

УДК 582.675.1:57.085.2

РЕАЛИЗАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКСПЛАНТОВ КЛЕМАТИСА СОРТА CRYSTAL FOUNTAIN В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Наталия Николаевна Иванова, Ирина Вячеславовна Митрофанова, Татьяна
Николаевна Кузьмина, Наталья Васильевна Зубкова

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

В статье представлены результаты получения регенерантов клематиса сорта Crystal Fountain в условиях *in vitro* путем прямого и непрямого органогенеза. Выявлены особенности развития первичных эксплантов клематиса на этапе индукции побегообразования. Установлены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде для не прямой регенерации микропобегов из каллуса клематиса. Гистологический анализ подтвердил формирование в каллусе меристематических зон и адвентивных почек. Показана высокая регенерационная способность сорта Crystal Fountain 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 Лютиковые (Ranunculaceae Juss). В настоящее время в мировой практике зеленого строительства широко используется более 3000 сортов клематиса полученных в результате спонтанной и направленной селекции [14], при этом особым спросом пользуются махровые сорта японской селекции.

В ФГБУН «НБС-ННЦ» на базе созданной коллекции клематиса, ведется работа по сортоизучению и сортооценке, с целью отбора перспективного сортимента для декоративного садоводства. По итогам комплексной сортооценки выделено два высокоперспективных сорта ('Crystal Fountain', 'Pink Champagne') японской селекции, для пополнения зонального ассортимента культивируемых декоративных растений на Южном берегу Крыма и в районах со сходными климатическими условиями.

Одной из причин, ограничивающих использование этих сортов в озеленении региона, является нехватка адаптированного к местным экологическим условиям посадочного материала. Традиционные методы вегетативного размножения уже не могут удовлетворить растущий спрос на здоровый посадочный материал клематиса. Применение методов биотехнологии позволяет решить эту проблему [3, 11–13]. Вместе с тем отсутствует информация об особенностях морфогенеза *in vitro* данных сортов.

В лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ» на протяжении 20 лет проводятся исследования по изучению морфогенетического потенциала органов и тканей, клональному размножению и оздоровлению *in vitro* декоративных растений [5, 6, 16]. Разработаны способы получения растений клематиса отдельных сортов путем регенерации микропобегов из вегетативных почек, морфогенного каллуса, а также в процессе соматического эмбриогенеза [8–10]. Установлена зависимость регенерационной способности эксплантов отдельных сортов клематиса от генотипа растения, сроков изоляции, концентраций и соотношений регуляторов роста в питательных средах на разных этапах культивирования экспланта [7, 10].

Цель наших исследований была оптимизация приемов получения регенерантов клематиса сорта Crystal Fountain в условиях *in vitro* путем прямого и непрямого

органогенеза. Представленные результаты являются частью эксперимента по разработке протокола клонального микроразмножения исследуемого сорта клематиса.

Объекты и методы исследования

Для проведения биотехнологических исследований был отобран клематис сорта Crystal Fountain (syn. 'Fairy Blue') группа Флорида (Hayakawa, 1994), выращиваемый в генофондовой коллекции ФГБУН «НБС-ННЦ». Сорт Crystal Fountain – 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 [1].

В условия *in vitro* были введены закрытые вегетативные почки 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 [8, 15]. Экспланты стерилизовали последовательно в 70%-ном растворе этанола (C_2H_5OH), 1%-ном растворе Thimerosal и 0,3% растворе препарата «Дез ТАБ» (действующие вещества: трихлоризоциануровая кислота ($C_3O_3N_3Cl_3$) ТХЦК-45%, натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты Na-соль ДХЦК-20%).

В экспериментах были использованы модифицированные питательные среды на основе среды Мурасиге и Скуга (МС) [17]. Для индукции побегообразования в питательные среды вводили регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (БАП) и α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в различных концентрациях.

Сегменты микропобегов с узлом, культивируемых *in vitro* помещали на питательную среду МС. В экспериментах использовали тидиазурон (ТДЗ, Sigma, США) в концентрациях 3,0; 6,0; 9,0 и 12,0 мкМ. Контрольной была среда МС без цитокинина. Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (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).

