

М.В. Носырева, Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе  
**Регенерация и размножение растений  
бегонии in vitro**

Одной из перспективных, но трудно распространяемых культур цветводства является бегония (*Begonia rex* Putzeys). Традиционно листовенно-декоративные бегонии размножают вегетативно – черенками или фрагментами листа. Одним из недостатков вегетативного способа размножения является низкий коэффициент размножения, так как от одного листа возможно получить не более 3–4 растений. Ограничения в распространении бегонии связаны с длительностью процесса размножения, требовательностью культуры к температурному режиму, а также подверженностью заболеваниям [1, 2].

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения растений – клонального микроразмножения. В настоящее время неоспоримо его преимущество перед традиционными методами вегетативного и генеративного размножения растений. При использовании метода клонального микроразмножения появляется возможность увеличить коэффициент размножения до сотен тысяч и даже миллионов растений-регенерантов в год с одного маточного растения. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки под влиянием экзогенных воздействий регуляторами роста дать начало целому растительному организму. Культура тканей стала мощным инструментом расширения возможности процессов регенерации для различных видов растений [3, 4]. Так, коэффициент размножения луковиц некоторых сортов гиацинтов (*Marconie*, *Anna Marie*, *Grand Maitre*) в условиях *in vitro* в 40 раз выше, чем при размножении этих растений обычным способом, применяемым в цветоводстве [5]. Высокоэффективно использование метода культуры тканей и для другого растения – *Saintpaulia ionantha*, так как на одном листовом диске размером 1 см регенерировало  $37 \pm 7$  почек [6]. Используя листовые экспланты *Peperomia scandens* [7], *chrysanthemum* [8], *Paulownia fortunei* [9] регенерируют и успешно размножают *in vitro* эти виды растений.

Приведенные выше примеры использования методов клонального микроразмножения для ряда растений убедительно показывают не толь-

ко преимущество их перед традиционными способами размножения, но и их особенность, которая заключается в том, что до сих пор эти методы базируются на эмпирических подходах и поэтому требуют спецификации основной методики. Эта особенность учитывается как при работе с определенными видами или сортами растений, так и при использовании определенных типов эксплантов, изолированных от исследуемых видов или сортов.

Цель данной работы – разработка высокоэффективного метода размножения растений *Begonia rex* Putzeys. Исходя из поставленной цели, основная задача исследования заключалась в изучении влияния экзогенных регуляторов роста на индукцию морфогенетических процессов в культуре изолированных фрагментов листьев бегонии королевской.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлась *Begonia rex* Putzeys (бегония королевская) – многолетнее растение с ассиметричными, кососердцевидными, с коротким острием листьями, сверху в серебристых пятнах. Выведенные сорта и гибриды бегонии королевской отличаются высокой декоративностью.

В качестве первичных эксплантов использовали фрагменты различающихся по размеру листьев:

- базальные части от листовых пластинок размером 12x15 мм и 7x10 мм;
- срединные части от листовых пластинок размером 12x15 мм и 7x10 мм;
- кончики от листовых пластинок размером 12x15 мм и 7x10 мм;
- цельные листовые пластинки размером 5x5 мм;
- черешки листьев.

Поверхностную стерилизацию листьев проводили 0,1% раствором сулемы в течение 20 минут, затем четырежды промывали в стерильной дистиллированной воде. В последней порции воды листья выдерживали 40 минут, а потом делили на фрагменты. Полученные экспланты культивировали на агаризованных питательных средах (0,6% агар) с минеральной основой по прописи Мурасиге и Скута (МС), дополненных различными регуляторами роста: 6-бензиламинопурином (БАП), 1-нафтилуксусной кислотой

(НУК), кинетином (К), аденин сульфатом (Ас).

Питательные среды стерилизовали в автоклаве при давлении  $0,9 \pm 0,1$  атм. Все операции, требующие соблюдения условий асептики, проводили в ламинар-боксе. Культивирование эксплантов и регенерантов осуществляли в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Субкультивирование проводили через 25–28 суток. Учитывали количество регенерировавших почек. Укоренение размноженных побегов проводили на модифицированной МС питательной среде, дополненной 0,5 мкМ НУК [10] (Тиссер, 1989).

