

УДК 631.532:635.9:582.846.2

СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BEGONIA* L. В ПРОЛОНГИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЕ

Фершалова Т.Д., Набиева А.Ю.

ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», Новосибирск,
e-mail: fershalova@ngs.ru

Изучение адаптационного потенциала четырёх таксонов из рода *Begonia* (*B. rockii* Irmscher, *B. sutherlandii* J.D. Hooker, *B. variegata* Y.M. Shui & W.H. Chen, *B. 'Gloire de Lorraine'*) способствовало выделению факторов, влияющих на длительное сохранение коллекции бегоний *in vitro* и *ex vivo* в Центральном сибирском ботаническом саду (ЦСБС). Выявлена взаимосвязь экологических условий произрастания данных бегоний в природе с ритмами роста в условиях оранжерей. Составлены феноспектры, отражающие фазы развития растений, что позволяет организовать необходимые агротехнические мероприятия для бегоний в течение года. Проанализирована продуктивность размножения изученных бегоний различными способами. Изучено влияние различных концентраций экзогенных регуляторов роста и состава питательных сред на регенерационную способность флоральных эксплантов 4 таксонов бегоний для моделирования их пролиферации в культуре *in vitro*. Предложен состав модифицированной среды N₆, включавшей цитокинины TDZ и БАП в концентрациях 0,5 мг/л и 1,0 мг/л соответственно, что позволило получить путем прямого органогенеза многочисленные регенеранты из фрагментов цветков бегоний, относящихся к разным генотипам. Жизнеспособность микрорастений была сохранена при культивировании в коллекции *in vitro* благодаря применению приема чередования питательных сред с различным соотношением макроэлементов и регуляторов роста. Подобраны субстраты для выращивания бегоний в условиях оранжерей и для адаптации микроклонов при переводе их в условия *ex vitro*. Предложенные способы длительного поддержания коллекции представителей рода *Begonia* предполагают сочетание стандартных методик и микроклонального размножения, при применении которых происходит реювенилизация растительного материала.

Ключевые слова: *Begonia*, интродукция, экологическая адаптация, флоральные экспланты, культура *in vitro*

WAYS OF PROPAGATION OF GENUS *BEGONIA* L. REPRESENTATIVES IN PROLONGED CULTURE

Fershalova T.D., Nabieva A.Yu.

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, e-mail: fershalova@ngs.ru

Study of adaptive potential of 4 taxons of *Begonia* genus (*B. rockii* Irmscher, *B. sutherlandii* J.D. Hooker, *B. variegata* Y.M. Shui & W.H. Chen, *B. 'Gloire de Lorraine'*) helped to distinguish the factors affecting the prolonged maintenance of *Begonia* collection *in vitro* and *ex vivo* in the Central Siberian Botanical Garden (CSBG). A correlation of natural ecological conditions of these *Begonia*s growing with rhythms of growth under the greenhouses conditions was revealed. The phenospectra representing the phases of the *Begonia*s development were made. This allowed to organize the necessary agrotechnical arrangements for *Begonia*s during the year. The productivity of different ways of *Begonia*s propagation was analyzed. Influence of various concentration of exogenous growth regulators as well as composition of nutrient mediums on regeneration ability of floral explants of 4 taxons of *Begonia*s for modeling of their proliferation in culture *in vitro* are studied. A modified medium N₆ was proposed. Its composition includes cytokinins TDZ and BAP in concentrations 0,5 mg/l and 1,0 mg/l, respectively. This allowed to obtain numerous regenerants initiated from *Begonia* flower fragments relating to different genotypes via direct organogenesis. The repeated exposure of *Begonia* plantlets to a sequence of media, containing different balances of macroelements and growth regulators provided the conservation of its viability in the collection *in vitro*. Substrates for growing *Begonia*s under greenhouse condition and for adaptation of microclones *ex vitro* were selected. The proposed methods of long-term maintenance of collection of *Begonia* genus representatives involve a combination of conventional propagation procedures and tissue culture technique, which allows rejuvenilization of plant material.

