

УДК 582.675.1:57.085.2

**РОЗВИТОК ЕКСПЛАНТІВ ЛОМИНОСУ (*CLEMATIS* L.)
НА ЕТАПІ ВВЕДЕННЯ ЗА УМОВ *IN VITRO***

Н. Корзіна, І. Митрофанова

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

У НБС-ННЦ продовжено дослідження можливості отримання асептичної культури первинних експлантів 13 сортів ломиносу (*Clematis* L.) різних садових груп. Підібрано режим стерилізації, що складається з послідовної обробки 70% розчином етанолу (1 хв), препаратом 0,3% «Дез Таб» (7–9 хв) і 1% Thimerosal (10 хв), та дає змогу знизити рівень контамінації первинних експлантів до 10–20%. Показано особливості розвитку та пагоноутворення експлантів залежно від типу, концентрації стерилізуючих речовин і термінів добору. Встановлено, що активно розвиваються в умовах *in vitro* експланти ломиносу, які було введено у фазу вегетації рослин (березень-квітень).

Ключові слова: ломиніс, мікропагін, стерилізація, експлант, *in vitro*.

Рід ломиніс (*Clematis* L.) належить до родини Жовтецевих (Ranunculaceae Juss) і налічує близько 300 видів. Ці рослини мають різне еколого-географічне походження, розповсюджені на території Євразії, Африки, Австралії, Нової Зеландії, Японії. Ломиноси широко відомі високою декоративністю, різноманітням форм квіток, тривалим цвітінням [1]. У Нікітському ботанічному саду перші рослини ломиносу було інтродуковано в 1813 році, а до 2009 року колекція налічувала 80 зразків сортів і форм, із яких 42 – сорти України, 32 – закордонної селекції та 16 природних видів і форм [4]. Багато рослин важко розмножуються традиційними методами. Сухі та спекотні умови Південного узбережжя Криму, високий інфекційний фон негативно впливають на ріст і розвиток ломиносів. Згідно з результатами обстежень колекційних ділянок НБС-ННЦ, 79,6% рослин мали зовнішні симптоми ураження вірусними, грибними і бактеріальними захворюваннями, зокрема, борошнистою россою [2, 9]. Поряд із цим, більшість рослин у колекції культивуються десятиріччями, що також значно обмежує їхнє розмноження.

Метод отримання рослин через культуру *in vitro* є альтернативним традиційному, оскільки дає змогу звільнити від екзогенної та ендогенної інфекції тканини рослин, одержати елітний безвірусний рослинний матеріал. У багатьох країнах саме таким шляхом розмножують різні квітково-декоративні культури, у тому числі й ломиніс [5, 10].

У НБС-ННЦ роботу з розмноження сортів ломиносу методами *in vitro* було розпочато у 90-х роках ХХ ст. Уперше для ломиносу на прикладі сортів вітчизняної та закордонної селекції було доведено можливість їхньої регенерації шляхом прямого і непрямого соматичного ембріогенезу [8, 10]. На цей час достатньо широко представлено біотехнологічні дослідження видів [11, 13, 15, 16] і найбільш поширених сортів ломиносу (наприклад, Multi Blue, President) [12, 14, 17–19, 22]. У Волгоградському ботанічному саду успішно розроблено метод клонального мікророзмноження низки сортів ломиносу [6]. В наших дослідженнях ми використовуємо рослини ломиносу різних садових груп, які об'єднує їхня

низька здатність до розмноження вегетативним шляхом з метою подальшого створення біотехнологічних систем соматичного ембріогенезу й органогенезу *in vitro*. Незважаючи на те, що самі етапи клонального мікророзмноження для більшості культур є однаковими (введення, розмноження, вкорінення й адаптація), в роботі з кожною культурою виникають свої складнощі, наприклад, експланти різних сортів однієї культури значно відрізняються за морфогенетичним потенціалом.

Метою цього етапу роботи було отримання асептичної культури і встановлення оптимальних строків введення експлантів ломиносу за умов *in vitro*, виявлення морфогенетичного потенціалу експлантів різних сортів ломиносу на етапі введення.

