



**ИНДУКЦИЯ ОРГАНОГЕНЕЗА И ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ
SAINTPAULIA IONANTHA H.WENDL**

^{1,2}Устинова А.В., ¹Бережнева З.А., ^{1,2}Кулуев Б.Р.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, E-mail: email.ustinova@gmail.com

²Уфимский университет науки и технологий, Россия, 450074, Уфа, ул. З. Валиди, 32, E-mail: kuluev@bk.ru

Резюме

Saintpaulia ionantha H.Wendl – сенполия или фиалка узамбарская, благодаря своим небольшим размерам, неприхотливости, высокой декоративности и способности к круглогодичному цветению является одним из самых популярных комнатных растений в мире. Актуальным является разработка технологий микрклонального размножения сенполий, с помощью которых можно получать гораздо большее число саженцев, чем при использовании стандартного вегетативного размножения. Нами был апробирован метод получения регенерантов на листовых эксплантах сенполии сорта ЭТ-Пенетта собственной селекции с использованием питательной среды Мурасиге-Скуга с регуляторами роста 6-бензиламинопурином (0,5 мг/л) и нафтилуксусной кислотой (0,1 мг/л). Из двух листьев было получено около 400 молодых растений, что на порядок больше, чем при использовании обычного вегетативного размножения. В селекции сенполий также часто используют гибридные формы, но для некоторых сортов их по разным причинам не удастся получить. Одним из способов преодоления этого барьера является использование технологий соматической гибридизации. Для этого необходимо получать жизнеспособные протопласты. Исходя из этого нами были апробированы три метода для получения протопластов сенполии, из которых наилучшим оказался подход с использованием плазмолитического буфера с большей концентрацией маннитола (0,7 М) и среднее время по ферментативной обработке фрагментов листьев (8 ч) при уменьшенной концентрации мацерозима (0,5%).

Ключевые слова: сенполия, фиалка узамбарская, *in vitro*, регенерация, микрклональное размножение

Цитирование: Устинова А.В., Бережнева З.А., Кулуев Б.Р. Индукция органогенеза и получение протопластов *Saintpaulia ionantha* H.Wendl // Biomics. 2024. Т.14(4). С. 342-350. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-23

© Авторы

**INDUCTION OF ORGANOGENESIS AND PRODUCTION OF PROTOPLASTS
OF *SAINTPAULIA IONANTHA* H.WENDL**

^{1,2}Ustinova A.V., ¹Berezhneva Z.A., ^{1,2}Kuluev B.R.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

²Ufa University of Science and Technology, Russia, 450074, Ufa, st. Z. Validi, 32, E-mail: kuluev@bk.ru

Resume

Saintpaulia ionantha H.Wendl – Saintpaulias or African violet, due to its small size, unpretentiousness, high decorativeness and ability to bloom all year round is one of the most popular indoor plants in the

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

world. The development of technologies for micropropagation of *Saintpaulias* is relevant, with the help of which it is possible to make a much larger number of seedlings than with the use of standard vegetative propagation. We tested a method for producing of regenerants on leaf explants of *S. ionantha* of the ET-Penetta variety using Murashige-Skoog nutrient medium with growth regulators 6-benzylaminopurine (0.5 mg/l) and naphthylacetic acid (0.1 mg/l). About 400 young plants were produced from two leaves, which is an order of magnitude more than with the use of conventional vegetative propagation. Hybrid forms are also often used in *S. ionantha* breeding, but for some varieties they cannot be created for various reasons. One way to overcome this barrier is to use somatic hybridization technologies. For this, it is necessary to make viable protoplasts. Based on this, we tested three methods for producing *S. ionantha* protoplasts, of which the best approach was the one using a plasmolytic buffer with a higher concentration of mannitol (0.7 M) and the average time for enzymatic treatment of leaf fragments (8 hours) at a reduced concentration of macerozyme (0.5%).

Keywords: *Saintpaulias*, African violet, *in vitro*, regeneration, micropropagation

Citation: Ustinova A.V., Berezhneva Z.A., Kuluev B.R. Induction of organogenesis and production of protoplasts of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl // *Biomics*. 2024. T.14(4). P. 342-350. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-23 (In Russian)

© The Authors

Введение

Сенполия, или узамбарская фиалка (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl.), представляет собой значимый объект в декоративном садоводстве и генетических исследованиях благодаря разнообразию его форм и окраски. Этот вид является одним из наиболее популярных комнатных растений, что делает его коммерчески привлекательным для изучения в контексте соматической гибридизации и микрклонального размножения. Однако, несмотря на широкое распространение, размножение сенполий сопряжено с рядом проблем. Семенное размножение приводит к генетической неоднородности [Котовщикова (Kotovshchikova), 1976], а вегетативное размножение через листовые черенки, может не сохранять сортовые признаки (нередко наблюдается у химерных сортов), а также не обеспечивает достаточную скорость и количество получаемого растительного материала [Вечернина и др. (Vechernina et al.), 2015]. Это подчеркивает необходимость использования более эффективных методов размножения, таких как микрклональное размножение, при котором количество получаемых растений увеличивается на несколько порядков [Тимофеева и др. (Timofeeva et al.), 2012; Зарипова и др. (Zaripova et al.), 2019; Воронина и др. (Voronina et al.), 2023].

