

14. Johri B.M., Ambargaokal K.B., Srivastava P.S. Comparative embryology of angiosperms. Berlin: Springer-Verlag, 1992. – V. 2. – P. 650 – 653.

15. Maheshwary Devi H. Embryology of Jasminums (*J. sambac*, *J. calophyllum*) and its bearing on the oil composition of Oleaceae // Acta Botanica India. - 1975. – V. 3, N. 1 – P. 52 – 61.

Статья поступила в редакцию 24.07.2017 г.

Kuzmina T.N. Genesis of microsporangium of *Jasminum officinale* L. (Oleaceae) // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2017. – № 124. – P. 103–109.

The results of the study of anther and male gametophyte formation are presented. The wall microsporangium is developed centrifugally and it was shown while analyzing permanent preparations of buds. In the formed state of the wall anther is composed of epidermis, endothecium, a middle layer and 2 – 3 layers of cells of tapetum of a secretory type. Sporogenous tissue is formed with a single layer of cells. The wall of a mature anther is represented with two layers of cells: epidermis and irregular double layer endothecium. Microsporogenesis runs on a simultaneous type. Mature pollen grains of *J. officinale* are three-cells. In the middle samples of pollen morphologically normal pollen grains dominate, their amount is around 80%.

Key words: *Jasminum officinale*; *Oleaceae*; *anther*; *microsporangium*; *genesis*; *tapetum*; *microsporogenesis*; *pollen grain*

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 582.675.1:57.085.2

ВВЕДЕНИЕ ЭКСПЛАНТОВ ТРЕХ СОРТОВ КЛЕМАТИСА В УСЛОВИЯ *IN VITRO*

**Наталья Николаевна Иванова, Ирина Вячеславовна Митрофанова,
Наталья Васильевна Зубкова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита
irimitrofanova@yandex.ru

В статье представлены результаты исследований 3-х сортов клематиса на этапе введения в условия *in vitro*. Определены оптимальные сроки отбора исходного растительного материала, разработан способ получения асептической культуры для вегетативных почек клематиса, отобранных в период покоя. Выявлены особенности индукции первичных эксплантов изучаемых сортов клематиса. Показана высокая регенерационная способность почек в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *Clematis* sp.; *вегетативная почка*; *индукция*; *морфогенез in vitro*; *регенерация микропобегов*

Введение

Клематис (*Clematis* L.) – многолетняя красивоцветущая лиана-листолаз семейства *Ranunculaceae* Juss. В современных ботанических номенклатурах выделяют более 373 видов [17]. В ФГБУН «НБС-ННЦ» создана коллекция представителей рода *Clematis* L., насчитывающая 24 вида и 236 сортов отечественной и зарубежной селекции [3]. Коллекция способствует сохранению видов рода *Clematis* L., дает представление о многообразии биоморфологических признаков и этапах селекционной

работы. Однако культура клематиса значительно поражается вирусными, грибными и бактериальными заболеваниями, которые не только резко снижают декоративность растений, но и ограничивают их массовое размножение [8].

Наряду с этим недостаточная эффективность традиционных способов размножения (черенкование) требует новых подходов. Использование биотехнологических методов размножения растений позволяет получать здоровый генетически однородный растительный материал [8, 9]. В НБС разработан способ оздоровления и получения ряда сортов клематиса из вегетативных почек *in vitro* [5, 6]. Установлена зависимость регенерационной способности эксплантов отдельных сортов клематиса от сроков их введения, режима стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования [5].