Матеріали та методи

Роботу виконано на базі лабораторії біохімії, біотехнології та вірусології рослин НБС-ННЦ у 2011–2012 роках. Для досліджень були відібрані сорти, які в умовах Південного узбережжя Криму важко розмножуються вегетативним шляхом: Ville de Lyon, Madam le Coultre, Юність, Альоша, Mrs Cholmondeley, Dr. Ruppel, Nelly Moser, Multi Blue, Лютер Бербанк, Asao, Sunset. Як модельні сорти, котрі успішно розмножуються традиційними методами, було залучено 2 сорти: Альонушка і Ювілейний-70. У досліджах були використані рослини життєвих форм: виткий напівчагарник (Альонушка) і основна частина сортів – чагарникові ліани.

Вихідними експлантами були пагони з вегетативними бруньками, які відбирали протягом усього року, за винятком місяців активного цвітіння рослин. Для стерилізації первинних експлантів використовували 70–96% етанол, 0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,45% (концентрація за активним хлором) розчини препарату «Дез Таб» (43,0%-трихлорізоціанурова кислота; 20,0%-натрієва сіль дихлорізоціанурованої кислоти) (ТОВ Медпромінвест, Україна), 3–5% розчин комерційного препарату Domestos (гіпохлорит натрію) та 1–2% розчин Thimerosal (Merk, USA). Експозицію обробки стерилізуючим агентом встановлювали дослідним шляхом залежно від типу первинних експлантів і термінів їхнього відбору. У кожному досліді використано по 50–100 експлантів (по 5–10 шт. кожного сорту).

При проведенні досліджень використовували загальноприйняті методи [3, 5] і розроблені у НБС-ННЦ [7]. Роботу з введення експлантів в умови *in vitro* та субкультивування виконували в ламінарному боксі Fatran Lf (Чехія). Експланти ломиносу культивували на модифікованих нами поживних середовищах Clem і Cm [20]. За основу обох середовищ було взято поживне середовище Мурасіге і Скуга [21], що містить 2–3% сахарози, 1,0–1,1% агару, рН середовища доводили до 5,6–5,7.

Експланти і мікропагони ломиносу у пробірках, колбах або банках розміщували в культуральному приміщенні зі встановленою температурою $24 \pm 1^\circ\text{C}$ і 16-годинним фотоперіодом. Субкультивування здійснювали через 20–40 діб.

Результати і їхнє обговорення

Вихідні експланти, залежно від ступеня їхнього забруднення, протирали марлевою серветкою, змоченою у 70%-ному етанолі. У наших досліджах передчасне замочування, витримування під проточною водою або обробка мильним розчином пагонів ломиносу не були успішними, тому що вже у першу добу після введення спостерігали масову появу бактеріальної інфекції у 57,7–70,6% експлантів. Без попереднього замочування й обробки мильним розчином інфікування проявлялося протягом 28 діб, і його частота не перевищувала 30–40% (в середньому по сортах).

Ступенева стерилізація експлантів відбувалась у кілька етапів (обробка етиловим спиртом і промивання дистильованою водою були невід'ємною частиною кожного режиму) і представлена у табл. 1.

Для отримання асептичної культури первинних експлантів було випробувано 14 режимів стерилізації (рис. 1) із розчинами хлорвмісних препаратів як головного стерилізуючого агента, адже саме хлор як діючу речовину найчастіше використовують для зменшення рівня контамінації експлантів різних садових культур [10]. Результати стерилізації, представлені у діаграмі, були узагальнені для експлантів усіх сортів.

Таблиця 1

Схема етапів стерилізації експлантів ломиносу

Етап стерилізації	Антисептик	Концентрація	Експозиція
1	Етиловий спирт	70–96%	0,5–1 хв
2	Дез Таб	0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,45%	7–24 хв
	або		
	Domestos	3–5%	7–15 хв
3	Чотириразове промивання дистильованою водою		10–15 хв
4	Thimerosal	1–2%	10–15 хв
5	Триразове промивання дистильованою водою		

Обробка первинних експлантів ломиносу 5% розчином Domestos виявилася не досить вдалою, незважаючи на низький рівень контамінації (менш ніж 10%) усі експланти протягом 14–28 днів поступово темнішали і не розвивалися, зокрема експланти поодиноких бруньок (вар. № 2). Спільне використання 3% Domestos (14 хв) і 1% Thimerosal (10 хв) дало змогу знизити рівень ушкодження вегетативних бруньок, але кількість інфікованих експлантів зросла до 32,7%, і розвиток бруньок у мікропагони не відбувався (рис. 1, вар. № 10).