Проблемы могут возникнуть также при получении гибридных сортов сенполии, причем некоторые сорта могут быть несовместимы. В данном случае одним из решений может стать получение гибридов сенполий с использованием технологий соматической гибридизации путем слияния протопластов [Бутенко и др. (Butenko et al.), 1999] как

внутри вида, так и между разными видами [Botelho et al., 2015]. Генетическая пластичность сенполий делают этот вид перспективным объектом для селекционных исследований. Использование технологий микрклонального размножения и получения протопластов позволит не только повысить эффективность размножения, но и расширить возможности для создания гибридных форм с новыми декоративными характеристиками [Глеба и др. (Gleba et al.), 1986].

Сообщалось о наличии более 10000 сортов сенполий, различающихся по форме и окраске листьев, размеру и разнообразию пестролистности [Сторк и др. (Stork et al.), 2013]. Несмотря на такое многообразие, сенполии все еще лишены полноценной желтой окраски цветков [Rajabi et al., 2022]. В 2018 году был представлен новый сорт с уникальной точечной пестролистностью, ШН-Космическая Фея, который не удается размножить семенным способом для передачи уникального признака. Все это говорит о существующих проблемах в гибридизации и размножении сенполий и необходимости разработки подходов для выведения сортов с новыми декоративными признаками. Поэтому эксперименты по выделению протопластов *S. ionantha* направленные на решение этих задач путем использования метода соматической гибридизации для получения сортов с новыми признаками, такими как пестролистность и полноценные генеративные органы, а также создание сортов с полноценной желтой окраской через межвидовую соматическую гибридизацию представляются актуальными. В литературе имеются довольно мало сообщений о получении протопластов сенполий и регенерации из

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

них растений [Winkelmann, Grunewaldt, 1995, Winkelmann, Grunewaldt, 1995a]. Причем была обнаружена высокая зависимость регенерации побегов от генотипа растения [Hoshino et al., 1995]. Технологии получения протопластов предоставляют уникальные возможности для гибридизации и генетической модификации *S. ionantha*, открывая новые перспективы для создания гибридов с улучшенными характеристиками. Эти методы актуальны для преодоления существующих ограничений как в массовом получении растений с сортовыми признаками, а также получении новых гибридных форм с улучшенными декоративными характеристиками.

Микроклональное размножение позволяет быстро и в больших количествах получать генетически идентичные растения. Исходя из того, что сенполии довольно хорошо размножаются вегетативным путем, можно полагать, что и регенерационные способности в культуре *in vitro* у этого растения будут довольно высокими. Shukla et al. [2012], к примеру, публикуют протокол микроклонального размножения сенполий с использованием листовых эксплантов и тидиазурона в качестве регулятора роста. Минусом этой работы является использование стерильных растений *in vitro*, которые требуют времени и сил для их предварительного получения. Для получения регенерантов могут быть использованы также листья сенполии растущие на почве, которые нетрудно простерилизовать и нарезать на экспланты. К примеру, в работе [Ghasemi et al., 2012] сообщается о введении в культуру листьев сенполии с использованием гипохлорита натрия для стерилизации. Причем авторы для регенерации побегов их листовых эксплантов использовали 0,5 мг/л бензиладенина вместе с 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты.

Целью нашего исследования была индукция органогенеза сорта ЭТ-Пенетта *S. ionantha* на эксплантах листьев в культуре *in vitro* и получение протопластов из его листьев, что может послужить основой для последующих исследований по соматической гибридизации сенполии.

Материалы и методы

Исследование проводилось в период с января по сентябрь 2024 года. Объектом исследования стал сорт сенполии собственной селекции «ЭТ-Пенетта» (гибрид 111-8, автор Устинова А.В.), отличающийся обильным цветением крупными махровыми розовыми цветами (от 5 до 8 цветков на цветоносе) и крупной стандартной розеткой с темными листьями.

Введение в культуру *in vitro*, регенерация микропобегов из листового каллуса, акклиматизация и