Цель наших исследований – выявить морфогенетический потенциал эксплантов клематиса на начальных этапах культивирования, получить асептическую культуру и изучить особенности развития первичных эксплантов высокодекоративных сортов клематиса Альпинист, Синее Пламя и Crystal Fountain в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Для проведения биотехнологических исследований в 2016 году были отбраны 3 сорта клематиса, выращиваемые в генофондовой коллекции ФГБУН «НБС-ННЦ». Сорт Альпинист группа Ланугиноза (Бескаравайная, 1974). Кустарниковая лиана длиной до 3 м. Листья сложные, из 5 листочков, зеленые и светло-зеленые. Цветки бледно-сиреневые, до 14 см в диаметре, крестообразные; пыльники желтые [1]. Сорт Синее Пламя группа Жакмана (Волосенко-Валенис, 1961). Кустарниковая лиана до 4,0 м. длины. Листья сложные, из 3-5 листочков, зеленые и желто-зеленые, яйцевидные. Цветки темно-пурпурно-синие, бархатистые, с нижней стороны беловойлочные, 12-15 см в диаметре, дискообразные; пыльники крупные, желтые [1]. Сорт Crystal Fountain (*syn.* 'Fairy Blue') группа Флорида (Науакawa, 1994). Кустарниковая лиана длиной до 2,0 м. Листья тройчатые, зеленые, яйцевидные. Цветки махровые фиолетово-синие, в центре бледно-голубые, 10-12 см. в диаметре, дискообразные [3].

В условия *in vitro* были введены вегетативные почки изучаемых сортов клематиса. Исследования по введению эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации микропобегов проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ» с применением биотехнологических методов [2, 4, 7, 12]. Для поверхностной стерилизации эксплантов в качестве стерилизующих агентов были использованы 70-96%-ный раствор этанола (C_2H_5OH), 1%-ный раствор Thimerosal («Merk», Германия), 2-4%-ный раствор гипохлорита натрия ($NaClO$ «Sigma», США), 0.3% раствор препарата «Дез ТАБ» (действующие вещества: трихлоризоциануровая кислота ($C_3O_3N_3Cl_3$) ТХЦК-45%, натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты Na-соль ДХЦК-20%, Китай) и их комбинации. Экспозиция зависела от генотипа и размера экспланта. После каждого реагента экспланты промывали трижды в стерильной дистиллированной воде.

В экспериментах были использованы модифицированные питательные среды: МС [14], В5 [10] и Пирика [16]. Для регуляции процессов морфогенеза в питательные среды вводили регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (БАП), α -нафтилуксусную кислоту (НУК) (Sigma, США) в различных концентрациях и сочетаниях. При проведении хемотерапии *in vitro* использовали рибавирин (виразол, 1-бета-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, Sigma, США), введенный непосредственно в питательную среду в концентрации 10 мг/л. Контролем служила среда без вирицида. Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (фирма ESCO, Сингапур). Колбы и

пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Субкультивирование эксплантов проводили через 3-4 недели. Каждую серию опытов выполняли трижды в десятикратной повторности. Учитывали регенерационную способность культивируемых эксплантов для каждого генотипа (число полученных микропобегов на эксплант). Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

Результаты и обсуждение

Вегетативные почки растений клематиса изучаемых сортов отбирали непосредственно на коллекционном участке. В течение всего периода вегетации в ходе эксперимента изучали зависимость жизнеспособности эксплантов от срока изоляции (рис. 1). Учитывали прежде всего способность к регенерации микропобегов в условиях *in vitro*. В период с февраля по апрель количество почек, образующих микропобеги, достигло в среднем 75-81%; в январе этот показатель составил 45%. В мае, на начальном этапе развития почек возникали трудности на этапе стерилизации, поэтому количество почек, способных к регенерации не превышало 58%. Растительный материал, отобранный с исходных растений клематиса с июня по ноябрь был не способен к активной регенерации микропобегов. Так количество почек, образующих микропобеги составило 17-21%. Значительное повреждение растительных тканей в результате действия стерилизующих веществ снижало регенерационную способность эксплантов.