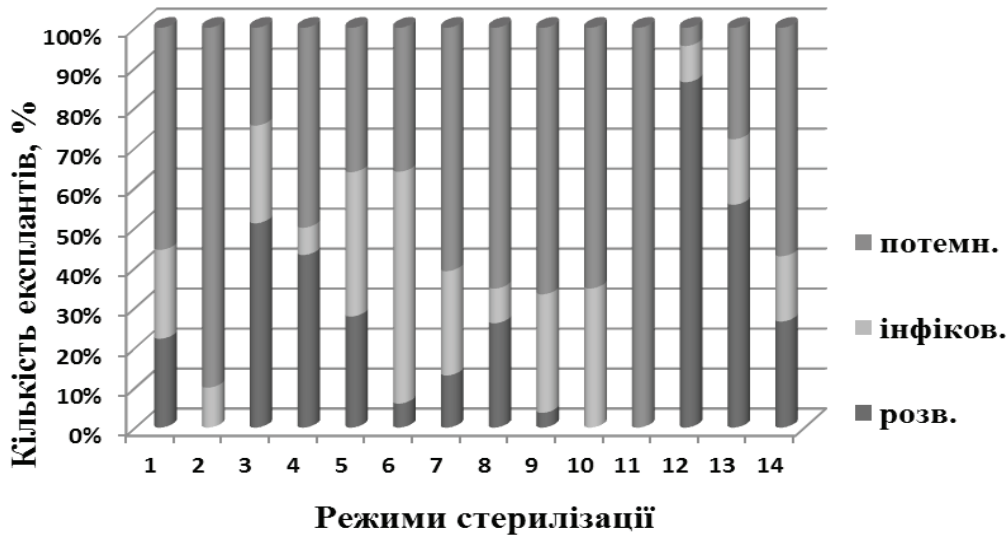


Рис. 1. Результати стерилізації експлантів ломиносу. Режими стерилізації: 1) 0,3% Дез Таб (10 хв); 2) 3 % Domestos (10 хв); 3) 0,45% Дез Таб (8 хв); 4) 1% Thimerosal (2 хв) → 0,4% Дез Таб (7 хв); 5) 0,4% Дез Таб (7 хв); 6) мильний розчин (10 хв) → 0,3% Дез Таб (8 хв); 7) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,3% Дез Таб (14 хв); 8) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,3% Дез Таб (24 хв); 9) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,2% Дез Таб (20 хв); 10) 3% Domestos (14 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 11) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,15% Дез Таб (18 хв); 12) 0,3% Дез Таб (7 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 13) 0,3% Дез Таб (8,5 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 14) 0,3% Дез Таб (10 хв) → 1% Thimerosal (15 хв).

Можливо, це спричинено недостатньою ефективністю препарату у використаній концентрації та експозиції. Крім того, у 80,0% випадків спостерігали затемнення поживного середовища через виділення експлантами фенолів. Саме тому із подальших дослідів Domestos було вилучено.

Загалом, вплив кожного з антисептиків на експланти був різним. Розчини «Дез Таб» чинили більш м'який ефект на рослинні тканини порівняно з розчинами Domestos, тому в подальших дослідях комбінували два препарати: «Дез Таб» і Thimerosal у різних експозиціях. Особливо чутливими до будь-якого стерилізуючого агента виявилися експланти сортів Mrs Cholmondeley, Ville de Lyon, Sunset, які практично повністю темнішали. Крім того, у експлантів сортів Dr. Ruppel, Лютер Бербанк через 30 діб оводнювалися бруньки, пагони сорту Nelly Moser і Multi Blue світлішали та ставали хлоротичними.

