» высокий процент выхода стерильной культуры отмечается на третьем (с добавлением 6-БАП в концентрации 2 мг/л и НУК в concentra-

ции 1 мг/л) и четвертом вариантах среды – 94. Для получения стерильной культуры у сортов «Селенит» и «Уралочка» могут быть использованы 4 ($p = 0,00$, $p < 0,05$) и 5 ($p = 0,01$, $p < 0,05$) варианты среды. Для сорта «Пермский сувенир» могут быть использованы все варианты среды, так как между ними нет достоверных различий ($p = 0,41$, $p < 0,05$). Для сорта «Седой Урал» подходит 3 ($p = 0,00$, $p < 0,05$) и 4 ($p = 0,00$, $p < 0,05$) варианты среды.

При использовании I режима стерилизации выход стерильной культуры был достоверно ниже ($p = 0,72$, $p < 0,05$) у трёх изученных сортов – «Селенит», «Уралочка», «Седой Урал». Он не превышал 50%, за исключением сорта «Селенит», у которого на 2 варианте среды MS с добавлением витаминов и ИУК в концентрации 0,5 мг/л

этот показатель составил 67%. В работе Т.Д. Чемаровой [11] при использовании для микроклонального размножения этих трех сортов в качестве экспланта клубнелуковичек и применении аналогичного режима стерилизации выход стерильной культуры составил более 65,5%.

Прорастание клубнелуковиц у сорта «Пермский сувенир» начинается через 7 дней после посадки на питательную среду MS, у остальных изученных сортов – через 14 дней после посадки (рис. 3).

Жизнеспособность клубнелуковиц у всех сортов оказалась низкой. Она варьирует от 0 до 50%. Только для сорта «Пермский сувенир» этот показатель составил 64% на первом варианте среды с добавлением ИУК в концентрации 0,5 мг/л ($p = 0,00$, $p < 0,05$) (рис. 4).

Таблица 2

Режимы стерилизации эксплантов гладиолуса

Режим стерилизации	Этапы		
	Престерилизация	Стерилизация	Постстерилизация
I	Раствор нейтрального детергента (стиральный порошок «Капель») 40 мин; промывка проточной водой 10 мин	7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») 15 мин, 96% этанол 30 с	Стерилизованная дистиллированная вода, три смены по 5 мин в каждой
II	Раствор нейтрального детергента (стиральный порошок «Капель») 50 мин; промывка проточной водой 15 мин	7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») 20 мин, 96% этанол 60 с	
III	Раствор нейтрального детергента (стиральный порошок «Капель») 60 мин; промывка проточной водой 15 мин	7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») 25 мин, 96% этанол 60 с	

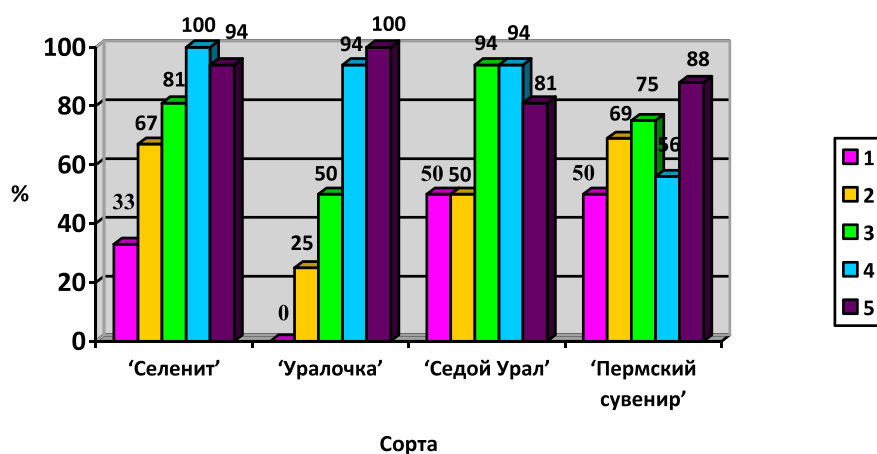
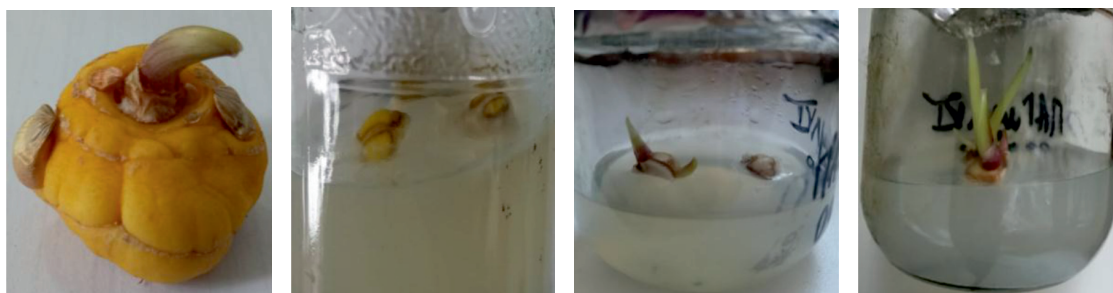


Рис. 2. Процент выхода стерильной культуры клубнелуковиц гладиолуса.