выращивание растений проводились с января по август 2024 года. В качестве исходного экспланта использовалась ткань листа. Для стерилизации применялся метод описанный ранее [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2017]: листья погружались в 70% этанол на 15 секунд с последующим удалением спирта. Затем они помещались в 10% раствор "Белизны" с добавлением 10 мкл Tween 20 и подвергались стерилизации в течение 10-12 минут при периодическом покачивании. После этого экспланты пять раз промывались в стерильной дистиллированной воде и разрезались на отдельные экспланты (фрагменты листовых пластинок 1,0 x 1,0 см), которые культивировались на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС): NH_4NO_3 – 1650 мг/л, KNO_3 – 1900 мг/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 370 мг/л, KH_2PO_4 – 170 мг/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 440 мг/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,9 мг/л, $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – 37,2 мг/л, H_3BO_3 – 6,2 мг/л, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 22,3 мг/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6 мг/л, KI – 0,83 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 мг/л, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 мг/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 мг/л, глицин – 2,0 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, никотиновая кислота – 0,5 мг/л, пиридоксин – 0,5 мг/л, тиамин – 0,1 мг/л, сахараза - 30 г/л, агар - 6,5 г/л, MES - 0,5 г/л. Для индукции адвентивных почек и микропобегов в среду добавляли 6-бензиламинопури (БАП) в концентрации 0,5 мг/л и α -нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1 мг/л. Чашки Петри с эксплантами помещали в климатическую камеру при температуре 25°C, с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения около 3 клк. Все образующиеся микропобеги имели корни и потому непосредственно были использованы для адаптации к условиям *in vivo* в нестерильном субстрате – грунте для сенполий (Фарт, Россия). После пересадки на грунт побегов с каллусами и корнями в течение 10-15 дней побеги держали прикрытыми полиэтиленовой пленкой, потом пленку открывали. В дальнейшем растения выращивали при влажности воздуха 45-60%, интенсивности света – 3 клк, температуре 24-25°C.

Эксперименты по получению протопластов сенполии проводились с июня по сентябрь 2024 года с использованием трех различных методов. Все три метода были в общих чертах схожи и включали применение плазмолитического, ферментативного и промывочного растворов. При этом изменялись концентрации используемых веществ и время обработки, поэтому основной задачей было найти такую методику, которая давала бы наибольший выход протопластов.

Метод №1. Плазмолитический раствор: маннитол (0,5 М), температура хранения при +4°C. Ферментативный раствор: MES (20 мМ), маннитол (0,6 М), KCl (10 мМ), CaCl_2 (10 мМ), бычий сывороточный альбумин (БСА) (0,1%), целлюлаза

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

(1,5%), мацерозим (0,75%). Смешивали все компоненты, кроме CaCl_2 и БСА, потом доводили pH до 5,6 добавлением раствора гидроокиси калия. Инкубировали при 55°C 10 минут. Остужали до комнатной температуры, добавляли CaCl_2 и БСА, стерилизовали фильтрацией. Срок хранения – не более 1 дня. Промывочный раствор: MES (2 мМ), NaCl (154 мМ), CaCl_2 (125 мМ), калий хлористый (5 мМ), доводили pH до 5,6, стерилизовали фильтрацией, температура хранения при $+4^\circ\text{C}$ [Егорова и др. (Egorova et al.), 2020].

После стерилизации листьев сенполии, нарезали их на сегменты 1-2 мм. Далее проводили плазмолиз. Кусочки листьев погружали в плазмолитический раствор в чашку Петри и инкубировали их в течение 30 мин при комнатной температуре, чашку Петри накрывали фольгой. После удаления плазмолитического раствора кусочки растений переносили в коническую колбу с ферментативным раствором, колбу оборачивали в фольгу. Инкубация в ферментативном растворе для деградации клеточных стенок проходила при температуре 25°C со слабым покачиванием на скорости 25 об./мин в течение 14 часов на орбитальном шейкере. По истечению инкубационного периода скорость качания увеличили до 40 об./мин, для того, чтобы протопласты вышли в раствор. После чего проводилась отмывка протопластов через нейлоновый фильтр Biosharp (Китай) для клеток с порами 40 мкм. Протопласты заливались промывочным раствором, центрифугировались при 100g в течение 5 мин при $t=+4^\circ\text{C}$. Протопласты дважды промывали для удаления ферментативного раствора. Далее проводили микроскопический анализ на наличие протопластов [Егорова и др. (Egorova et al.), 2020; Kang et al, 2020].

Метод №2. Плазмолитический раствор: маннитол (0,6 М), температура хранения при $+4^\circ\text{C}$. Ферментативный раствор: MES (20 мМ), маннитол (0,6 М), калий хлористый (10 мМ), кальций хлористый (10 мМ), бычий сывороточный альбумин (БСА) (0,1%), целлюлаза (1,75%), мацерозим (0,75%). Смешивали все компоненты, кроме CaCl_2 и БСА, потом доводили pH до 5,6 добавлением раствора гидроокиси калия. Инкубировали при 55°C 10 минут. Остужали до комнатной температуры, добавляли CaCl_2 и БСА, стерилизовали фильтрацией. Срок хранения – не более 1 дня. Промывочный раствор: MES (2 мМ), NaCl (0,154 М), CaCl_2 (125 мМ), калий хлористый (5 мМ), доводили pH до 5,6, стерилизовали фильтрацией, температура хранения при $+4^\circ\text{C}$ [Егорова и др. (Egorova et al.), 2020].