Keywords: *Begonia*, introduction, ecological adaptation, floral explants, culture *in vitro*

Род *Begonia* L. является одним из крупнейших родов цветковых растений, в него входят около 1500 видов и тысячи декоративных гибридов и сортов [1]. Представители рода составляют одну из крупнейших систематических коллекций в фондовых оранжереях Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН (около 300 таксонов), где проводится их углубленное изучение по различным научным аспектам. Нами исследуются биологические особенности представителей рода *Begonia*

в оранжерейной культуре и интерьерах, их адаптивные возможности, лекарственные и фитонцидные свойства [2]. Факт обнаружения значительных количеств антоцианов, аскорбиновой кислоты, фенольных соединений в надземной части исследованных видов в ЦСБС позволяет рассматривать их в качестве источников средств лечебного и профилактического назначения, а также для использования в медицинском и экологическом фитодизайне [3]. В рамках научной работы, направленной

на расширение коллекционного фонда растений из рода *Begonia*, нами разрабатывались способы размножения видов и их длительного поддержания *ex vivo* и *in vitro*. Ранее сообщалось о возможности введения бегоний в культуру *in vitro* с использованием разных типов эксплантов [4, 5]. Отмечено, что регенерационная способность более высокая у эксплантов генеративной сферы [4]. Регенерация происходила путем адвентивного побегообразования либо в каллусной культуре.

Цель работы – усовершенствовать методику размножения бегоний *in vitro* и *ex vivo* и изучить факторы, влияющие на длительное поддержание в коллекции данных таксонов.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись поликарпические бегонии, имеющие различные жизненные формы и феноритмологические особенности развития, обусловленные экологическими условиями мест их естественного произрастания.

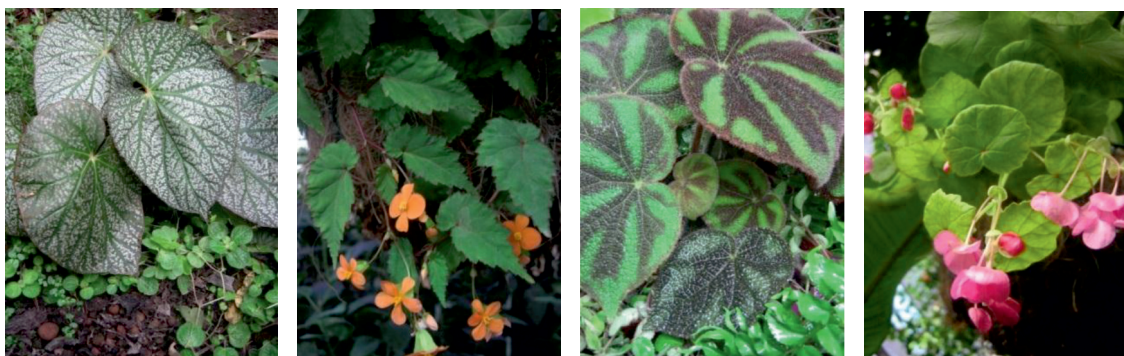
B. rockii из секции *Platycentrum*. Родина – Юго-восточная Азия. Корневищное растение. Ризомы удлинённые, приподнимающиеся над почвой на 10–12 см. Листья треугольно-яйцевидные, 2x8 см, темно-зеленые с белыми пятнами между главными жилками (рис. 1, а). Цветки однополые, белые, 4–5 см в диаметре. Цветет осенью. Произрастает под покровом леса, в ущельях, среди скал на высоте 700–800 м над уровнем моря.

B. sutherlandii из секции *Augustia*. Родина – Южная Африка. Травянистое, клубне-

вое растение, с ярко выраженным периодом покоя, во время которого надземная часть отмирает. Листья асимметричные, зубчатые, зеленые. Размер листовой пластинки: 2x3 см. Цветки однополые, оранжевые, 2–3 см в диаметре. Цветёт летом (рис. 1, б). Произрастает как петрофит на влажных скалах, у водопадов или как эпифит на деревьях на высоте 900–1800 м над уровнем моря.

B. variegata из секции *Coelocentrum*. Родина – Вьетнам. Корневищное травянистое растение, побеги на 1/3 погружены в почву, апикальная часть побега приподнимается над землёй на 3–6 см. Листья размером 10x12 см, тёмно-зелёные, широкоовальные с тёмно-коричневыми полосами вдоль основных жилок, морщинистые (рис. 1, в). Цветки однополые, светло-зелёные, до 1 см в диаметре. Цветёт летом. Растёт на скалистых известняковых склонах или в пещерах, под покровом леса, на высоте 100–300 м над уровнем моря.

