

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 582. 681. 61:57. 085. 2

**РОЗРОБКА ПРОТОКОЛУ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ
IN VITRO BEGONIA RIGER ELATIOR ДЛЯ МАСОВОГО ВИРОБНИЦТВА
САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ**

Н. Іванова

*Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр НААН України
м. Ялта, смт Нікіта 98648, АР Крим, Україна
e-mail: in_vitro@ukr.net*

На основі даних досліджень показано можливість одержання регенерантів чотирьох сортів *B. riger elatior*. Визначені оптимальні концентрації регуляторів росту в поживному середовищі, що впливають на процеси регенерації рослин. Розроблено протокол клонального мікророзмноження рослин *B. riger elatior*.

Ключові слова: бегонія, регулятори росту, культура *in vitro*, калюс, регенерант.

Проблема прискореного розмноження цінних сортів і нових селекційних форм декоративних рослин дуже цікавить фахівців у сучасному квітникарстві. Традиційне вегетативне розмноження є трудомістким, потребує тривалого часу і часто не дає змоги звільнити рослину від патогенних організмів, які погіршують товарний вигляд, пригнічуючи ріст і розвиток рослин. Вегетативні способи розмноження дозволяють одержувати від 3 до 10 рослин на рік з одного маточника, тоді як за клонального мікророзмноження кількість одержаних рослин може становити сотні тисяч штук. Рослинний матеріал, одержаний у культурі *in vitro*, відрізняється генетичною та онтогенетичною однорідністю, якісним зовнішнім виглядом [3, 6, 8–10]. Водночас технології клонального мікророзмноження дають змогу одержувати садивний матеріал декоративних культур, вільний від патогенів.

Рід бегонія (*Begonia* L.) належить до родини бегонієвих (Begoniaceae С.А. Agardh.). У квітникарстві нині поширені близько 130 видів і понад 2000 гібридів [7]. Для вегетативного розмноження використовують пагони та листки. Бегонію елатіор (*Begonia* x *elatior*, *B. hiemalis*) одержано внаслідок схрещування *B. tuberhybrida* та *B. socotrana*. Про можливість клонального мікророзмноження окремих сортів *B. elatior* з використанням різних експлантів повідомляється в низці публікацій [4, 11, 14, 15, 17]. Проте на сьогодні не відомий універсальний спосіб розмноження, який би забезпечував стійку регенерацію мікропагонів *B. riger elatior* в умовах *in vitro*.

Метою цього дослідження було вивчити вплив регуляторів росту на індукцію морфогенетичних процесів у культурі ізольованих сегментів суцвіть рослин *B. riger elatior* чотирьох сортів та розробити протокол клонального мікророзмноження досліджуваної культури для подальшого тиражування цінних генотипів.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в умовах лабораторії біохімії, біотехнології та вірусології рослин Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру НААН України.

Як первинні експланти були використані суцвіття рослин *B. riger elatior* сортів Krefeld, Schwabenland, Nixi red і Nixi rose, вирощених в умовах закритого ґрунту. В роботі дотримувалися загальноприйнятих методів культури ізольованих клітин, органів і тканин

рослин [2]. Для стерилізації рослинних експлантів застосовували 70%-ний C_2H_5OH (1 хв) та 1%-ний розчин $NaClO$ (10 хв). Сегменти суцвіть *B. riger elatior* культивували на модифікованих поживних середовищах, що містили макроелементи за Кнопом [13], мікроелементи за Буржен-Нічем [12], доповнених 54,35 мкМ аденінсульфату, 3% сахарози, 0,8% агару. Як регулятори росту використовували ауксини: 0,54–2,69 мкМ α -нафтилоцтову кислоту (НОК), 5,71–11,42 мкМ β -індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК) та цитокінін 6-бензиламінопурин (БАП) у концентрації 4,40–13,30 мкМ. Склад поживних середовищ для різних етапів регенерації подано в табл. 1.

Таблиця 1

Склад поживних середовищ для різних етапів морфогенезу
в культурі сегментів суцвіть *B. riger elatior*