В этом методе мы изменили концентрацию целлюлазы с 1,5% до 1,75%. Также изменили скорость качания фрагментов листьев в ферментативном

растворе с 25 до 30 об./мин. И изменили время инкубации с 14 до 6 часов, скорость и время центрифугирования раствора с протопластами до 10 мин. Итак, после стерилизации листьев сенполии, нарезали их на сегменты 1-2 мм. Далее проводили плазмолиз. Кусочки листьев погружали в плазмолитический раствор в чашку Петри и инкубировали их в течение 30 мин при комнатной температуре, чашку Петри накрывали фольгой. После удаления плазмолитического раствора кусочки растений переносили в коническую колбу с ферментативным раствором, колбу оборачивали в фольгу. Инкубация в ферментативном растворе для деградации клеточных стенок проходила при температуре 25°C со слабым покачиванием на скорости 30 об./мин в течение 6 часов на орбитальном шейкере [Kang et al, 2020]. По истечению инкубационного периода скорость качания увеличили до 50 об./мин, для того, чтобы протопласты эффективнее выходили в раствор. После чего проводилась отмывка протопластов через такой же нейлоновый фильтр с порами 40 мкм. Протопласты заливались промывочным раствором, центрифугировались при 100g в течение 10 мин при $t=+4^\circ\text{C}$. Далее выливали надосадок и образовавшийся осадок 2 раза промывали промывочным раствором. Далее проводили микроскопический анализ на наличие протопластов.

Метод №3. Плазмолитический раствор: маннитол (0,7 М), температура хранения при $+4^\circ\text{C}$. Ферментативный раствор: MES (20 мМ), маннитол (0,7 М), калий хлористый (10 мМ), кальций хлористый (10 мМ), БСА (0,1%), целлюлаза (1,5%), мацерозим (0,5%). Изменения концентраций ферментов для получения протопластов меняли, так как оптимальные условия для выделения протопластов индивидуальны для разных видов и тканей [Бутенко и др. (Butenko et al.), 1999]. Протокол, подходящий для одного вида и даже сорта, может не подходить для других видов и сортов. Следовательно, оптимизация факторов, участвующих в выделении протопластов, необходима для каждого вида и сорта [Kang et al, 2020]. Мы смешивали все компоненты, кроме CaCl_2 и БСА, потом доводили pH до 5,6 добавлением раствора гидроокиси калия. Инкубировали при 55°C 10 минут. Остужали до комнатной температуры, добавляли CaCl_2 и БСА, стерилизовали фильтрацией. Срок хранения – не более 1 дня. Промывочный раствор: MES (2 мМ), NaCl (0,154 М), CaCl_2 (125 мМ), калий хлористый (5 мМ), доводили pH до 5,6, стерилизовали фильтрацией, температура хранения при $+4^\circ\text{C}$.

В методе №3 листья инкубировались в ферментативном растворе 8 часов при температуре 25°C с покачиванием на скорости 60 об./мин. По истечению инкубационного периода скорость качания

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

увеличили до 70 об./мин, для того, чтобы протопласты вышли в раствор. После чего проводилась отмывка протопластов через такой же нейлоновый фильтр с порами 40 мкм. Протопласты заливали промывочным раствором, центрифугировали при 100g 5 мин при $t=+10^{\circ}\text{C}$. Затем ферментативную смесь сливали, осадок ресуспендировали в промывочной среде и центрифугировали. Процедуру повторяли 2 раза [Турпанова и др. (Turpanova et al.), 2014]. Далее проводился микроскопический анализ для выявления протопластов. Во всех трех методиках использовали флуоресцентный микроскоп Biozero BZ-8100 (Япония).

Результаты исследования

В общей сложности в культуру *in vitro* из двух листьев было введено 30 эксплантов. При использованном методе стерилизации все экспланты сохраняли жизнеспособность и были стерильны (100 %) (рис. 1а). В присутствии регуляторов роста БАП и НУК уже на 15 день все экспланты демонстрировали обильное каллусообразование (рис. 1б). На каждом листовом экспланте фиксировали регенерацию 10-20 побегов. В среднем на один эксплант приходилось 15 микропобегов (рис. 1в). В целом на 30 эксплантах было получено более 400 регенерировавших побегов. Таким образом, с использованием предложенного нами метода из одного листа получалось около 200 регенерантов, тогда как при обычном вегетативном размножении сенполий в почвенном грунте из одного листа обычно образуется не более 10 регенерантов. Таким образом, процесс микрклонального размножения сенполии с использованием БАП и НУК оказался успешным, что подтверждается визуальными данными на рисунках 1 и 2. Экспланты, выращенные на модифицированной питательной среде МС с добавлением БАП и НУК, продемонстрировали активное формирование адвентивных почек и микропобегов. В результате было получено 100% укоренение подросших микропобегов, которые затем успешно адаптировались к условиям почвенного грунта (рис. 2б, в, г). При этом эффективность акклиматизации к условиям почвы составила более 90%, причем микропобеги пересаживались прямо с кусочками каллуса и образовавшимися корнями и вполне успешно адаптировались к условиям почвы. Далее растения пересаживались на индивидуальные сосуды (горшки) и были доведены до стадии цветения (рис. 2д). Этот результат подчеркивает потенциал микрклонального размножения для массового получения генетически идентичных растений, причем без промежуточной стадии укоренения в условиях *in vitro*.