B. 'Gloire de Lorraine' является гибридом, полученным в результате скрещивания *Begonia socotrana* J.D. Hooker с *Begonia dregei* Otto end A. Dietrich. В природных условиях эти два вида растут в сезонном климате. *B. 'Gloire de Lorraine'* унаследовала некоторые черты от каждой из родительских форм: розовые цветки, зимнее время цветения – явные признаки *B. socotrana*, продолжительность цветения унаследована от *B. dregei*. В исследовании сорт был включен благодаря обильному и продолжительному цветению в зимнее время, что является редким явлением в условиях закрытого грунта Западной Сибири (рис. 1, г).



а

б

в

г

Рис. 1. Бегонии из коллекции ЦСБС: а – *B. rockii*, б – *B. sutherlandii*, в – *B. variegata*, г – *B. 'Gloire de Lorraine'*

В качестве материала для введения в культуру *in vitro* были использованы фрагменты цветков данных видов бегоний, находящиеся в соцветии в закрытом состоянии. Перед стерилизацией экспланты промывали проточной водой (15 мин), затем 1% раствором фундазола в смеси с 3% раствором жидкого мыла (30 мин). Экспланты помещали на модифицированную среду N_6 (mN_6), содержащую 40 мг/л аденин сульфат, 3% сахарозу, 0,6% агар и регуляторы роста (варианты 2, 3, 4), а также на среду mN_6 без регуляторов роста (вариант 1). Для роста и мультпликации побегов микроклоны переносили на среду МС, содержащую 0,2 мг/л БАП. Для укоренения была использована среда Кнудсена без регуляторов роста. Время одного пассажа составляло 3 недели. Индукцию и культивирование эксплантов проводили при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде при искусственном освещении $40 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} / \text{сек}^{-1}$. Эксперименты *in vitro* повторялись трижды, в каждом варианте было 30 эксплантов. Для создания феноспектров использовали данные 15-летних наблюдений не менее 10 растений каждого из 4 таксонов рода *Begonia*. Полученные результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. В таблицах приведены средние арифметические и стандартные ошибки средних, статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для каждого из исследованных видов мы выделили некоторые экологические факторы, влияющие на их рост и развитие. У представителей тропического климата *B. rockii* и *B. variegata* нет выраженного периода покоя, что видно из феноспектра (рис. 2). Поэтому на их развитие оказывают влияние экзогенные факторы, в данном случае температура воздуха. При её понижении рост растений не прекращается, но заметно приостанавливается. Размножение этих бегоний в ЦСБС осуществляется делением корневищ и листовыми черенками. В условиях выращивания у *B. variegata* семена не вызревают, а у *B. rockii* семена мы получаем, но их всхожесть низкая и составляет 20%. Вегетативные части для размножения вышеописанных бегоний можно брать в любое время года. При соблюдении оптимального температурного и влажностного режима период получения диаспор из листовых черенков составляет у *B. rockii*

20–60 дней, а у *B. variegata* – 50–150 дней. Самый короткий период формирования диаспор наблюдался в весенне-летний период, а наиболее продолжительный – в осенне-зимний. Другой способ размножения, позволяющий получить у данных видов за год 3–4 новых экземпляра, – это деление корневища. Для выращивания вышеописанных видов подобран субстрат, исходя из условий произрастания этих бегоний в природе. Он состоит из следующих компонентов: листовая земля, песок, торф в пропорции 2:1:1.