З метою зниження кількості ушкоджених експлантів було виконано досліди на зменшення концентрації антисептиків і збільшення експозиції, однак очікуваних результатів не отримано. Зокрема, при використанні 0,2% розчину «Дез Таб» з експозицією 20 хв і Thimerosal – 10 хв через добу після введення у експланти спостерігали значне затемнення поживного середовища через виділення експлантами фенолів (рис. 2). Частота контамінації ломиносу була 27,8% (вар. № 9), вільні від інфекції експланти протягом наступних 30–60 діб культивування не розвивалися. Після спільної стерилізації 0,3% розчинами «Дез Таб» і 1% розчином Thimerosal (8–10 хв) у експлантів сортів Madam le Coultre, Sunset, Multi Blue, Лютер Бербанк через 5–15 діб починала розростатися базальна частина сегментів пагону. Виділення фенолів у поживне середовище не відбувалося, за винятком поодиноких експлантів окремих сортів (рис. 3).

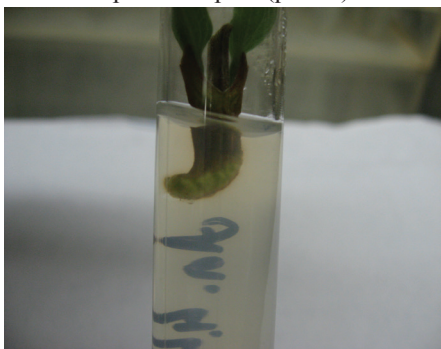


Рис. 2. Розростання базальної частини мікропагона ломиносу через 9 діб.



Рис. 3. Експланти ломиносу, введені за умов *in vitro* (через 1 добу).

У результаті проведених досліджень було підібрано режим стерилізації для усіх сортів, який полягає у послідовній обробці сегментів пагонів розчином етанолу, розчином «Дез Таб» у концентрації 0,3% з подальшим зануренням експлантів у 1% Thimerosal (вар. 12). Необхідно відзначити, що експозиції препаратів слід збільшувати на 1–5 хв залежно від рівня забруднення рослин-донорів, погодних умов і строків відбору рослинних об'єктів.

Експланти вводили у стерильні умови в період з 2011 по 2012 роки у січні та щомісяця у квітні-грудні. Було встановлено, що експланти усіх досліджуваних сортів успішно розвивалися при введенні в стерильні умови у фазу активної вегетації рослин (у 2012 році – у квітні) (рис. 4). Протягом 1–3 діб у всіх сортів починали розгортатися листки бруньок. Через 5–9 діб культивування листя було повністю розвинене і починала розростатися базальна частина, на якій формувалися глобулярні структури світло-зеленого кольору.

Із бруньок, що містилися на сегментах пагонів, введених за умов *in vitro* в період бутонізації та в першу хвилю цвітіння рослин, листя розвивалося протягом кількох тижнів. Експланти сортів Лютер Бербанк, Альоша, Ville de Lyon, відібрані влітку (червень), у перші 14 діб культивування розвивалися значно швидше, порівняно з тими, що вводили навесні (травень). Однак у наступних пасажах відзначали уповільнення процесів морфогенезу: нове листя і апекс не розвивалися, видовження пагонів не відбувалося. Разом із цим, у експлантів зазначених сортів, введених у квітні, в цей період пагони мали від 2 до 5 міжвузль (рис. 5).



Рис. 4. Первинні експланти ломиносу сорту Ювілейний-70, що введені за умов *in vitro* у квітні.



Рис. 5. Активний розвиток мікропагонів сорту Альонушка з експлантів, що введені в культуру *in vitro* у фазу вегетації рослин.

Сегменти з бруньками, які було поміщено на поживне середовище у серпні-вересні, незначно збільшувалися у розмірах і довгий час не змінювали кольору. Протягом 2–4 наступних субкультивувань візуальних морфологічних змін не відбувалося, однак поступово від 33 до 90% експлантів сортів Dr. Ruppel, Madam le Coultre, Nelly Moser, Multi Blue, Лютер Бербанк, Asao, Sunset повністю темнішали і не розвивалися. Крім того, набрякання бруньок, збільшення їх у розмірах відбувалося значно пізніше порівняно з експлантами, введеними в інші місяці. Наприклад, у вересні перші ознаки розвитку спостерігали через 5–19 діб після введення: Dr. Ruppel – 5 діб, Mrs Cholmondeley – 14–16 діб, Ville de Lyon – 16–18 діб, Лютер Бербанк – 18–19 діб. Поряд із цим кількість розвинутих бруньок варіювала від 1 до 4 шт. на експлант (рис. 6). Узагалі, цей період є малорезультативним для введення ломиносу в культуру *in vitro*.