Выделение протопластов проводилось с использованием трех различных методов. Методы подбирались по принципу дешевизны используемых расходных материалов и доступности реактивов.

Поэтому для получения протопластов сенполии модифицировали и применили именно те методы, которые ранее были апробированы отечественными исследователями, однако они использовались для других видов растений [Егорова и др. (Egorova et al.), 2020]. При использовании методов 1 и 2 нам удалось получить лишь единичные протопласты (рис. 3а, б). Наибольшее количество протопластов обнаруживалось при использовании метода 3 (рис. 3в, г), в котором было уменьшено содержание мацерозима, увеличена концентрация маннитола.

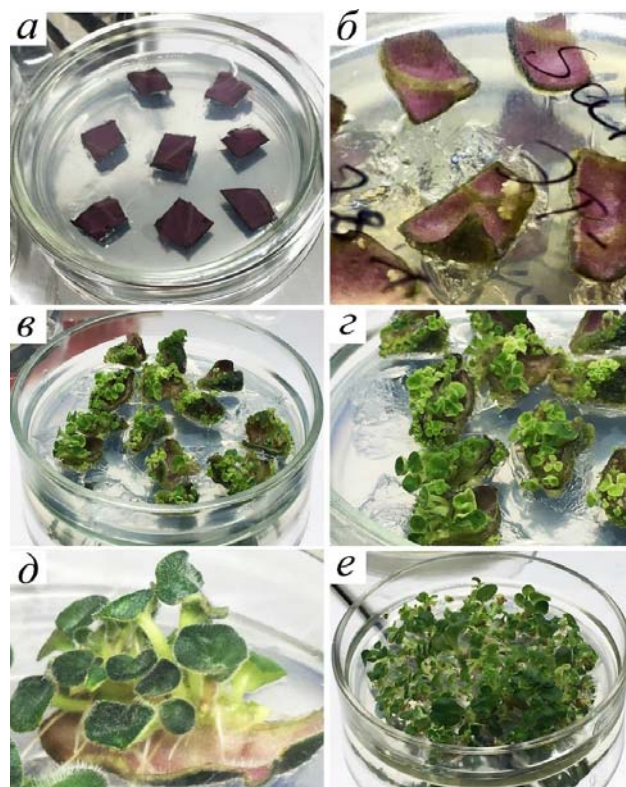


Рис. 1. Процесс органогенеза у *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. в условиях *in vitro*: а – листовые экспланты на питательной среде МС, б – каллусогенез на 15-й день инкубации листовых эксплантов (образование каллуса на листовых эксплантах), в – органогенез *in vitro* на 29-й день наблюдения (образование микропобегов), г – активный рост микропобегов, д – развитие микропобегов на экспланте, 48-й день, е – общий вид чашки Петри перед пересадкой регенерантов на почвенный грунт.

Fig. 1. The process of organogenesis in *Saintpaulia ionantha* H.Wendl.: а – leaf explants on MS nutrient medium, б – callusogenesis on the 15th day of leaf explant incubation (callus formation on leaf explants), в – organogenesis on the 29th day of observation (formation of microshoots), д – active growth of microshoots, е – development of microshoots on the explant, 48th day, ф –

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

general view of the Petri dish before transplanting the regenerants into the soil.



Рис. 2. Процесс высаживания на грунт и акклиматизация *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. к условиям почвы: а – общий вид сформированных растений с 3–5 листьями перед пересадкой в грунт, б – высаженные в грунт микророзетки сенполии, в – растущие растения, г – растения перед рассаживанием в отдельные горшки, д – цветущее растение сенполии, полученная методом микроклонального размножения.

Fig. 2. The process of planting *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. in the ground and acclimatization to soil conditions: a – general view of formed plants with 3–5 leaves before transplanting into the ground, b – *S. ionantha* rosettes planted in the ground, c – growing plants, d – plants before planting in separate pots, d – flowering of *S. ionantha* plant produced by micropropagation.

Обсуждение

При разработке методов микроклонального размножения декоративных растений важным является использование недорогих реактивов и других расходных материалов. БАП и НУК относятся к доступным и довольно дешевым регуляторам роста, обладающим цитокининовой и ауксиновой активностями, соответственно. Проведенное исследование подтвердило высокую эффективность

метода микроклонального размножения для сенполии сорта ЭТ-Пенетта при использовании этих регуляторов роста. Ранее сообщалось о микроклональном размножении сенполии из различных типов эксплантов, включая листовые диски, черешки, лепестки и пыльники. Регенерация сенполии достигалась путем прямой дифференциации побегов из разных эксплантов, а также непрямого органогенеза с промежуточной каллусной фазой [Shukla et al., 2012; Иванова (Ivanova), 2014].