В течение 2–3 недель адаптировали растения-регенеранты к условиям *in vivo*. Для этого использовали гидропонную установку «Минивит – 0,35». Адаптированные растения-регенеранты высаживали в почву.

**Результаты и обсуждение.** Одним из методов размножения *in vitro* является прямая регенерация почек непосредственно тканями экспланта. Метод основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Основную роль при этом играют цитокинины, индуцирующие развитие *de novo* адвентивных почек из тканей экспланта [11].

Образование адвентивных почек бегонии происходило через 3–4 недели культивирования, чему предшествовало увеличение эксплантов в размере. Нами было установлено, что различные типы эксплантов характеризовались разной интенсивностью регенерационных процессов. Однако общим для всех используемых типов эксплантов явилось то, что образование меристематических очагов с последующей регенерацией в них почек происходило преимущественно в области центральной жилки и в раневых зонах. Такие же закономерности регенерации почек были обнаружены и при работе с фрагментами листьев других видов растений, например, примулы [12], стевии [13]. Различная интенсивность процессов регенерации побегов тканями эксплантов обусловлена разной активностью меристематических клеток и, следовательно, различающимся их физиологическим состоянием. Меристематическим тканям свойственна аттрагирующая способность, обуславливающая направленность транспорта ассимилятов в растения [14]. Это свойство сохраняется и для меристематических тканей в культуре *in vitro*. При этом в отделенном от растения листе транспорт ассимилятов продолжается из листовой пластинки в основание черешка. Средняя жилка выполняет коллекторную функцию:

по направлению от более тонких жилок к средней и к черешку происходит увеличение содержания сахаров и других веществ. Это является одной из причин того, что регенерация побегов происходит в основании листовой пластинки [15].

Известно, что регенерация адвентивных побегов зависит от типа экспланта. Способность эксплантов регенерировать растения характеризуется морфогенетическим потенциалом. Необходимо отметить следующие закономерности изменчивости морфогенетического потенциала:

во-первых, он увеличивается, если брать экспланты от укорененного растения по сравнению с неукорененными растениями в искусственной культуре. Это связано с наличием определенных соотношений физиологически-активных веществ;

во-вторых, морфогенетические потенциалы листьев возрастают от нижних листьев к верхним, что связано с онтогенетической молодостью последних;

в-третьих, побеги-регенеранты могут быть индуцированы из различных частей листовой пластинки, но наибольшей способностью к регенерации обладают ткани экспланта основания листа;

в-четвертых, при сравнении размеров листьев предпочтение надо отдавать небольшим, в виду их онтогенетической молодости [16].

Немаловажным фактором, оказывающим влияние на индукцию почек непосредственно из тканей экспланта, является возраст: чем моложе источник эксплантов, тем больше его морфогенетические потенциалы [17]. Об этом свидетельствуют данные, полученные при культивировании сегментов стебля хризантемы. Анализ экспериментального материала позволил авторам утверждать, что морфогенетический потенциал тканей зависел от возраста эксплантов. Наибольшая регенерационная способность была характерна для молодых сегментов стебля. По мере старения стебля его органогенная способность снижалась [18]. К противоположному мнению пришли Kane и Albert [19], изучая морфогенез ювенильных и взрослых листьев у *Myriophyllum heterophyllum*. Ими было установлено, что максимальное образование почек и побегов присуще взрослым листьям.

Морфогенетические потенциалы *Begonia rex* Putzeys изучали при добавлении в среду МС различных регуляторов роста, данные представлены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для целых листовых пластинок 5x5 мм, отрезков черешков и кончиков листовой пластинки оказалось более эффективным введение в состав среды 2 мкМ БАП и 0,5 мкМ НУК. Цельные

Влияние регуляторов роста на интенсивность процессов регенерации *Begonia rex* Putzeys в культуре листовых эксплантов (n = 15)