Примечание. 1 – MS с добавлением ИУК 0,5 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 2 – MS с добавлением ИУК 0,5 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 3 – MS с добавлением 6-БАП 2 мг/л, ИУК 1 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 4 – MS с добавлением тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 5 – MS с добавлением 6-БАП 0,5 мг/л, ИУК 1 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л



а

б

в

г

Рис. 3. Клубнелуковицы гладиолуса: а – до посадки; б – на момент посадки; в – через 14 дней после посадки; г – через 21 день после посадки

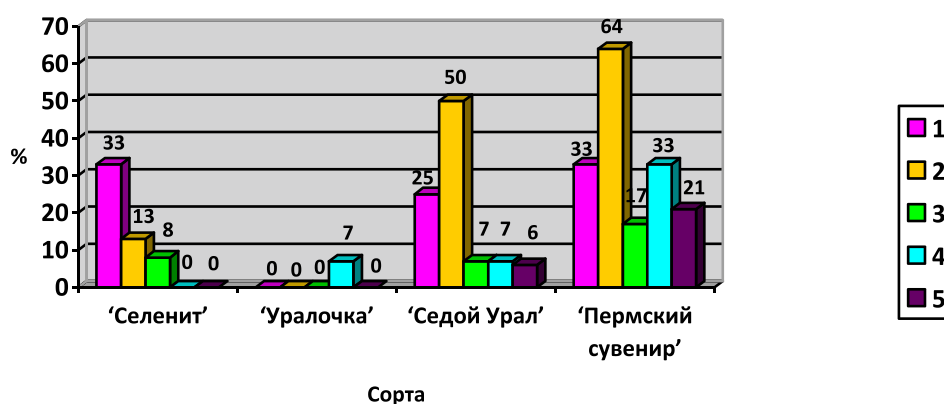


Рис. 4. Процент выхода жизнеспособных клубнелуковиц.

Примечание. 1 – MS с добавлением ИУК 0,5 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 2 – MS с добавлением ИУК 0,5 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 3 – MS с добавлением 6-БАП 2 мг/л, ИУК 1 мг/л, тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 4 – MS с добавлением тиамина 0,1 мг/л, пиридоксина 0,5 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л; 5 – MS с добавлением 6-БАП 0,5 мг/л, ИУК 1 мг/л, никотиновой кислоты 0,5 мг/л

М.П. Лапинская [12] в своих исследованиях использует варианты среды MS с различными регуляторами роста: α -нафтилуксусную кислоту (НУК), тиадiazурон (ТДг), ИУК, индолилмаслянную кислоту (ИМК), 6-БАП, зеатин, кинетин, 2-изопентиладенин (2-IP). Применение 6-БАП оказалось эффективным для большинства исследованных ею сортов. Экспланты гладиолуса показали хорошие результаты при добавлении в питательную среду данного фитогормона в диапазоне концентраций от 0,5 до 3 мг/л. Зеатин, кинетин и тиадiazурон оказались по сравнению с 6-БАП менее эффективными. В результате наших исследований не выявлено высокой эффективности применения 6-БАП для данных сортов гладиолуса.

Закключение

Для стерилизации клубнелуковиц у всех изученных сортов гладиолуса можно использовать: раствор нейтрального детергента в течение 50–60 мин и промывку проточной водой в течение 15 мин – на этапе пререстерилизации; 7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») в течение 20–25 мин и 96% этиловый спирт в течение 60 с – на этапе стерилизации. Выделение апикальной и пазушной почек необходимо проводить до стерилизации. Максимальный выход стерильной культуры варьирует от 88 до 100% в зависимости от сорта. При использовании в качестве экспланта клубнелуковицы на всех вариантах среды MS отмечается низкий выход жизнеспособных эксплантов, не более 64%.

Список литературы

1. Реут А.А., Денисова С.Г. Влияние регуляторов роста на эффективность вегетативного размножения гладиолусов // Научный альманах. 2018. № 7–1 (45). С. 223–226.
2. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений: Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородский гос. ун-т, 2012. 49 с.
3. Фоменко Т.И., Веевник А.А. Микрклональное размножение гладиолуса *in vitro* // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы III Всерос. науч.-практ. конф. Волгоград, 2010. С. 292–297.
4. Шакина Т.Н. Биотехнологические аспекты в интродукции гладиолуса гибридного // Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета. 2012. Т. 10. Вып. 1. С. 138–146.
5. Селекционное достижение Гладиолус (*Gladiolus* L.) СЕЛЕНИТ: пат. № 9442 Рос. Федерация / Черткова М.А., Шумихин С.А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». Заявка № 8356130; зарег. 18.01.2018; Бюл. № 2 (232), 2018а. С. 134.
6. Селекционное достижение Гладиолус (*Gladiolus* L.) УРАЛОЧКА: пат. № 9426 Рос. Федерация / Черткова М.А., Шумихин С.А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». Заявка № 8356129; зарег. 17.01.2018; Бюл. № 2 (232), 2018б. С. 134.
7. Селекционное достижение Гладиолус (*Gladiolus* L.) СЕДОЙ УРАЛ: пат. № 9427 Рос. Федерация / Черткова М.А., Шумихин С.А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». Заявка № 8356134; зарег. 17.01.2018; Бюл. № 2(232), 2018в. С. 134.
8. Селекционное достижение Гладиолус (*Gladiolus* L.) ПЕРМСКИЙ СУВЕНИР: пат. № 9425 Рос. Федерация / Черткова М.А., Шумихин С.А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». Заявка № 8356138; зарег. 17.01.2018; Бюл. № 2(232), 2018 г. С. 134.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.*, 1962. Vol. 15. P. 473–497.
10. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964. 272 с.
11. Чемарова Т.Д. Использование клубнелуковиц при микрклональном размножении сортов гладиолуса (*Gladiolus* × *hybridus* hort.) селекции учебного ботанического сада ПГНИУ // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием. Пермь, 2019. С. 157–159.
12. Лапинская М.П. Клональное микроразмножение промышленных сортов гладиолуса: автореф. дис. ... канд. сельск. наук. Москва, 1998. 22 с.