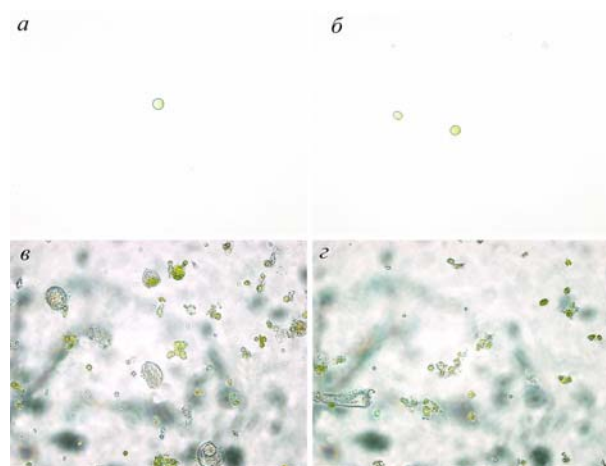


Рис. 3. Выделенные протопласты сенполии: а – протопласты, полученные по методу №1, б – протопласты, полученные по методу №2, в и г – протопласты, полученные по методу №3 (увеличение x400).

Fig. 3. Isolated protoplasts of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl: a – protoplasts obtained by method No. 1, b – protoplasts obtained by method No. 2, c and d – protoplasts obtained by method No. 3 (magnification x400).

В нашем исследовании регенерация побегов шла преимущественно через каллусообразование (рис. 1). Чаще всего при микроразмножении сенполии используют тидиазурон, бензиладенин и НУК [Shukla et al., 2012; Ghasemi et al., 2012]. При использовании этих регуляторов роста у сенполии индуцируется не только геммогенез, но и формирование соматических эмбрионов [Shukla et al., 2012]. Мы предлагаем использовать только два фитогормона: БАП и НУК, так как при этом образуется довольно большое число регенерантов (рис. 1). Для ввода в культуру *in vitro* листовых эксплантов ранее применяли методику стерилизации гипохлоритом натрия [Ghasemi et al., 2012], в нашей работе мы применили такой же подход. С учетом того, что все экспланты при этом становились стерильными без потери жизнеспособности, нет необходимости в разработке

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

других методов стерилизации. Необходимо отметить, что сенполия в наших экспериментах показала очень высокий уровень регенерационной способности и большинство образующихся побегов легко акклиматизировалось к условиям почвы. Более того, в отличие от многих других культур нами не проводилась дополнительная процедура по удалению каллуса и укоренению побегов в условиях *in vitro* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2013]. Образующиеся микропобеги с каллусом и корнями непосредственно пересаживались на почву и успешно проходили акклиматизацию. Отсутствие дополнительной стадии укоренения побегов *in vitro* существенно упрощает и удешевляет процесс микроклонального размножения сенполии.

Для преодоления репродуктивного барьера между некоторыми сортами сенполий может быть использована технология соматической гибридизации путем слияния протопластов. Однако в литературе имеется скудная информация о получении протопластов сенполий. Winkelmann, Grunewaldt [1995a] получали протопласты из растений сенполий, растущих *in vitro* в присутствии БАП и ИУК. В нашем исследовании были использованы почвенные растения, потому не было необходимости получать растения *in vitro* заранее. Методы получения протопластов для разных видов могут различаться. С учетом того, что мы получили разные результаты при использовании трех методов, можно обратить внимание на некоторые детали. Лучшие результаты были получены при использовании метода 3, отличительной особенностью которого является использование плазмолитического буфера с большей концентрацией маннитола и меньшее содержание мацерозима. Инкубация разрезанных листьев в ферментативном растворе в методе №3 длилась 8 часов, тогда как в методе №1 – 14 часов, а в методе №2 – 6 часов. Однако даже при использовании метода №3 было получено мало протопластов (рис. 3 в, г). В использованный ферментативный раствор были включены целлюлаза и мацерозим, тогда как Hoshino et al. [1995] в своем исследовании кроме них еще дополнительно использовали пектолиазу и дризелазу. Исходя из этого, можно полагать, что для получения протопластов сенполии желательнее также использовать ферменты расщепляющие пектины.

Полученные результаты демонстрируют, что индукция органогенеза и получение протопластов *S. ionantha* могут быть успешно реализованы с использованием модифицированных нами методик, направленных на удешевление по использованным реактивам. Это создает основу для последующих исследований по соматической гибридизации, направленных на создание новых сортов с улучшенными декоративными характеристиками и

новыми генетическими признаками. Исследования, направленные на изучение и работу с протопластами, открывают перспективы для преодоления существующих ограничений в гибридизации сенполий (и не только) и расширения их декоративного потенциала. Практическая значимость исследований в этом направлении заключается в том, что полученные результаты могут быть использованы в селекционных программах для улучшения декоративных и адаптационных характеристик растений. Результаты исследования также могут быть полезны для коммерческого размножения сенполий и удешевления процесса, что будет способствовать удовлетворению растущего спроса на декоративные растения. Перспективы данного исследования предполагают проведение дальнейшей работы, включающей разработку комплексного подхода к получению соматических гибридов, который должен охватывать следующие этапы: выбор растительных объектов для получения протопластов, выделение протопластов, выбор методов слияния протопластов, получение соматических гибридов, подбор оптимальной питательной среды для выращивания гибридов из протопластов и высадка полученных гибридов на почвенный грунт. Эти этапы позволят глубже изучить потенциал соматической гибридизации и расширить возможности генетических работ с сенполией, и получить растения с новыми признаками.

