

РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CLEMATIS* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

Наведено результати досліджень регенераційної здатності представників роду *Clematis* L., культивованих *in vitro*. Із експлантів двох генотипів роду *Clematis*: *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' отримано адвентивні пагони, придатні для досягнення ризогенезу. З'ясовано, що морфогенез експлантів залежить від вмісту у живильних середовищах фітогормонів як ауксинової так і цитокінінової груп.

Вступ

Рід *Clematis* L., який належить до родини жовтецевих — *Ranunculaceae* Juss. налічує близько 300 видів. Ці рослини мають різне еколого-географічне походження і поширені на території Євразії, Африки, Австралії, Нової Зеландії, Японії. Шість видів із них поширені в Україні і трапляються серед чагарників, на галявинах та кам'яних схилах у Криму і зрідка на Закарпатті [1, 6, 7].

За життєвими формами види роду *Clematis* надзвичайно різноманітні. Рід об'єднує рослини з деревоподібними виткими пагонами завдовжки до 1,5–10 м, деревоподібні кущі з прямими пагонами заввишки до 1,5 м, трав'янисті багаторічні рослини з прямими пагонами до 0,4–1,5 м.

Рослини роду *Clematis* — красиво і рясно квітучі ліани, які безперервно цвітуть з червня до кінця жовтня білими, жовтими, рожевими, малиново-червоними, блакитними, фіолетовими і майже чорними квітками. Багато видів мають низку цінних сортів з високими декоративними властивостями, які різняться за життєвою формою, забарвленням квіток, тривалістю цвітіння тощо [3, 7]. Залежно від величини квітки рослини поділяють на дрібноквіткові (до 5 см в діаметрі) і великоквіткові (більше 5 см в діаметрі). Завдяки цьому, вони є цінним декоративним матеріалом для вертикального озеленення. Особливої уваги заслуговують сортові клематиси, і зокрема малопоширені або ті, що представлені лише поодинокими екземплярами.

Варто зазначити, що *Clematis* має високі не тільки декоративні але й фармакологічні властивості.

У народній медицині рослини відомі як потогінні, діуретичні та гіпотензивні засоби. Експериментальні дані свідчать про бактерицидні й фунгіцидні властивості листків і квіток. Як лікарську рослину *Clematis* широко використовують у традиційній китайській медицині.

Морфологічна різноманітність рослин, висока декоративність, фармакологічні властивості спричинюють їх актуальність та неабияку перспективність практичного використання, зокрема у зеленому будівництві України.

На жаль, ці чудові рослини ще недостатньо вивчені і порівняно мало розповсюджені в нашій країні [7]. Основними чинниками, що стримують широке їх впровадження є недостатнє вивчення особливостей розмноження цих рослин.

Для видів роду *Clematis* придатним є насіннєве розмноження, але для збереження генетичної однорідності декоративних садових форм необхідне використання лише вегетативного розмноження (повітряними відводками, відсадками, поділом куща тощо). Такий спосіб є досить сповільненим і не дає можливості одержання великої кількості садивного матеріалу. Тому актуальним є пошук нових, більш ефективних методів розмноження представників роду *Clematis*. Працями багатьох дослідників доведено, що одним із способів масової регенерації рослин, що відбуваються при дії фітогормонів та отримання масового садивного матеріалу, який останнім часом набув помітного поширення в біологічних дослідженнях, є використання стерильної культури рослинних клітин, тканин і органів, основою яких

є процеси морфогенезу в регульованих умовах *in vitro* [2, 4, 9].

Мета роботи — з'ясувати регенераційну здатність представників роду *Clematis in vitro* при дії фітогормонів, що входять до складу живильних середовищ.

Матеріали та методика досліджень

Під час експерименту використано метод мікроклонального розмноження рослин у культурі *in vitro*, який базується на культурі рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*. [1, 5, 9, 12]. Матеріалом для досліджень слугували мікропагони завдовжки 0,8–1,5 см одержані з трьохрічних рослин двох генотипів — *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa', які ростуть на колекційній ділянці витких рослин НДП «Софіївка» НАН України. Укорінені живці цих рослин одержали з ботанічного саду Уфимського національного університету Башкирії. Час введення рослинного матеріалу у культуру *in vitro* — друга декада травня. В цей час розпочинається фаза інтенсивного росту рослин і вони є найбільш придатними для введення в культуру *in vitro* [8, 11]. Процес розмноження експлантів *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' у культурі *in vitro* розпочинали з вивільнення рослинного матеріалу від патогенної флори за використання хімічних реагентів. Асептичні культури отримували за використання 2,5% гіпохлориту натрію (NaClO), 0,1% дихлориду ртуті (HgCl₂), 1% нітрату срібла (AgNO₃), 70% розчину етанолу та препарату «Биомой» — багатокомпонентного, біоактивного миючого засобу з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005–96). Найбільший відсоток стерильних, життєздатних експлантів отримали при послідовній обробці: 10% препаратом «Биомой» (15 хв.), 70% етанолом (30 сек.) та HgCl₂ (2 хв.). Для більш ефективної дії до реагенту додавали емульгатор «Твін 80». Базовим

слугувало живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [12]. Для активації у експлантів регенераційних процесів, живильні середовища модифікували додаванням 6-бензиламінопурину (6-БАП), β-індолилмасляної кислоти (β-ІМК) та гіберелової кислоти (ГК₃) у різних концентраціях. Додатково до середовища додавали сахарозу 30 г/л, агар-агар 7 г/л. рН середовища становила 5,6–5,8.