Для приготовления постоянных препаратов для гистологического анализа брали каллус с морфогенными структурами, который фиксировали в смеси Чемберлена, содержащей 70% водный раствор этилового спирта, 40% формалин и ледяную уксусную кислоты в соотношении 90:5:5. Для обезвоживания материала использовали растворы этилового, бутилового спирта и хлороформ с постепенным повышением их концентрации. Инфильтрацию объектов парафином проводили в термостате при $+60^\circ\text{C}$. Парафиновые срезы делали на ротационном микротоме марки МРТУ толщиной 10-15 мкм. Постоянные гистологические препараты окрашивали гематоксилином и алциановым синим [4]. Анализ постоянных препаратов проводили методом светлопольной микроскопии на микроскопе AxioScopeA.1 (Zeiss, Германия). Микрофотографии получены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s и цифровой фотокамеры Canon IXUS 265HS. Для анализа изображений использовали программное приложение AxioVisionRel. 4.8.2 (Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

На этапе получения асептической культуры было показано, что наиболее эффективной являлась последовательная стерилизация растительного материала с последующей 3-х кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Положительные результаты получены для клематиса сорта Crystal Fountain при последовательном погружении вегетативных почек в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), в 1%-ный раствор Thimerosal (экспозиция 10 мин) и 0,3%-ный раствор Дез ТАБ (10–15 мин). Это позволило освободить растительный материал от экзогенной и эндогенной инфекции [7].

Регулирование морфогенеза с помощью цитокининов и ауксинов лежит в основе клонального микроразмножения растений [2, 13, 18]. Для изучения регенерационной способности вегетативных почек клематиса сорта Crystal Fountain на этапах индукции побегообразования и собственно микроразмножения в качестве цитокинина использовался цитокинин БАП. Так инициацию развития почек на среде МС, дополненной 2,20–4,40 мкМ БАП, 0,049 мкМ НУК и 2,0 мг/л тиамина, наблюдали на 10-е сутки культивирования в условиях *in vitro* (рис. 1а). Через 15 суток культивирования образовывались первые листья. Затем разрасталась базальная часть вегетативной почки, где происходило формирование адвентивных почек и микропобегов (рис. 1б).



Рис. 1 Развитие вегетативной почки (а) и регенерация микропобегов клематиса сорта Crystal Fountain на среде МС, дополненной 2,20–4,40 мкМ БАП, 0,049 мкМ НУК БАП (б) в условиях *in vitro*

В процессе эксперимента нами было изучено влияния концентраций БАП в среде МС на пролиферацию микропобегов в условиях *in vitro*. Результаты исследования представлены на рисунке 2. Установлены оптимальные концентрации БАП (2,20–3,11 мкМ), при которых получено $3,5 \pm 0,4$ микропобегов/эксплант (рис. 2).

Микропобеги достигали длины 2,0–2,5 см, имели 2–3 междоузлия. Дальнейшее субкультивирование на среде МС, содержащей 0,89 мкМ БАП и 0,049 мкМ НУК способствовало спонтанному ризогенезу, что исключает отдельный этап укоренения в условиях *in vitro* (рис. 3).

Увеличение концентрации БАП в среде МС способствовало формированию большего числа микропобегов. Так при наличии в среде 4,40 мкМ БАП получено $3,9 \pm 0,5$ микропобегов/эксплант, их длина достигала 3,0 см, однако у части побегов наблюдались различные морфологические изменения: деформация побега, формирование не пропорционально крупных единичных листьев. Известно, что высокие концентрации цитокининов часто оказывают негативное влияние при длительном субкультивировании растений в условиях *in vitro*: изменение морфологии,

подавление адвентивного побегообразования, уменьшение способности к укоренению и потеря жизнеспособности [6, 8, 13].