Необхідно відзначити вплив сортових особливостей на регенерацію *in vitro* мікропагонів ломиносу. При вивченні взаємозв'язку між строками введення і життєздатністю експлантів було встановлено, що сорти Sunset, Dr. Ruppel, Лютер Бербанк, Asao, Ювілейний-70 мали низьку здатність до регенерації за умов *in vitro* порівняно з експлантами інших сортів. Це проявлялось у більш тривалому за часом процесі регенерації: бруньки набрякли і розкривалися у строк, коли у експлантів інших сортів уже розгорнулося листя, і мікропагони подовжилися на 1–2 міжвузля. Серед вивчених сортів протягом усього періоду досліджень високим морфогенетичним потенціалом відрізнявся сорт Альонушка,

у якого, залежно від строків добору, кількість життєздатних експлантів варіювала від 66,7 до 100%. Сорт Ювілейний-70, який разом із Альонушкою був вибраний як модельний, не показав таких результатів. Експланти розвивалися протягом 50–90 діб, але через два субкультування міжвузля не подовжувались, апекси і базальна частина сегментів повністю темнішали.



Рис. 6. Відмінності у кількості розвинутих бруньок: а) сорт Юність – 1 розвинена брунька; б) сорт Nelly Moser – 4 розвинених бруньки.

Таким чином, нами розроблено режим стерилізації експлантів різних сортів ломиносу, що складається з послідовної обробки 70% розчином етанолу (1 хв), 0,3% препаратом «Дез Таб» (7–9 хв) і 1% Thimerosal (10 хв), який дав змогу знизити рівень контамінації до 10–20%. При необхідності введення здерев'янілих експлантів експозицію хлорвмісного розчину слід збільшити на 4–6 хв залежно від ступеня забруднення рослинного матеріалу. Встановлено вплив строків добору експлантів на регенерацію мікропагонів за умов *in vitro*: активно розвиваються експланти, які введено у фазу вегетації рослин-донорів (березень–квітень).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бескаравайная М. А.* Клематисы. М.: Росагропромиздат, 1991. 189 с.
2. *Бескаравайная М. А., Митрофанова О. В.* Грибные болезни клематисов // Цветоводство. 1972. № 7. С. 21.
3. *Бутенко Р. Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М: Наука, 1964. 272 с.
4. *Зубкова Н. В.* Коллекция клематиса Никитского ботанического сада: Тезисы Международ. науч. конф., посвящ. 200-летию Ч. Дарвина и 200-летию Никитского бот. сада (3–6 ноября 2009 г.). Ялта, 2009. С. 27.
5. *Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К: Наук. думка, 1980. 488 с.
6. *Коротков О. О., Короткова О. И.* Сохранение коллекции клематисов (*Clematis* L.) в культуре *in vitro* // Сб. статей по материалам III Всерос. науч.-практ. конф. / ГУ Волгоградский региональный ботанический сад. Волгоград, 2012. С. 145–152.
7. *Митрофанова О. В., Михайлов А. П., Чехов А. В.* Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Сб. науч. трудов Никитского бот. сада. Ялта, 1997. Т. 119. С. 7–34.
8. *Митрофанова И. В., Соколов О. И., Ежов В. Н.* Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (*Clematis* sp.) // Сб. науч. трудов Никитского бот. сада. Ялта, 2007. Т. 127. С. 9–20.