У *B. sutherlandii* вступление в состояние покоя жестко детерминировано эндогенной ритмикой: после цветения, даже при благоприятных микроэкологических условиях, происходит торможение ростовых процессов и отмирание надземной части (рис. 2). Растение несколько месяцев сохраняется в виде клубня. Поэтому для культивирования *B. sutherlandii* в коллекции ЦСБС были созданы условия, приближённые к таковым в местах естественного произрастания вида по водному и температурному режиму. Для культивирования таксона разработана водо- и воздухопроницаемая почвосмесь, состоящая из листовой земли, песка, мелкой гальки, торфа, сосновой коры в пропорции 2:1:1:1:1, не позволяющая загнивать корневой системе. Размножение данного вида проводилось путем черенкования побегов и выводковыми почками, т.к. семена при интродукции не завязываются, а размножение с помощью листовых черенков неэффективно. У ‘Gloire de Lorraine’ нет выраженного периода покоя: в самые жаркие месяцы лета растение продолжает вегетировать, но цветение прекращается (рис. 2). Наиболее эффективным агротехническим приёмом в летний период является обрезка растений на 2/3 и укоренение стеблевых черенков в течение 20–30 дней. Отмечено, что листовых черенков. Субстрат для выращивания данного сорта состоит из листовой земли, песка, торфа, мелкого керамзита в пропорции 2:1:1:0,5. Для выявления оптимальных сроков размножения бегоний как *ex vivo*, так и *in vitro* нами составлены феноспектры, в которых отражены ритмы развития вегетативной и генеративной сферы у исследованных таксонов (рис. 2). Из представленных феноспектров видно, что у *B. sutherlandii* и *B. variegata* цветение наблюдается 4 летних месяца, самый короткий период цветения у *B. rockii* – 3 месяца, тогда как у *B. ‘Gloire de Lorraine’* – ценного представителя зимнецветущих растений – цветение продолжается 10 месяцев.

<i>Begonia</i>	Вегетативное развитие											
<i>rockii</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>sutherlandii</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>variegata</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
'Gloire de Lorraine'	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Генеративное развитие											
<i>rockii</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>sutherlandii</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>variegata</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
'Gloire de Lorraine'	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Месяц	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Условные обозначения:

■	Бутонизация	■	Интенсивное цветение	■	Завершение цветения
■	Отсутствие цветения	■	Умеренная вегетация	■	Интенсивная вегетация
■	Отмирание наземной части	■	Отрастание побегов	■	Плодоношение

Рис. 2. Феноспектры изученных бегоний

Описанные выше бегонии относятся к разным феноритмологическим группам и являются модельными объектами для отработки методики микроклонального размножения.

При введении в культуру *in vitro* эксплантов, изолированных из вегетативных органов бегоний (листьев, черешков) отмечена их высокая контаминация, что требовало более жестких условий стерилизации по сравнению с флоральными эксплантами. Для получения стерильных эксплантов – фрагментов женских и мужских цветков бегоний, находящихся в соцветии в закрытом состоянии, были применены 2 варианта стерилизации:

- 1) 70%-ный C_2H_5OH (30 сек) + 0,1%-ный раствор $HgCl_2$ (10 мин);
- 2) 0,1% раствор $AgNO_3$ (15 мин).

Выяснено, что наиболее оптимальным агентом для стерилизации фрагментов цветков бегоний, относящихся к 4 различным таксонам, является 0,1% раствор $AgNO_3$ (экспозиция 15 мин), при использовании которого жизнеспособность флоральных эксплантов достигала 86,6%. Для индукции адвентивного побегообразования была выбрана среда N_6 как наиболее универсальная для получения регенерантов бегоний из флоральных эксплантов. Процесс прямого морфогенеза побегов в культуре изолированных фрагментов цветков всех 4 геноти-

пов бегоний более интенсивно происходил под действием 0,5 мг/л тидиазурона (ТДЗ), в сочетании с 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,2 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК) (4 вариант среды mN_6) (рис. 3, г). Количество эксплантов, образовавших адвентивные побеги, различалось в зависимости от генотипа и регуляторов роста, вносимых в питательную среду (табл. 2).

Зафиксированы единичные случаи индукции флорального морфогенеза некоторых бегоний при введении в среду mN_6 0,2 мг/л цитокинина БАП (рис. 3, а, б). Проллиферации каллуса способствовало добавление в состав среды ТДЗ либо БАП в концентрации более 1 мг/л (рис. 3, в). В вариантах среды mN_6 число регенерировавших побегов составило от 4 до 35. Авторами отмечено, что для лучшего роста и мультипликации побегов бегоний, полученных путем индукции адвентивных почек флоральных эксплантов, целесообразно заменять питательную среду mN_6 с высоким содержанием макроэлементов на среду МС, включавшую более низкие дозы макроэлементов и цитокинина БАП (0,2 мг/л). Для укоренения была использована среда Кнудсена без регуляторов роста. Спустя 3 недели, укорененные регенеранты перемещали для адаптации к условиям *ex vitro* в закрытые пленкой контейнеры со стерильным песком (рис. 3, д, е).