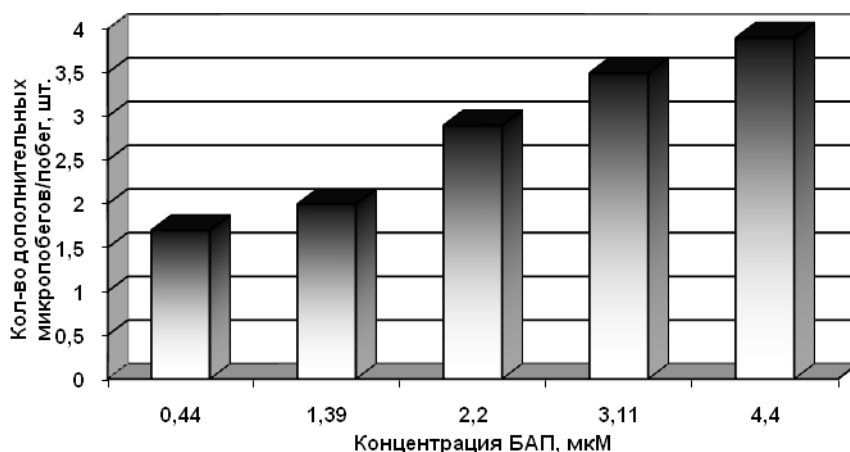


Рис. 2 Влияние различных концентраций БАП и 0,049 мкМ НУК на регенерацию клематиса сорта Crystal Fountain в условиях *in vitro*



Рис. 3 Регенеранты клематиса сорта Crystal Fountain в условиях *in vitro*

Не менее важной и сложной проблемой при разработке систем регенерации растений является индукция морфогенного каллуса и последующее эффективное побегообразование клематиса путем непрямого органогенеза. Известно, что каллусные клетки активно делятся, размножаются и при определенных условиях переходят к организованному росту и формированию микропобегов. При этом, основным условием, определяющим переход от пролиферации каллуса к органогенезу является наличие в среде регуляторов роста [2, 8, 12].

В наших опытах индукцию образования каллуса наблюдали на питательных средах МС, содержащей 6,0 мкМ ТДЗ. В узлах сегментов микропобега в месте контакта его с питательной средой было отмечено формирование плотного каллуса зеленого цвета. Через 6 недель культивирования на средах с 6,0 мкМ ТДЗ на его поверхности появлялись шаровидные, блестящие бугорки, из которых впоследствии формировались розетки листьев (рис. 4а).

Увеличение продолжительности культивирования эксплантов свыше 6 недель стимулировало непрямую регенерацию микропобегов в условиях *in vitro* (рис. 4б). Полученные микропобеги субкультивировали для удлинения и размножения на среде МС, дополненной 0,89 мкМ БАП и 0,049 мкМ НУК. Получено 6-8 микропобегов на

эксплант у клематиса сорта Crystal Fountain. При визуальном осмотре микропобегов не отмечено морфологических изменений.



Рис. 4 Непрямой органогенез в культуре клематиса сорта Crystal Fountain: а) формирование адвентивных почек в морфогенном каллусе; б) регенерация микропобегов в каллусе сорта Crystal Fountain, полученные путем на среде МС, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ

Гистологический анализ каллусных структур, культивируемых на питательной среде с 6,0 мкМ ТДЗ, показал, что основная часть каллуса представлена крупными паренхимными клетками с небольшим ядром и слабо окрашивающейся цитоплазмой (рис. 5).

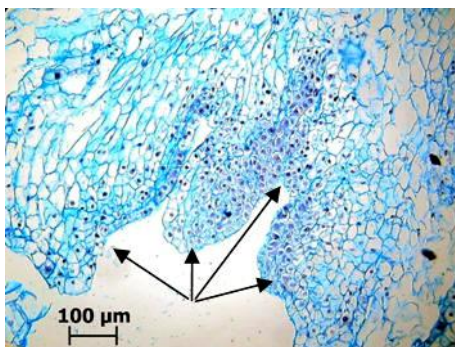


Рис. 5 Морфогенный каллус клематиса сорта Crystal Fountain с зонами меристематически активных клеток (указаны стрелками)

Вместе с тем отмечено образование многочисленных меристематических бугорков на периферических участках, в которых локализованы очаги меристематически активных клеток. Именно эти участки каллусных структур дают начало микропобегам и листовидным образованиям. Следовательно, вторичная тканевая цитодифференцировка каллусов клематиса сорта Crystal Fountain проходит в направлении непрямого органогенеза, в результате которого образуются микропобеги. Наряду с этим в каллусе отмечен процесс гистогенеза с образованием проводящих элементов.