Работа выполнена в рамках государственного задания 122030200143-8.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК Пресс. 1999. 160 с
2. Вечерина Н.А., Таварткиладзе О.К., Дурникин Д.А., Смашных К.А., Горина М.К. Микроразмножение растений фиалки *Saintpaulia ionantha* (s. Kewensis c.b. klarke) // В сборнике: Биотехнология и общество в XXI веке. Сборник статей Международной научно-практической конференции. 2015. С. 329–333.
3. Воронина А.В., Вишнякова А.В., Комахин Р.А., Монахос С.Г. Основы биотехнологии садовых культур: учебное пособие. Москва. 2023. 139 с.: ил.
4. Глеба Ю.Ю., Мясхене И.В. Гибридизация соматических клеток и возможности анализа и манипуляций генами цитоплазмы высших растений // Biopolymers and Cell. 1986. Т. 2. № 1. С. 5–11.
5. Егорова А. А., Иванова К. А., Герасимова С. В. Изоляция протопластов *Solanum tuberosum* и *Solanum verrucosum* и их PEG-опосредованная трансформация // Методы редактирования генов и геномов. Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, ФИЦ Ин-т

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

цитологии и генетики. Новосибирск: Издательство СО РАН. 2020. С. 89–99

6. Зарипова А.А., Мухаметвафина А.А., Уразбахтина К.А., Шигапова А.И., Ахметова А.Ш., Шигапов З.Х. Клональное микроразмножение глоксинии гибридной // *Экобиотех.* 2019. Т. 2. № 4. С. 533–539. doi: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-533-539

7. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада.* 2014. Т. 138. С. 57–101.

8. Котовщикова Н.И. К вопросу культивирования сенполий (биология и экология) // *Труды Никитского ботанического сада.* 1976. Т. 68. С. 98–107.

9. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Сафиуллина М.Г., Чемерис А.В. Влияние конститутивной экспрессии гена *ARGOS-LIKE* на размеры клеток и органов трансгенных растений табака // *Генетика.* 2013. Т. 49. №5. С. 587–594. doi: 10.7868/S0016675813040073

10. Кулуев Б.Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Основы биотехнологии растений: учебное пособие / по ред. Р.Г. Фархутдинова. Уфа: РИЦ БашГУ. 2017. 244 с.

11. Сторк К., Сторк Дж. Вы сумеете вырастить фиалки! М.: «Дом Фиалки» 2013. 352 с.: ил.

12. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет. 2012. 56 с.

13. Турпанова Р.М. Киргизова И.В. Оптимизация условий для выделения и культивирования протопластов люцерны желтой (*Medicago falcata*) (геология и экология) // *Известия КГТУ.* 2014. С. 379–381.

14. Botelho F.B.S., Rodrigues C.S., Bruzi A.T. Ornamental plant breeding // *Ornamental Horticulture.* 2015. V. 21(1). P. 9–16. doi: 10.14295/rbho.v21i1.770

15. Ghasemi Y., Nematzadeh G.A., Omran V. G., Dehestani A., Hosseini S. The effects of explant type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency // *Biharean Biologist.* 2012. V.6. No. 2. P. 73–76.

16. Hoshino Y., Nakano M., Mii M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl // *Plant Cell Reports.* 1995. V. 14. P. 341–344. doi: 10.1007/BF00238593

17. Kang H.H., Naing A.H., Kim C.K. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of *Petunia hybrida* Cv. Mirage Rose // *Biology.* 2020. 9(8): 228. doi: 10.3390/biology9080228

18. Rajabi A., Fahmideh L., Keykhasaber M., Omran V.G. Genetic engineering of novel yellow color african

violet (*Saintpaulia ionantha*) produced by accumulation of Aureusidin 6-O-glucoside // *Biological Procedures Online.* 2022. V. 24(1). 3. doi: 10.1186/s12575-022-00164-0

19. Shukla M., Sullivan J.A., Jain S.M., Murch S.J., Saxena P.K. Micropropagation of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). In: Lambardi, M., Ozudogru, E., Jain, S. (eds) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology.* 2012. V. 994. Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8_22

20. Winkelmann T., Grunewaldt J. Analysis of protoplast-derived plants of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl // *Plant Breeding.* 1995. V. 114(4). P. 346–350. doi: 10.1111/j.1439-0523.1995.tb01247.x

21. Winkelmann T., Grunewaldt J. Genotypic variability for protoplast regeneration in *Saintpaulia ionantha* (H. Wendl.) // *Plant Cell Reports.* 1995a. V. 14(11) P. 704–707. doi: 10.1007/BF00232651

References

1. Botelho F.B.S., Rodrigues C.S., Bruzi A.T. Ornamental Plant Breeding. *Ornamental Horticulture.* 2015. V. 21(1). P. 9–16. doi: 10.14295/rbho.v21i1.770

2. Butenko R.G. Biology of higher plants in vitro and biotechnology based on them: a textbook. M.: FBK Press. 1999. 160 p.