Таблица 1

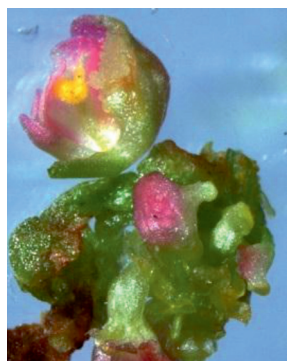
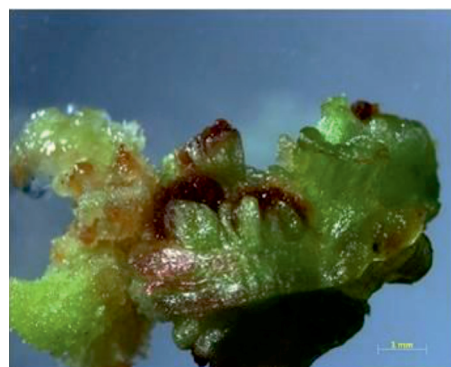
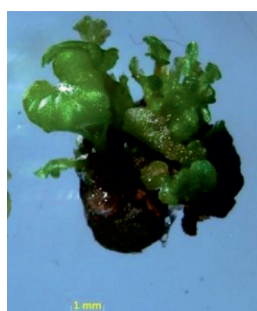
Действие режимов стерилизации на получение жизнеспособных эксплантов бегоний

Объекты	Жизнеспособность эксплантов, %	
	Вар. 1	Вар. 2
<i>B. variegata</i>	43,33 ± 7,30	58,66 ± 4,80
<i>B. rockii</i>	56,00 ± 2,40	67,00 ± 2,40
<i>B. sutherlandii</i>	64,20 ± 4,80	85,00 ± 2,40
<i>B. 'Gloire de Lorraine'</i>	65,00 ± 2,40	86,60 ± 5,60

Таблица 2

Интенсивность адвентивного побегообразования на флоральных эксплантах бегоний в зависимости от концентрации регуляторов роста и генотипа

Объекты	Число эксплантов (%), образовавших адвентивные побеги в 1-4 вариантах среды мN ₆			
	1, без регуляторов роста	2, ТДЗ (0,5 мг/л) + ИМК (0,2 мг/л)	3, БАП (1,0 мг/л) + ИМК (0,2 мг/л)	4, БАП (0,5 мг/л) + ТДЗ (0,5 мг/л) + ИМК (0,2 мг/л)
<i>B. variegata</i>	0,00 ± 0,00	36,00 ± 2,17	3,73 ± 0,38 б	54,00 ± 2,17
<i>B. rockii</i>	0,00 ± 0,00	47,00 ± 6,50	35,00 ± 7,37	78,00 ± 4,85
<i>B. sutherlandii</i>	0,00 ± 0,00	26,00 ± 4,24	3,57 ± 0,55	38,00 ± 3,84
<i>B. 'Gloire de Lorraine'</i>	0,00 ± 0,00	72,00 ± 5,66	63,00 ± 6,85	83,00 ± 2,64

а) Образование флоральных элементов (*B. 'Gloire de Lorraine'*)б) Флоральный морфогенез *in vitro* (*B. sutherlandii*)в) Инициация почек в каллусной культуре (*B. 'Gloire de Lorraine'*)г) Прямой органогенез микропобегов (*B. 'Gloire de Lorraine'*)д) Укоренение микророзеток *in vitro* (*B. 'Gloire de Lorraine'*)е) Регенеранты перед высадкой *ex vitro* (*B. 'Gloire de Lorraine'*, *B. rockii*)Рис. 3. Индукция различных путей морфогенеза флоральных эксплантов бегоний и этапы их культивирования в культуре *in vitro*

Спустя 4 недели адаптированные растения пересаживали на почвенные субстраты соответственно их экологической приуроченности. Микророзетки менее 2 см в диаметре культивировали на среде ½ МС с добавлением 30 мг/л аденин сульфата, что способствовало их длительному поддержанию в культуре *in vitro*. При замедлении роста регенерантов (примерно год спустя) их листья изолировали и помещали на среду МС, содержащую 50 мг/л аденин сульфата и 0,5 мг/л ТДЗ, что позволило получить от одного экспланта до 10–25 микрорастений в зависимости от генотипа. Другими авторами также отмечено, что при микроразмножении бегоний внесение ТДЗ либо БАП в индукционную среду способствует образованию адвентивных побегов [5], а низкие концентрации регуляторов роста позволяют получить регенеранты путем прямого и непрямого органогенеза [6].