Тип экспланта	Варианты питательных сред*								НСР <sub>05</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1. Листовая пластинка (12 x 15 мм):									
– базальная часть	6**	13	7	30	7	6	6	0	2
– средняя часть	0	3	1	8	3	1	0	0	2
– кончик	1	9	3	3	2	1	1	0	2
2. Листовая пластинка (7 x 10 мм):									
– базальная часть	4	18	6	16	6	4	2	0	3
– средняя часть	0	2	2	6	3	0	0	0	2
– кончик	0	7	2	2	1	1	0	0	2
3. Листовая пластинка (5 x 5 мм)	3	37	5	17	5	4	2	0	2
4. Черешок (10 мм)	3	19	4	11	6	8	3	0	2
НСР <sub>05</sub>	1	3	2	4	1	1	1		

где \* 1 – МС; 2 – МС + БАП 2 мкМ + НУК 0.5 мкМ; 3 – МС + БАП 20мкМ + НУК 1 мкМ; 4 – МС + БАП 2 мкМ; 5 – МС + Ас 20 мг/л; 6 – МС + Ас 40 мг/л; 7 – МС + Ас 80 мг/л; 8 – МС + К 2 мкМ. \*\* количество побегов (шт.) на один регенерирующий эксплант.

листовые пластинки размером 5 x 5 мм характеризовались существенно более высокой регенерационной способностью на данной среде, в сравнении с другими типами эксплантов. Коэффициент размножения достигал у них 37 побегов на эксплант (против 3 побегов на эксплант на контрольной среде). Наличие в среде ауксинов и цитокининов имеет важное значение, так как их взаимодействие обеспечивает интенсивную индукцию стеблевого органогенеза.

Увеличение концентраций испытанных регуляторов роста (БАП до 20 мкМ и НУК до 1 мкМ) приводило к угнетению регенерационных процессов. По-видимому, данное количество регуляторов роста для культивируемых тканей оказалось выше физиологического уровня: проявилось их тормозящее действие на процессы регенерации.

Экспланты от базальной и средней части листа регенерировали наибольшее количество побегов на среде, дополненной только БАП 2 мкМ. При этом у базальной части листовой пластинки 12x15 мм количество регенерировавших побегов составляло 30 штук на эксплант (против 6 побегов на эксплант на контрольной среде). Сравнительно низкую интенсивность регенерации побегов наблюдали у эксплантов, изолированных от средней части листовой пластинки: их количество составило 6–8 побегов на эксплант (против 0 на контрольной среде).

Различную способность к образованию побегов у испытанных фрагментов листовых пластинок можно объяснить тем, что прекращение

митотической активности происходит, прежде всего, в тканях апикальной части листа, и дальнейшее снижение пролиферации идет в базипетальном направлении (от верхушки к основанию листовой пластинки). В зрелом листе интеркалярная меристема продолжает функционировать в основании листа [20].

Замена БАП на К привела к отрицательному результату: регенерации не отмечалось ни у одного из испытанных типов эксплантов. Исследования показали также малоэффективность Ас как индуктора процессов регенерации *Begonia rex* Putzeus. Наблюдали следующую закономерность: по мере повышения концентрации Ас с 20 мг/л до 80 мг/л снижалась регенерационная способность у всех типов испытанных эксплантов.

Таким образом, регенерация побегов непосредственно из исходных эксплантов зависит от типа использованного экспланта и от наличия в составе питательной среды определенных регуляторов роста. Поэтому целесообразно для увеличения коэффициента размножения каждый тип эксплантов культивировать на питательной среде, оптимальной по составу и концентрации регуляторов роста для конкретного экспланта.

Например, если использовать все типы эксплантов от всех имеющихся у одного растения-регенеранта листьев (12x15 мм, 7x10 мм и 5x5 мм) с учетом того, что каждый лист имеет черешок, и культивировать их на соответствующих оптимальных питательных средах, то возможно регенерировать более 170 побегов, тогда как

использование какого-либо одного из вариантов питательной среды без учета типа экспланта менее эффективно. Например, можно регенерировать только 17 побегов на безгормональной среде; 97 побегов – на среде с 2 мкМ БАП; 108 побегов – на среде с 2 мкМ БАП + 0,5 мкМ НУК. Эти примеры убедительно свидетельствуют о необходимости оптимизации питательной среды по составу экзогенных регуляторов роста для каждого типа эксплантов.