3. Egorova A.A., Ivanova K.A., Gerasimova S.V. Isolation of *Solanum tuberosum* and *Solanum verrucosum* protoplasts and their PEG-mediated transformation / Methods of gene and genome editing. Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS, 2020. P. 89–99.

4. Ghasemi Y., Nematzadeh, G. A., Omran, V. G., Dehestani, A., Hosseini, S. The effects of explant type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. *Biharean Biologist.* 2012. V. 6. No. 2. P. 73–76.

5. Gleba Yu.Yu., Myashkene I.V. Hybridization of somatic cells and the possibilities of analysis and manipulation of cytoplasm genes of higher plants. *Biopolymers and Cell.* 1986. V. 2. No. 1. P. 5–11.

6. Hoshino Y., Nakano M., Mii M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Plant Cell Reports.* 1995. V. 14. P. 341–344. doi: 10.1007/BF00238593

7. Kang H.H., Naing A.H., Kim C.K. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of *Petunia hybrida* Cv. Mirage Rose. *Biology.* 2020. V. 9(8):228. DOI: 10.3390/biology9080228

8. Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Methodical base of clonal micropropagation of some

Органогенез и протопласты *Saintpaulia ionantha*

- ornamental crops. Collection of scientific papers of the State Nikitsky Botanical Garden. 2014. V. 138. P. 57–101.
9. Kotovshchikova N.I. On the issue of cultivation of *Saintpaulia* (Biology and Ecology). *Proceedings of the Nikitsky Botanical Garden*. 1976. V. 68. P. 98–107.
10. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Safiullina M.G., Chemeris A.V. Effect of constitutive expression of *ARGOS-LIKE* gene on sizes of cells and organs of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Genetics*. 2013. V. 49. P. 503–510. doi: 10.1134/S1022795413040078
11. Kuluev B.R., Kruglova N.N., Zaripova A.A., Farkhutdinov R.G. Fundamentals of plant biotechnology: a textbook / edited by R.G. Farkhutdinov. Ufa: RIC BashSU. 2017. 244 p.
12. Rajabi A., Fahmideh L., Keykhasaber M., Omran V.G. Genetic engineering of novel yellow color african violet (*Saintpaulia ionantha*) produced by accumulation of Aureusidin 6-O-glucoside. *Biological Procedures Online*. 2022. V. 24(1). 3. doi: 10.1186/s12575-022-00164-0
13. Shukla M., Sullivan J.A., Jain S.M., Murch S.J., Saxena P.K. Micropropagation of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). In: Lambardi, M., Ozudogru, E., Jain, S. (eds) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. *Methods in Molecular Biology*. 2012. V. 994. Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8_22
14. Stork K., Stork J. You will be able to grow violets! M.: "House of Violets" 2013. 352 p.
15. Timofeeva O.A., Nevmerzhtskaya Yu.Yu. Clonal micropropagation of plants: Textbook. Kazan: Kazan University. 2012. 56 p.
16. Turpanova R.M., Kirgizova I.V. Optimization of conditions for isolation and cultivation of *Medicago falcata* protoplasts (Geology and Ecology). *KSTU News*. 2014. P. 379–381.
17. Vechernina N.A., Tavartkiladze O.K., Dumikin D.A., Smashnykh K.A., Gorina M.K. Micropropagation of violet plants *Saintpaulia jonantha*. In the collection: Biotechnology and society in the XXI century. Collection of articles of the International Scientific and Practical Conference. 2015. P. 329–333.
18. Voronina A.V., Vishnyakova A.V., Komakhin R.A., Monakhos S.G. Fundamentals of biotechnology of garden crops: a textbook. Moscow. 2023. 139 p.
19. Winkelmann T., Grunewaldt J. Analysis of protoplast-derived plants of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. *Plant Breeding*. 1995. V. 114(4). P. 346–350. doi: 10.1111/j.1439-0523.1995.tb01247.x
20. Winkelmann T., Grunewaldt J. Genotypic variability for protoplast regeneration in *Saintpaulia ionantha* (H. Wendl.). *Plant Cell Reports*. 1995a. V.14(11). P. 704–707. doi: 10.1007/BF00232651
21. Zaripova A.A., Mukhametvafina A.A., Urazbaktina K.A., Shigapova A.I., Akhmetova A.Sh., Shigapov Z.H. Clonal micropropagation of hybrid gloxinia. *Ecobiotech*. 2019. V.2. No.4. P. 533–539. doi: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-533-539