9. Митрофанова І. В., Митрофанова О. В., Ежов В. Н. и др. Выявление фитопатогенов в садово-парковых агроценозах и биотехнологические пути оздоровления вегетативно размножаемых декоративных и плодовых культур // Материалы междунар. конф., посвящ. 80-летию Центрального бот. сада НАН Беларуси. Минск, 2012. II часть. С. 423–427.
10. Митрофанова І. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрна наука, 2011. 344 с.
11. Dabski M., Parzymies M. Wplyw cytokinin na namnazanie powojnika calolistnego (*Clematis integrifolia* L.) *in vitro* // Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 2006. Vol. 510. P. 119–125.
12. Erwin J. E., Schwarze D., Donahue R. Factors affecting propagation of *Clematis* by stem cutting // HortTechnology. 1997. Vol. 7. N 4. P. 408–410.
13. Gabryszewska E., Kawa-Miszczak L., Wegrzynowicz-Lesiak E., Saniewski M. Zesz. Effect of temperature and various levels of C and N in the medium on the growth and development of *Clematis pitcheri in vitro* // Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 2008. Vol. 524. P. 73–81.
14. Guan-Kai Y., Li-Zhi J., Li-Jing X., Kuan-Jian A preliminary study on the introduction and cultivation of *Clematis* // Acta Botanica Yunnanica. 2002. Vol. 24. N 3. P. 392–396.
15. Hlebionek G. Rozmnazanie powojnika gorskiego (*Clematis montana* «Rubens») za pomocą sadzonek pedowych: materialy z ogólnopolskiej konferencji “Postep w rozmnazaniu roślin ozdobnych”. Kraków, 16–17 wrzesnia 1994, AR im Huggona Kollataja. S. 77–81.
16. Kawa-Miszczak L., Wegrzynowicz-Lesiak E., Gabryszewska E., Saniewski M. Effect of different sucrose and nitrogen levels in the medium on chlorophyll and anthocyanin content in *Clematis pitcheri* shoots cultured *in vitro* at different temperatures // J. Fruit and Ornamental Plant Research. 2009. Vol. 17. N 1. P. 113–121.
17. Kreen S., Svensson M., Rumpunen K. Rooting of clematis microshoots add stem cutting in different substrates // Sci. Hort. 2002. Vol. 96. P. 351–357.
18. Lees R. P., Evans E. H., Nicholas J. R. Photosynthesis in *Clematis* «President», during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization // J. Ext. Bot. 1991. Vol. 42. P. 605–610.
19. Lees R. P., Evans E. H., Brown R. G. A study of the chlorophyll fluorescence from mature and micropropagated *Clematis* by time-resolved spectroscopy // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 1991. Vol. 8. P. 307–313.
20. Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis in vitro* // Propagation of Ornamental Plants. Sofia: SEEK and SHARE: Balkanpress. 2000. P. 70–75.
21. 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.
22. Qi Xiang Zhang, Heng Kang Hu, Ai xia Wang, Yan Ming Fang. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis* «Multi-Blue» // Propagation of Ornamental Plants. 2011. Vol. 11. N 1. P. 21–27.

Стаття: надійшла до редакції 13.03.13

доопрацьована 27.08.13

прийнята до друку 13.09.13

DEVELOPMENT OF *CLEMATIS* (*CLEMATIS* L.) EXPLANTS DURING THE STAGE OF INTRODUCTION IN CONDITIONS *IN VITRO***N. Korzina, I. Mitrofanova**

*Nikitsky Botanical Gardens
National Scientific Centre, NAAS of Ukraine
98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita
e-mail: in vitro@ukr.net*

In Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre the investigation with aseptic culture obtaining of primary explants in 13 cultivars of different clematis (*Clematis* L.) garden groups have been continued. The sterilization conditions by 70% solution alcohol (1 min), 0,3% Dez Tab (7–9 min) and 1% Thimerosal (10 min) have been found, which decrease the contamination level of explants till 10 to 20%. The peculiarities of shoot development, depending on the time of selection, the type and concentration of the sterilizing agents have been shown. It was established, that clematis explants have active growth *in vitro* during their introduction on the stage of plant vegetation (March-April).

Keywords: clematis, microshoot, sterilization, explant, *in vitro*.

РАЗВИТИЕ ЭКСПЛАНТОВ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS* L.) НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯ *IN VITRO***Н. Корзина, И. Митрофанова**

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

В НБС-ННЦ продолжены исследования по получению асептической культуры первичных эксплантов 13 сортов клематиса (*Clematis* L.) разных садовых групп. Подобран режим стерилизации, который состоит из последовательной обработки 70% раствором этанола (1 мин), препаратом 0,3% «Дез Таб» (7–9 мин) и 1% Thimerosal (10 мин), которые позволили снизить уровень контаминации первичных эксплантов до 10–20%. Показаны особенности развития и побегообразования эксплантов в зависимости от типа, концентрации стерилизующих веществ и сроков отбора. Установлено, что активно развиваются в условиях *in vitro* экспланты клематиса, которые были введены в фазу вегетации растений (март-апрель).

Ключевые слова: клематис, микропобег, стерилизация, эксплант, *in vitro*.