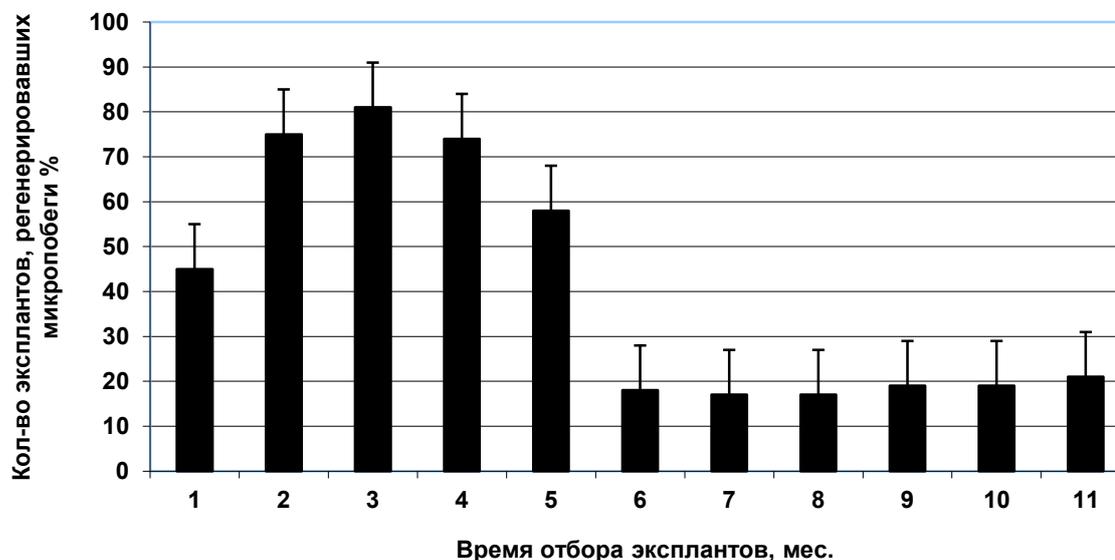


Рис. 1 Зависимость регенерационного потенциала вегетативных почек клематиса от времени отбора первичных эксплантов

Культивирование древесных и кустарниковых растений в условиях *in vitro* является сложным процессом, что связано с трудностями получения асептической культуры [2, 11]. Нами проведено сравнительное изучение различных способов стерилизации вегетативных почек клематиса с целью получения оптимального количества стерильных, жизнеспособных эксплантов. В экспериментах учитывали количество инфицированных, потемневших и развившихся почек. В таблице 1 приведены результаты получения асептической культуры трех сортов клематиса.

В качестве контроля принята обработка исходного растительного материала 70% раствором этилового спирта (10 мин). В этом случае уровень контаминации введенных эксплантов составил 89%. Использование 2%-ного раствора NaClO и 1%-ного р-ра Thimerosal также не приводило к значительному снижению контаминации. В этом случае количество инфицированных эксплантов составило 57% и 49% соответственно, а количество потемневших – 50 и 51%. Обработка растительного материала 4%-ным раствором NaClO (экспозиция до 10 мин) оказалась неэффективной. Основную часть составляла скрытая инфекция, которая проявлялась через 15-20 суток культивирования. Увеличение экспозиции до 15 мин приводило к потемнению тканей, при этом количество инфицированных эксплантов уменьшалось лишь на 6%. Из испытанных нами приемов единственно эффективным оказался способ последовательного применения 70%-ного этилового спирта, 1%-ного р-ра Thimerosal (экспозиция 10 мин) и 0,3%-ного р-ра Дез ТАБ (10-15 мин), после которого растительный материал трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. В ходе экспериментов по получению стерильных эксплантов клематиса не обнаружено значительных различий между исследуемыми сортами.

Известно, что клональное микроразмножение растений в условиях *in vitro* невозможно без подбора состава питательных сред для различных этапов морфогенеза [2]. Основные процессы, происходящие при культивировании тканей в значительной степени регулируются минеральными компонентами среды, их концентрацией и соотношением.

Для размножения декоративных растений в условиях *in vitro* наиболее часто используют среды МС, В5 и Пирика, которые различаются по количеству азота, фосфора и калия.