На питательной среде, дополненной 3,0 мкМ ТДЗ, наблюдали формирование серо-зеленого оводненного неморфогенного каллуса. Наличие в среде 9,0 мкМ ТДЗ способствовало формированию плотного гладкого каллуса ярко зеленого цвета. Однако ни в первом, ни во втором случае регенерацию микропобегов клематиса сорта Crystal Fountain из каллуса не наблюдали.

Выводы

Таким образом, по результатам исследований представлены способы получения микропобегов клематиса сорта Crystal Fountain в условиях *in vitro*. Показано, что активная регенерация микропобегов из изолированных вегетативных почек путем

прямого органогенеза происходила на среде МС, дополненной 2,20-3,11 мкМ БАП. Удлинение микропобегов и спонтанный ризогенез отмечен на среде МС, содержащей 0,89 мкМ БАП. Регенерация микропобегов путем непрямого органогенеза осуществлялась на среде МС, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ. Проведенный гистологический анализ подтвердил, что вторичная тканевая цитодифференцировка каллусов клематиса сорта Crystal Fountain проходила в направлении непрямого органогенеза, в результате которого образуются адвентивные почки и микропобеги. Полученные микропобеги не имели морфологических отклонений и использовались для дальнейшего микроразмножения.

Благодарности

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. *Высоцкий В.А., Алексиев Л.В.* Клональное микроразмножение клематиса // Плодоводство и ягодоводство России. – 2006. Т. – 15. – С. 27 – 29.
4. *Жинкина Н.А., Воронова О.Н.* О методике окраски эмбриологических препаратов // Бот. журнал – 2000. – Т. 85, № 6. – С. 168 – 171.
5. *Иванова Н.Н.* Особенности регенерации растений интродуцированных сортов фиалки узамбарской (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) в условиях *in vitro* // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 128. – С. 59 – 66.
6. *Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В.* Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада «Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур». – 2014. – Т. 138. – С. 57 – 101.
7. *Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Зубкова Н.В.* Биотехнологические исследования клематиса // Матер. Всероссийской науч.-практич. конф. с междунар. участием «Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг» (Иркутск 26-28 апреля 2017 г.). – Иркутск, 2017. – С. 79 – 81.
8. *Митрофанова И.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
9. *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.
10. *Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Корзина Н.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Тевфик А.Ш., Пилипчук Т.И., Заяц А.Ю., Челомбит С.В., Мелихова Г.И.* Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза представителей семейств *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae* // Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада «Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур». – 2014. – Т. 138. – С. 102 – 136.
11. *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.
12. *Bhojwani S.S., Dantu P.K.* Plant Tissue Culture: An Introductory Text. New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2013. – 309 p.

13. Dodds J.H., Roberts L.W., Heslop-Harrison J. Experiments in Plant Tissue Culture. 3rd Ed. – UK: Cambridge University Press., 1995. – 272 p.
14. *Clematis on the Web* [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.clematis.hull.ac.uk/>
15. 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.
16. Mitrofanova I.V., Kuzmina T.N., Brailko V.A. Some histological and physiological features of meristemoids formation in canna lily (*Canna* × *hybrida hort.*) // *Acta Hort. (ISHS)*. – 2017. – P. 1167:63-68 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1167.9>
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. Vol.15, № 3. – P. 473 – 497.
18. 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, №. 1 – P. 81 – 91.

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Kuzmina T.N., Zubkova N.V. Realization of explants regenerative capacity in the clematis cultivar Crystal Fountain under *in vitro* conditions // *Works of the State Nikit. Botan. Gard.* – 2017. – V. 145 – P. 168-174.

The results of clematis cultivar Crystal Fountain regenerants obtaining under *in vitro* conditions via direct and indirect organogenesis are presented in the article. Some special developmental features of the initial clematis explants at the stage of shoot formation induction have been revealed. Concentrations of plant growth regulators in the medium, optimal for microshoot indirect regeneration from clematis callus, have been found. Histological analysis confirmed the formation of meristematic zones and adventitious buds in the callus. High regeneration capacity of the cultivar Crystal Fountain under *in vitro* conditions was demonstrated.

Key words: *Clematis* sp.; vegetative bud; induction; morphogenesis *in vitro*; microshoots regeneration.