**Выводы.** 1. В присутствии регуляторов роста в питательной среде все типы листовых эксплантов способны к формированию адвентивных побегов. Основная регенерационная зона включает базальную часть листовой пластинки и че-

решок. Самая низкая способность к регенерации характерна для средней части и кончика листовой пластинки.

2. Установлено влияние экзогенных регуляторов роста на регенерационную способность исследованных типов эксплантов бегонии:

а) взаимодействие БАП и НУК, добавленных в концентрации 2,0 и 0,5 мкМ, соответственно, ведет к высокой степени регенерации у целых листовых пластинок, черешков и кончиков листовых пластинок;

б) для эксплантов от базальных и средних частей листовых пластинок достаточным является использование одного цитокинина БАП (2 мкМ).

## Литература

1. Roule D. Why does the UK lag on Rieger begonias. *Grower*, 1983. Vol. 99. №13.
2. Brothel H., Naumann K., Griesbach E. Die Oflecken krankheit der Begonien (*Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*) in der DDR. *Nachrichtl. Pflanzschutz in DDR*. 1985. Vol. 39. №1.
3. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений. М., 1987.
4. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н. Клональное микро-размножение новых плодово-ягодных растений. Минск, 1996.
5. Мауриня З.А., Штраусе С.З., Жола И.Я. Размножение гиацинтов при помощи культуры ткани на разных этапах периода покоя луковиц // Культура клеток растений и биотехнология. М., 1986.
6. Васкес А.М., Девей М.Р., Шорт К.С. Органогенез в культуре *Saintpaulia ionantha* // Мат. симп. по культуре ткани применит. к садоводству. Гент, Бельгия, 6–9 сент. 1977. М., 1980.
7. Кукульчанка К., Климашевска К., Плата Х. Регенерация целых растений *Peperomia scandens* Ruiz из различных частей листьев *in vitro* // Мат. по культуре ткани применит. к садоводству. Гент, Бельгия, 6–9 сент. 1977. М., 1980.
8. Шевцова Г.Г., Коев Г.В. Морфогенез хризантемы в культуре *in vitro* // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез. докл. междунар. конф. Новосибирск, 2–6 августа 1988 г. Новосибирск, 1988.
9. Kumar P., Dips R. C., Goh S. Influence of petiole and lamina on adventitious shoot initiation from leaf explants of *Paulownia fortunei* // *Plant Cell Repts.* 1998. Vol. 17. №11.
10. Тиссер Б. Эмбриогенез, органогенез и регенерация растений // Биотехнология растений: культура клеток. М., 1989.
11. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М., 1984.
12. Бородулина И.Д., Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Каллусогенез и регенерационная способность листовых эксплантов *Primula x poliantha* Mill // *Известия АГУ*. 1998. №4.
13. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Культура *in vitro* *Stevia rebaudiana* Bert // Флора и растительность Алтая: Тр. Южно-Сибирского ботанического сада. Барнаул, 1996.
14. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растениях. М., 1976.
15. Высоцкий В.А., Упадъшев М.Т. Регенерация вегетативных органов листовыми дисками и другими эксплантами рода *Rubus in vitro* // *Физиол. раст.* 1992. Т. 39. Вып. 3.
16. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур: Метод. рекомендации / Под ред. В.М. Тюленева. Мичуринск, 1996.
17. Высоцкий В.А. Клональное микро-размножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. М., 1986.
18. Lu Chin Yi, Nugent Greg, Wardley Terese. Efficient direct plant regeneration from stem segments of *chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. *Royal Purple*) // *Plant Cell. Repts.* 1990. Vol. 8. №12.
19. Kane M.E., Albert L.S. Comparative shoot and root regeneration from juvenile and adult aerial leaf explants of variable leaf milfoil // *J. Aquat. Plant Manag.* 1989. Vol. 27.
20. Полевой В.В., Саламатова Т.С. Физиология роста и развития растений. Л., 1991.