Таблица 1

Результаты стерилизации различными способами вегетативных почек клематиса

Способ стерилизации	Время стерилизации, мин	Количество вегетативных почек, %		
		инфицированных	некротизировавших	развившихся
70 % C ₂ H ₅ OH (Контроль)	10	89,0 ± 6,7	9,0 ± 2,1	2,0 ± 0,3
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 2% NaClO	1 10 10	57,0 ± 7,0	27,0 ± 3,2	6,0 ± 2,6
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 2% NaClO	1 10 15	49,0 ± 4,0	46,0 ± 4,2	5,0 ± 2,0
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 4% NaClO	1 10 10	40,0 ± 6,2	50,0 ± 5,4	10,0 ± 0,3
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 4% NaClO	1 10 15	34,0 ± 4,4	51,0 ± 0,9	15,0 ± 2,3
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 0,3% Дез ТАБ	1 10 10	40,0 ± 6,2	20,0 ± 4,9	40,0 ± 5,8
70 % C ₂ H ₅ OH 1% Thimerosal 0,3% Дез ТАБ	1 10 15	25,0 ± 2,4	15,0 ± 4,1	60,0 ± 5,6

Поведенные исследования показали, что на всех испытанных нами питательных средах почки 3-х изучаемых сортов оставались зелеными. Регенерацию микропобегов отмечали на средах МС и Пирика. На среде В5 наблюдали интенсивное формирование каллуса в

основании почки, который в дальнейшем препятствовал ее развитию. Начало индукции развития микропобегов на питательных средах наблюдали на 15 сутки культивирования. На среде МС образовывалось 2-3 дополнительных микропобегов, тогда как на среде Пирика – только один. Через 2-3 месяца культивирования длина побегов на среде МС достигала 6-8 см, на среде Пирика – 4-5 см. На среде МС микропобеги имели ярко-зеленую окраску, до 3-5 удлиненных междоузлий / побег. На среде Пирика микропобеги были тонкие, светло-зеленые, количество междоузлий – 2-3 шт. / побег. Исходя из полученных данных в последующих экспериментах в качестве основы была использована среда МС. Для оздоровления от фитопатогенов и получения безвирусных растений клематиса проводили хемотерапию в условиях *in vitro*.

Индущирующими факторами развития эксплантов при культивировании *in vitro* являются тип и концентрация регуляторов роста в питательной среде [2, 4, 15]. Подбирая соотношения и концентрации этих веществ можно направлено регулировать их органогенное действие. В наших экспериментах в качестве цитокинина использовался БАП. Так инициацию развития почек на среде МС, дополненной 2,20-4,40 мкМ БАП, 0,049 мкМ НУК, 2,0 мг/л тиамина и 10 мг/л рибавирина, наблюдали на 8-10-е сутки. Через 15 суток культивирования выдвигались первые листья, разрасталась базальная часть сегмента, в которой отмечено формирование глобулярных структур, имеющих светло-зеленую окраску (рисунок 2). На контрольной среде без рибавирина развитие почек начиналось на 5-6 сутки. Известно, что наличие в среде вирицида может приводить к оводнению, потемнению и гибели эксплантов [13]. Для оценки влияния регуляторов роста, их концентраций и комбинаций в среде МС на морфогенный потенциал изучаемых сортов клематиса в условиях *in vitro* был проанализирован морфометрический показатель – число микропобегов/эксплант. В результате проведенных исследований получены различные регенерационные ответы 3-х сортов клематиса (рис. 3).