Дослід закладено у трьохразовому повторенні. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували згідно методик з розмноження рослин *in vitro* [2, 4, 9]. Висаджені експланти культивували у культуральній кімнаті з кондиціонованим повітрям на скляних стелажах при температурі 25±1 °С, відносній вологості 70%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3–5 тис. люкс. Дослідження проведено у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендропарку «Софіївка» НАН України.

Результати досліджень та їх обговорення

Одним із методів розмноження *in vitro* є пряма регенерація бруньок безпосередньо тканинами експланта. В основу його покладено здатність ізольованих частин рослини за сприятливих умов культивування відновлювати втрачені органи та регенерувати цілі рослини.

Необхідною умовою успішного вирощування рослин у культурі *in vitro* є живильне середовище, що містить збалансований склад мікро- та макроелементів, вуглеводів, вітамінів, амінокислот, зокрема фітогормонів. Оскільки диференціація органів у експлантів може відбуватись у присутності певних поєднань фітогормонів, то згідно одержаних нами експериментальних даних було з'ясовано, що на регуляцію регенераційних процесів у експлантів *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' суттєвий вплив мало їх співвідношення у живильних середовищах (табл. 1).

1. Залежність пагоноутворення сортів клематиса від фітогормонального складу живильних середовищ

№ середовища	Фітогормони, мг/л			<i>C. viticella</i> 'Ernest Markhem'		<i>C. integrifolia</i> 'Sizaia Ptitsa'	
	6-БАП	β-ІМК	ГК ₃	Кількість утворених пагонів, шт.	Довжина пагонів, см	Кількість утворених пагонів, шт.	Довжина пагонів, см
I	0,5	0,01	—	1,83±0,06	1,24±0,15	1,26±0,08	1,77±0,16
II	0,5	0,08	0,05	2,67±0,08	1,67±0,08	3,13 ±0,28	1,23±0,11

1	2	3	4	5	6	7	8
III	1,0	—	—	4,66±0,18	2,11±0,36	3,82±0,46	3,23±0,18
IV	1,0	0,01	—	6,72±0,29	2,72±0,28	5,73±0,29	2,50±0,19
V	1,0	0,08	0,05	3,67±0,19	2,37±0,41	2,36±0,19	2,34±0,47
VI	2,0	—	—	1,12±0,08	1,32±0,17	1,22±0,14	1,14±0,08

Одержані в результаті стерилізації, асептичні культури висаджували на живильні середовища

модифіковані різними концентраціями фітогормонів (рис. 1).



Рис. 1. Початок морфогенезу у експлантів *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' за різної концентрації фітогормонів

Відомо, що впродовж всього життя рослина зберігає здатність до регенерації тобто має в собі частини меристемних тканин, яким властиво давати початок організованим структурам — брунькам, пагонам, кореням, ембріодам з подальшим формуванням повноцінних рослин [11]. У практиці мікроклонального розмноження відомо два види морфогенезу: прямий — утворення рослин-регенерантів із експлантів шляхом активації меристем та непрямий — утворення рослин-регенерантів із первинного чи субкультивованого калюсу.

У наших дослідженнях впродовж 22–28 діб після висаджування експлантів на живильні середовища у всіх варіантах спостерігали різної інтенсивності формування адвентивних бруньок, які набували зеленого забарвлення та збільшувалися в розмірах. Це слугувало початком прямого морфогенезу при якому шляхом активації меристемних тканин, з бруньок

починали формування додаткові пагони, які в окремих варіантах вирізнялися інтенсивним ростом та наростанням листкової маси (рис. 2).

Оцінювання ефективності регенерації проводили під час другого пасажування через 40–45 діб після введення експлантів у культуру *in vitro*. Морфогенний потенціал у експлантів двох досліджуваних генотипів рослин залежав від наявності у живильних середовищах певних концентрацій фітогормонів.

Найбільш результативні дані одержали у варіанті IV на середовищі з вмістом 6-БАП — 1,0 мг/л та β -ІМК — 0,01 мг/л де було утворено у *C. viticella* 'Ernest Markhem' — 6,72±0,29 шт. пагонів завдовжки 2,72±0,28 см. У *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' ці показники були дещо меншими і відповідно становили — 5,73±0,29 шт. та 2,50±0,19 см. У решти варіантах ці показники були значно меншими.