Отмечено, что у растений-регенерантов 4 таксонов бегоний при их пассаже со среды Кнудсена на среду МС с добавлением 50 мг/л аденин сульфата и 0,5 мг/л ТДЗ в результате ювенилизации нивелируются ритмологические особенности, присущие данным генотипам. Вследствие чего изменением ростовой активности бегоний в процессе их культивирования *in vitro* возможно управлять, чередуя питательные среды различного состава.

Выводы

На основе анализа ритмов роста и развития 4 таксонов рода *Begonia* разработаны различные способы их вегетативного размножения в условиях оранжерей и в культуре *in vitro*. Фенологические наблюдения явились основой для выявления оптимальных сроков размножения бегоний и проведения агротехнических приемов, а также усовершенствования методики микроклонального размножения, что позволяет существенно повысить коэффициент размножения бегоний. В условиях проведенного эксперимента органогенез адвентивных побегов из флоральных эксплантов бегоний происходил преимущественно прямым путем, а регенерационная способность зависела от генотипа и применяемых регуляторов роста. Для того чтобы длительно поддерживать бегонии в коллекции *in vitro*, необходимо

пролиферирующие культуры переносить на среды с различным содержанием регуляторов роста и макроэлементов, уменьшая их содержание перед высадкой *ex vitro*. Полученные результаты могут быть использованы для сохранения и эффективного размножения ценных генотипов рода *Begonia*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект r а № 17-44-540601). При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СОРАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 44053.

Список литературы

1. Tebbit M.C. Begonias: cultivation, natural history, and identification / M.C. Tebbit. – Portland: Timber Press, 2005. – 272 p.
2. Фершалова Т.Д. Интродукция бегоний в оранжереях и интерьерах / Т.Д. Фершалова, Е.В. Байкова, отв. ред. акад. РАН И.Ю. Коропачинский. – Новосибирск: Гео, 2013. – 157 с.
3. Антимикробная активность и содержание флавоноидов у некоторых представителей рода *Begonia* L., используемых в фитодизайне / Е.А. Карпова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 1. – С. 8–16.
4. Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia x hiemalis* Fotsch / A. Asmah [et al.] // Australian Journal of Crop Science. – 2013. – Vol. 7. № 5. – P. 691–698.
5. Micropropagation of *Begonia rex* Putz. by 6-benzyladenine and α -naphthalene acetic acid / K.D. Behzad [et al.] // International Journal of Biosciences. – 2015. – Vol. 6. № 5. – P. 8–15.
6. Kumari A., Baskaran P., Van Staden J. *In vitro* regeneration of *Begonia* homonyma – a threatened plant // South African Journal of Botany. – 2017. – Vol. 109. – P. 174–177.

References

1. Tebbit M.C. Begonias: cultivation, natural history, and identification / M.C. Tebbit. Portland: Timber Press, 2005. 272 p.
2. Fershalova T.D. Introdukcija begonij v oranzherejah i intererah / T.D. Fershalova, E.V. Bajkova, отв. red. akad. RAN I.Ju. Koropachinskij. Novosibirsk: Geo, 2013. 157 p.
3. Antimikrobnaja aktivnost i sodержanie flavonoidov u nekotoryh predstavitelej roda *Begonia* L., ispolзуemyh v fitodizajne / E.A. Karpova [i dr.] // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2011. no. 1. pp. 8–16.
4. Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia x hiemalis* Fotsch / A. Asmah [et al.] // Australian Journal of Crop Science. 2013. Vol. 7. no. 5. pp. 691–698.
5. Micropropagation of *Begonia rex* Putz. by 6-benzyladenine and α -naphthalene acetic acid / K.D. Behzad [et al.] // International Journal of Biosciences. 2015. Vol. 6. no. 5. pp. 8–15.
6. Kumari A., Baskaran P., Van Staden J. *In vitro* regeneration of *Begonia* homonyma a threatened plant // South African Journal of Botany. 2017. Vol. 109. pp. 174–177.