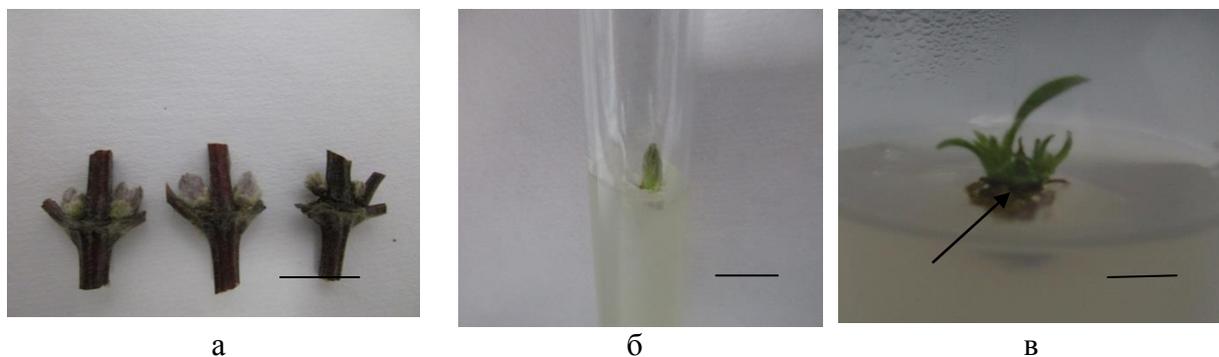


Рис. 2 Экспланты клематиса сорта Альпинист: а) исходные сегменты побега; б) изолированная вегетативная почка в условиях *in vitro*; в) регенерация микропобегов на среде МС, дополненной БАП (масштаб 1 см)

Установлен интервал концентраций БАП (2,20-3,11 мкМ), при которой получено $4,0 \pm 0,7$ нормально развитых микропобегов / эксплант у сорта Альпинист, $3,7 \pm 0,5$ микропобегов / эксплант у сорта Синее Пламя, $3,5 \pm 0,4$ у сорта Crystal Fountain (рис. 3).

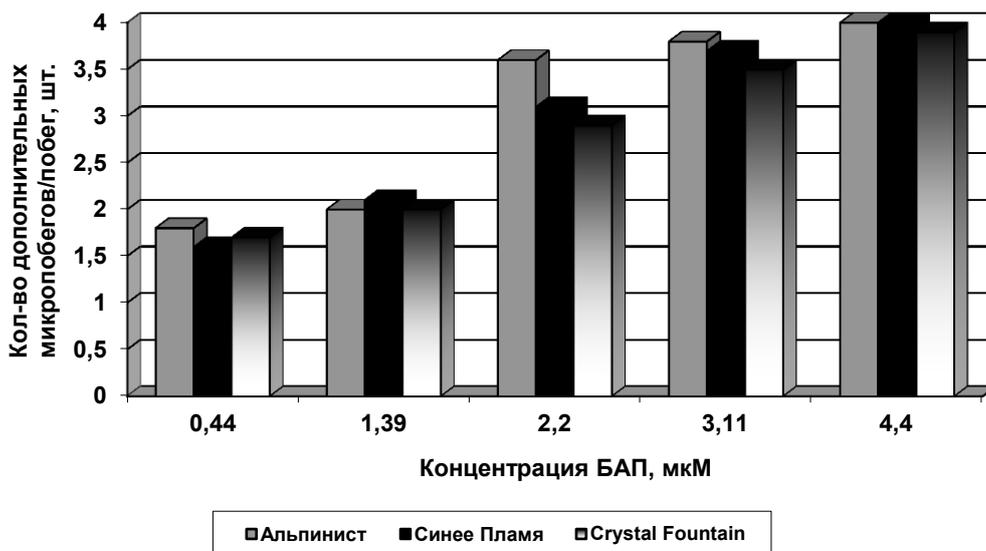


Рис. 3 Влияние различных концентраций БАП и 0,049 мкМ НУК на регенерацию трех сортов клематиса в условиях *in vitro*

Микропобеги достигали длины 2,0-2,5 см, имели 2-3 междоузлия. Увеличение концентрации БАП в среде МС способствовало формированию большего числа микропобегов. Так при наличии в среде 4,40 мкМ БАП у сорта Альпинист получено $4,7 \pm 0,6$ микропобегов/эксплант, однако у части из них наблюдались различные морфологические изменения: оводнение, искривление побега, формирование не пропорциональных листьев.