Рис. 2. Морфогенез експлантів *C. viticella* 'Ernest Markhem' *in vitro*

Різна інтенсивність процесів регенерації пагонів експлантами зумовлена дією різних концентрацій фітогормонів як ауксинової так і цитокинінової груп. Після 2–3 пасажів у різних варіантах досліджень формувалися групи рослин з 2–5 пагонами. Тривалість пасажу в середньому складала 26–32 доби і залежала від умов культивування, темпу розмноження, характеру розвитку експланта. Одержані таким чином експланти були придатними до перенесення на середовище для досягнення ризогенезу.

Висновок

Одержані результати свідчать, що активність регенераційних процесів у експлантів *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' значною мірою залежить від наявності у живильних середовищах певних співвідношень ауксинів та цитокинінів. Високі показники пагоноутворення одержали

у експлантів культивованих на живильному середовищі IV коли до середовища додавали 6-БАП 1,0 мг/л та β -ІМК 0,01 мг/л. Було утворено у *C. viticella* 'Ernest Markhem' — $6,72 \pm 0,29$ шт. пагонів завдовжки $2,72 \pm 0,28$ см, у *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' ці показники були дещо меншими і відповідно становили — $5,73 \pm 0,29$ шт. та $2,50 \pm 0,19$ см.

Розроблена технологія розмноження *in vitro* рослин *C. viticella* 'Ernest Markhem' та *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' дає можливість прискореного одержання садивного матеріалу необхідного для використання у зеленому будівництві України.

Перелік посилань

1. Бескоровайна М.А. Клематиси / М.А. Бескоровайна. — М.: Росагропромиздат, 1991. — 189 с.
2. Биотехнология растений: культура клеток/ Пер.

с англ. В. И. Негрука; С предисл. Р. Р. Бутенко. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.

3. *Зубкова Н. В.* Коллекция клематиса Никитского ботанического сада: тезисы Межд. науч. конф., посвящ. 200-летию Ч. Дарвина и 200-летию Никитского бот. сада (3–6 ноября 2009 г.). — Ялта, 2009. — С. 27.
4. *Калинин Ф. Л.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. — К.: Наук. думка, 1980. — 488 с.
5. *Колдар Л. А.* Особливості онтогенезу рослин *Cercis siliquastrum* L. культивованих *in vitro* / Л. А. Колдар // Автохтонні та інтродуковані рослини. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 23–26.
6. *Корзіна Н.* Розвиток експлантів ломиносу (*Clematis* L.) на етапі введення за умов *in vitro* / Н. Козіна, І. Митрофанова // Вісник Львівського університету; Сер.: Біологічна. — 2014. — Вип. 64. — С. 67–74.
7. *Кохно М. А.* Теоретические основы и опыт интродукции древесных растений на Украине / М. А. Кохно, А. М. Курдюк. К.: Наук. думка, 1994. — 188 с.
8. *Клоконос Н. П.* Клональное микроразмножение ежевики и жимолости и перспективы его использования в Казахстане / Садоводство и виноградарство. — 2004. — № 4. — С. 14–16.
9. *Кунах В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
10. *Лаврентьева А. М.* Використання біотехнологічних методів розмноження декоративних інтродуцентів / А. М. Лаврентьева // Вісник Львівського університету; Сер.: Біологічна. — 2004. — Вип. 36. — С. 137–145.
11. *Медведева Т. В.* Мікроклональне розмноження ожини канадської і перспективи її промислового культивування / Т. В. Медведева, О. В. Сидоренко, В. М. Удовиченко, О. В. Булко, А. П. Галкін // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — Т. 39. — № 2. — С. 144–150.
12. *Червченко Т. М.* Орхидеи в культуре. / Т. М. Червченко, Г. А. Кушнір. — К.: Наук. думка, 1986. — 200 с.
13. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* / T. Murashige, F. Skoog — 1962. — Vol. 15, № 13. — P. 473–497.

Рекомендувала до друку Куземко А. А.

Л. А. Колдар, М. В. Небыков, Н. А. Гончар
Национальный дендропарк «Софиевка» НАН Украины

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CLEMATIS* L. ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO*

Приведены результаты исследований регенерационной способности представителей рода *Clematis* L. культивируемых *in vitro*. Из эксплантов двух генотипов *Clematis*: *C. viticella* 'Ernest Markhem' и *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa' получены адвентивные побеги придатные для ризогенеза. Установлено, что морфогенез эксплантов зависит от содержания у питательных средах фитогормонов как ауксиновой так и цитокининовой групп.

L. A. Koldar, M. V. Nebykov, N. O. Honchar
National dendrological park "Sofiyivka" of NAS of Ukraine

REGENERATION PENETRABILITY OF THE REPRESENTATIVES OF GENUS *CLEMATIS* L. *IN VITRO*

The investigation results as for the regeneration penetrability of the representatives of genus *Clematis* L. cultivated *in vitro* are given. We've got the adventive shoots suitable for obtaining the ryzogenezis from the explants of two genotypes of the genus *Clematis*: *C. viticella* 'Ernest Markhem' and *C. integrifolia* 'Sizaia Ptitsa'. It was explicated that the contents of phyto-hormones of auxin and cytokinins groups in the nutrient medium effect on to the morphogenesis of explants.