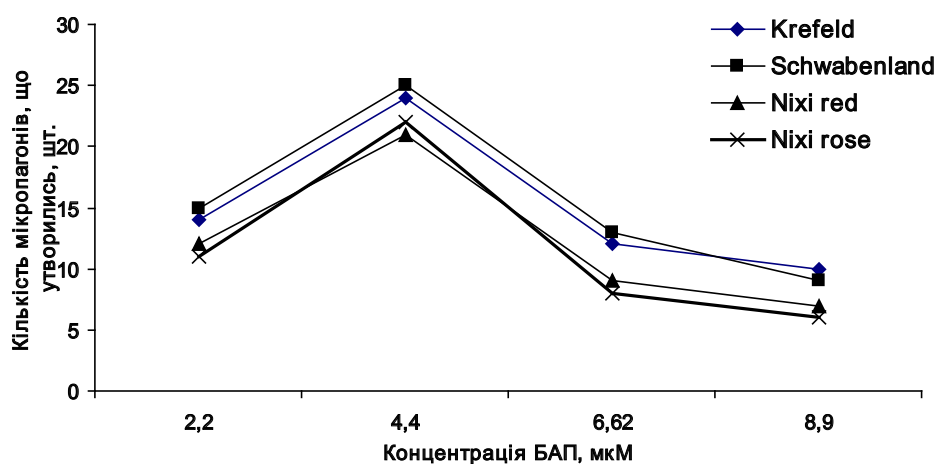
Компоненти	Середовище А	Середовище Б	Середовище С
	індукція калусоутворення	регенерація мікропагонів	ризогенез
Макросолі, мг/л:			
KNO_3	125	125	125
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500	500	500
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125	125	125
KH_2PO_4	125	125	125
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3	37,3	37,3
Мікросолі, мг/л:			
H_3BO_3	10	10	10
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25	25	25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	10	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25
Вітаміни, мкМ:			
Гліцин	8,61	8,61	8,61
Тіамін-НСІ	1,49	1,49	1,49
Піридоксин-НСІ	2,96	2,96	2,96
Нікотинова к-та	40,6	40,6	40,6
Мезоінозит	555,1	555,1	555,1
Регулятори росту, мкМ:			
БАП	13,30	4,40	–
НОК	2,69	2,69	–
ІОК	–	1,14	–
ІМК	–	–	4,90
ГК	–	2,89	–
Аденін $\cdot SO_4$	54,29	54,29	–
Фолієва к-та	1,13	1,13	–
Біотин	0,20	0,20	–
Сахароза, г/л	30,0	20,0	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0	8,0

Колби та пробірки з експлантами вміщували до кліматичної камери з температурою 23–25°C, 16-годинним фотоперіодом, інтенсивністю освітлення 2–3 клк, відносною вологістю повітря 70%. Вкорінення мікропагонів у культурі *in vitro* здійснювали на агаризованому поживному середовищі МС [16], яке містило 2,95–7,36 мкМ β -індоліл-3-масляну кислоту (ІМК). Одержані регенеранти адаптували на стелажі прискореного вегетативного розмноження (СПВР), а потім переносили до теплиці.

Результати і їхнє обговорення

Одержання морфогенного калюсу та подальша регенерація мікропагонів є основними етапами біотехнологій одержання квітково-декоративних культур [1]. Проліферація калюсу

та регенерація з нього мікропагонів є ефективним, а часто і єдино можливим способом розмноження квітково-декоративних рослин. Унаслідок проведення досліджень було відзначено, що утворення морфогенного калюсу відбувалося за 4–5 тижнів культивування сегментів суцвіть завдовжки 12 мм на агаризованому поживному середовищі А. Активне формування калюсу спостерігали в пазухах приквітків і базальній частині квітконіжки молодих суцвіть. У процесі досліджень виявлено вплив регуляторів росту на утворення калюсу досліджуваних сортів *B. riger elatior*. Максимальну частоту калюсоутворення було відзначено на агаризованому поживному середовищі А, доповненому 2,69 мкМ НОК та 13,30 мкМ БАП. Унаслідок використання поживних середовищ із різними концентраціями БАП на тлі постійних концентрацій НОК (2,69 мкМ) та ІОК (1,14 мкМ) було виявлено, що застосування БАП у концентрації 2,20–4,40 мкМ активно індукувало розвиток адвентивних бруньок і мікропагонів у калюсній культурі *B. riger elatior* (див. рисунок).



Вплив різних концентрацій БАП на регенерацію мікропагонів *B. riger elatior* сортів, що вивчаються (2,69 мкМ НОК і 1,14 мкМ ІОК).

Відомо, що калюсні клітини можна тривалий час культивувати в умовах *in vitro*, але в цьому разі у них зазвичай виникають цитогенетичні зміни [5]. У наших експериментах для зниження рівня соматональної мінливості період росту калюсу обмежували 3–4 пасажами. За тривалішого культивування після 5–7 пасажів відзначали зниження частоти регенерації. Введення до поживного середовища, разом з БАП, НОК, ІОК, 61,96 мкМ сульфату цинку та 2,89 мкМ ГК сприяло подальшому росту одержаних мікропагонів.