Выводы

Таким образом, в процессе исследований установлен морфогенетический потенциал вегетативных почек клематиса сортов Альпинист, Синее Пламя и Crystal Fountain в условиях *in vitro* и показано, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладали экспланты клематиса сорта Альпинист. Разработанный эффективный способ стерилизации закрытых вегетативных почек, изолированных в феврале-марте, позволяет получить до 60% стерильных, жизнеспособных эксплантов. Определены концентрации БАП для этапа индукции побегообразования изучаемых сортов клематиса.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00079.

Список литературы

1. Бескаравайная М.А. Клематисы. – М.: Росагропромиздат, 1991. – 189 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособ. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Зубкова Н.В. Перспективный сортимент клематисов (*Clematis* L.) для озеленения Южного берега Крыма / Монография / Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений в НБС (Современное состояние, перспективы развития и применение в ландшафтной архитектуре) / под ред. Ю.В. Плугатаря. Симферополь: ИТ «Ариал», 2015. – С. 109-117.

4. *Митрофанова И.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
5. *Митрофанова И.В., Зубкова Н.В., Соколова М.К.* Сравнительное изучение особенностей прямого соматического эмбриогенеза 8 сортов клематиса (sp.) // Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 128. – С. 12-24.
6. *Митрофанова И., Зубкова Н., Митрофанова О., Коротков О., Корзина Н., Иванова Н.* Клематисы: современные методы биотехнологии для размножения и сохранения видов и сортов // Цветоводство. – 2015. – № 3. – С. 16-19.
7. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П.* Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
8. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н.* Применение биотехнологических методов оздоровления растений и размножение безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада «Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур». – 2014. – Т. 138. – С. 5-56.
9. *Bhojwani S.S., Dantu P.K.* Plant Tissue Culture: An Introductory Text. New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2013. – 309 p.
10. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. Vol.46, N 5. – P. 417-421.
11. *Dodds J.H., Roberts L.W., Heslop-Harrison J.* Experiments in Plant Tissue Culture. 3rd Ed. – UK: Cambridge University Press., 1995. – 272 p.
12. *Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M.* Plants from Test Tubes: An introduction of Micropropagation, 4th edn Portland, OR, US: Timber Press, 2013 – 274 p.
13. *Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina E.L., Chirkov S.N.* Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanica Gardens and biotechnology of fig plants regeneration // Acta Hort. – 2016. – Vol. 139. – P. 303-309.
14. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. Vol.15, N 3. – P. 473-497.
15. *Parzymies M., Dabski M.* The effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of *Clematis viticella* (L.) and *Clematis integrifolia* Petit Faucon // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. – 2012. – Vol. 11, N. 1 – P. 81-91.
16. *Pierik R.L.M.* Anturium andreaenum plantlets produced from callus tissue cultivated *in vitro* // Physiol. Plant. – 1976. – Vol. 37, N 1. – P. 80-82.
17. The Plant List [Электронный ресурс] Режим доступа <http://www.theplantlist.org/>

Статья поступила в редакцию 10.04.2017 г.

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Zubkova N.V. Leading up explants of three clematis varieties into *in vitro* conditions // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2017. – № 124. – P. 109–115.

The results of three clematis varieties' research on the stage of leading up into *in vitro* conditions are presented in the article. The optimal rates of an original plant material choice are defined and the obtaining method of aseptic cultivar for clematis vegetative buds, which were chosen during a rest period, was worked out. The induction peculiarities of studied clematis varieties' primary explants were discovered. A high regenerative ability of the buds in the conditions *in vitro* was shown.

Key words: *Clematis* sp.; a vegetative bud; induction; morphogenesis *in vitro*; micro-shoots' regeneration