Проведені експерименти засвідчили, що коефіцієнт розмноження залежав не лише від складу поживного середовища Б (табл. 1), а й від сортових особливостей культури. За дотримання однакових умов культивування *in vitro* активніше розвивалися сорти Krefeld і Schwabenland (червоні, неповні). Частота регенерації мікропагонів була нижчою у сортів Nixi red та Nixi rose (з повними квітками); середня кількість мікропагонів на експлант становила $30,2 \pm 5,2$ шт. у сорту Krefeld, $31,3 \pm 1,7$ шт. у сорту Schwabenland, $27,9 \pm 1,2$ шт. у сорту Nixi red, $26,6 \pm 1,2$ шт. у сорту Nixi rose.

Для вкорінення мікропагони *B. riger elatior* переносили на середовище С (табл. 1). 100%-не вкорінення мікророзеток спостерігали у присутності 4,90 мкМ ІМК. Утворення

корінців здебільшого відбувалося в основі мікропагона. Як видно з даних у табл. 2, за 14 діб середня кількість коренів становила $4,15 \pm 1,2$ шт. на пагін, а їхня середня довжина – $2,51 \pm 1,2$ см.

Таблиця 2

Вплив концентрації ІМК на вкорінення рослин
B. riger elatior в умовах *in vitro* (за 14 діб культивування)

Концентрація ІО ₁ К, мкМ	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, см	Частота вкорінення, %
2,95	$2,89 \pm 1,1$	$1,96 \pm 1,3$	$35,0 \pm 1,9$
3,49	$3,18 \pm 1,1$	$2,12 \pm 1,0$	$63,12 \pm 1,5$
4,90	$4,15 \pm 1,2$	$2,51 \pm 1,2$	100
7,36	$7,86 \pm 1,8$	$3,23 \pm 1,1$	$45,0 \pm 1,9$

Під час розроблення способу адаптації пробіркових рослин велика увага приділялася якісним характеристикам отриманих регенерантів і добору адаптаційних субстратів, що являють собою суміш природних і синтетичних компонентів у певних співвідношеннях. Мініатюрні регенеранти з добре розвинутим корінням за 6 тижнів культивування пікували у вазони з адаптаційним субстратом, що складався з торфу, перліту, піску за рН 5,5 і тримали в умовах, наближених до умов *in vitro*. Встановлено, що для регенерантів *B. riger elatior* найкращою виявилася суміш торфу й перліту (2:1). Використання цього стерильного субстрату допомогло збільшити частоту приживаності рослин в умовах *in vivo* до 88,4–90,1% (табл. 3).

Таблиця 3

Результати адаптації регенерантів *B. riger elatior*
на різних ґрунтових сумішах в умовах *in vivo*

Тип субстрату	Частота приживаності, %			
	сорт Kefeld	сорт Schwabenland	сорт Nixi red	сорт Nixi red
Торф	$55,6 \pm 3,1$	$53,1 \pm 2,8$	$50,4 \pm 2,3$	$49,8 \pm 2,6$
Перліт	$50,0 \pm 2,3$	$48,3 \pm 3,1$	$46,2 \pm 2,6$	$45,3 \pm 2,4$
Торф : перліт (1:1)	$76,2 \pm 2,8$	$74,1 \pm 3,2$	$68,4 \pm 2,7$	$69,0 \pm 3,8$
Торф : перліт (2:1)	$90,1 \pm 2,6$	$90,0 \pm 2,8$	$88,4 \pm 2,5$	$89,1 \pm 2,9$
Торф : пісок (1:1)	$61,3 \pm 2,7$	$59,8 \pm 2,7$	$58,3 \pm 2,4$	$56,4 \pm 2,3$

У перші дні адаптації рослини витримували в приміщенні при температурі 22–24°C в умовах підвищеної вологості (80–90%), а через 2 тижні – при відносній вологості 70%. Встановлено середню тривалість періоду адаптації – 1,5–2 місяці. Адаптовані рослини відрізнялися хорошим розвитком кореневої системи і надземної частини. Після висадження у вазони більшого об'єму рослини переносили для дорошування в теплицю. Перше цвітіння спостерігали після 3–4 місяців дорошування. Весь процес розмноження займав 7–8 місяців від уведення експланта на поживне середовище до цвітіння.

На основі проведених досліджень розроблено протокол клонального мікророзмноження для досліджуваних рослин *B. riger elatior* сортів Krefeld, Schwabenland, Nixi red і Nixi rose, який складається з таких етапів:

1. Стерилізація рослинного матеріалу (70%-ний C_2H_5OH (1 хв), 1%-ний розчин $NaClO$ (10 хв).
2. Введення первинного експлantu в умови *in vitro* (сегменти суцвіть завдовжки 12 мм).
3. Непрямий органогенез в умовах *in vitro* (поживне середовище А, доповне-

не13,3 мкМ БАП і 2,69 мкМ НОК; поживне середовище Б, доповнене 2,22–4,40 мкМ БАП, 2,69 мкМ НОК та 1,14 мкМ ІОК. Умови культивування: інтенсивність освітлення 2 кЛк, температура 23–25°C, 16-годинний фотоперіод, вологість повітря 70%).

4. Укорінення мікропагонів в умовах *in vitro* (поживне середовище С, доповнене 4,90 мкМ ІМК).

5. Адаптація рослин *in vivo* (стерильна суміш торфу й перліту (2:1); умови адаптації: інтенсивність освітлення 3 кЛк, температура 22–24°C, 16-годинний фотоперіод, вологість повітря 80–90%).

Таким чином, установлені оптимальні концентрації регуляторів росту в модифікованих поживних середовищах на різних етапах регенерації рослин *B. riger elatior* через непрямий органогенез і розроблено протокол клонального мікророзмноження рослин. Отримані результати можуть бути використані для масового тиражування вивчених сортів *B. riger elatior*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
2. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наук. думка, 1980. 488 с.
3. Митрофанова И. В., Иванова Н. Н., Митрофанова О. В., Ежов В. Н. Биотехнологические системы оздоровления и клонального микроразмножения цветочно-декоративных растений // Геном рослин: V Міжнар. конф. (Одеса, 2008). Одеса, 2008. С. 207–209.
4. Митрофанова О. В., Иванова Н. Н. Микроразмножение бегонии Элатиор // Цветоводство. 1986. № 6. С. 12–13.
5. Фролова Л. В. Особенности популяции культивируемых клеток // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 5–16.
6. Червченко Т. М., Лаврентьева А. Н., Иванников Р. В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. К.: Наук. думка, 2008. 559 с.
7. Шахова Г. И. Бегониевые. М.: Планета, 1987. Сер. Комнатные растения. Вып. 3. 60 с.
8. Anderson W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron* // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1984. Vol. 109. P. 343–347.
9. Ando T., Murasaki K. *In vitro* propagation of *Cyclamen* by the use of etiolated petioles // Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ. 1983. Vol. 32. P. 1–5.
10. Vapat V. A., Narayanaswamy S. Growth and organogenesis in explanted tissues of *Amaryllis* in culture // Bull. Torrey Bot. Club. 1976. Vol. 103. N 1. P. 53–60.
11. Bigot C. Multiplication vegetative *in vitro* de *Begonia hiemalis* (Rieger et Schwabenland): II. Conforme des plantlets elevees en serre // Agronomie. 1981b. Vol. 1. P. 441–447.
12. Bourgin J. P., Nitsch J. P. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir detamines cultivees *in vitro* // Ann. Physiol. Veg. 1967. Vol. 9. N 4. P.377–382.
13. Knop W. Quantitative Untersuchungen uber di Ernahrungsprozess der Pflanzen // Land.Vers. Sta. 1865. Vol. 7. P. 93.
14. Margara J., Piollat M. T., Domin M. Organogenesis normale ou atypique en culture *in vitro* a partit dupetale de *Begonia elatior* // Ibid. 1982. N 2. P. 127–132.
15. Mikkelsen E. P., Sink K. C. *In vitro* propagation of rieger Elatior Begonias // Hort Sci. 1978. Vol. 13. P. 242–244.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue

- culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.
17. Reuter G., Bhandari N. N. Organogenesis and histogenesis of adventitious organs induced on leaf blade segments of *Begonia elatior* hybrids (*Begonia hiemalis*) in tissue culture // *Gartenbauwissenschaft.* 1981. B. 46. S. 241–249.

Стаття: надійшла до редакції 30.08.11

доопрацьована 19.09.11

прийнята до друку 28.09.11

ELEBORATION OF PROTOCOL CLONAL MICROPROPAGATION *IN VITRO* *BEGONIA RIGER ELATIOR* FOR MASS PRODUCTION OF PLANT MATERIALS

N. Ivanova

*Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre NAAS Ukraine
98648, Ukraine, Crimea, Jalta, Nikita
e-mail: in_vitro@ukr.net*

The possibility of the regenerants obtaining from 4 cultivars of *B. riger elatior* has been shown on the basis of researches' data. The optimal concentrations of growth regulators in culture medium, which influence a process of plants regeneration determined. The protocol of the *B. riger elatior* clonal micropropagation has been worked out.

Key words: begonia, growth regulators, culture *in vitro*, callus, regenerant.

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* *BEGONIA RIGER ELATIOR* ДЛЯ МАССОВОГО ПРОИЗВОДСТВА ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Н. Иванова

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН
Украины
г. Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина
e-mail: in_vitro@ukr.net*

На основании данных исследований показана возможность получения регенерантов четырех сортов *B. riger elatior*. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде, влияющие на процессы регенерации растений. Разработан протокол клонального микроразмножения растений *B. riger elatior*.

Ключевые слова: бегония, регуляторы роста, культура *in vitro*, каллус, регенерант.