

УДК 582.675.1:57.085.2

*Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова, Н.В. Зубкова***ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНИНА НА ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ КЛЕМАТИСА  
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*<sup>1</sup>**

Представлены результаты исследования влияния цитокининов: 6-бензиламинопурина (БАП), тидиазурона (ТДЗ) и кинетина в питательной среде на адвентивное побегообразование клематиса в культуре *in vitro*. В исследовании были включены сорта клематиса Альпинист, Никитский Розовый, Бал Цветов, Crystal Fountain и Madame Julia Correvon, произрастающие в коллекционных насаждениях НБС-ННЦ. В качестве эксплантов использовали верхушки и сегменты микропобегов, культивируемых в условиях *in vitro*, длиной 1 см с узлом. Экспланты помещали на базовую среду МС, дополненную регуляторами роста: БАП (2,20; 4,40 и 8,90 мкМ), ТДЗ (3,0; 6,0 и 9,0 мкМ) и кинетином (4,60; 11,62 и 23,20 мкМ). В качестве контроля использовали среду МС без цитокинина. Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с регулируемыми условиями: 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения  $37,5 \text{ мкм м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  и температурой  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Выявлены особенности развития сегментов побега изучаемых сортов клематиса на этапе собственно микроразмножения в условия *in vitro* в зависимости от типа и концентрации цитокинина. Установлено, что максимальное число адвентивных микропобегов без морфологических отклонений формировалось на средах, дополненных БАП и ТДЗ. В присутствии кинетина часть микропобегов имела ряд морфологических изменений. Полученные побеги были непригодны для дальнейшего микроразмножения. Высоким морфогенетическим потенциалом в культуре *in vitro* обладали экспланты сортов Альпинист и Crystal Fountain.

*Ключевые слова:* *Clematis L.*, культура *in vitro*, эксплант, адвентивные микропобеги.

Род клематис (*Clematis L.*) – один из наиболее распространенных родов семейства лютиковых (*Ranunculaceae Yuss.*), объединяющий около 300 видов и свыше 3000 культурных сортов [1]. Высокая декоративность, многообразие сортов и несложность выращивания позволяют представителям рода *Clematis L.* занимать лидирующие позиции в мировой практике зеленого строительства. В последнее время все большую популярность клематисы приобретают и в России. В ФГБУН «НБС-ННЦ» на базе созданной коллекции, с целью отбора перспективного сортимента клематисов для декоративного садоводства региона, ведется работа по сортоизучению и сортооценке, которая включает и их способность к вегетативному размножению [2; 3]. Однако традиционное вегетативное размножение (черенкование, отводки и др.) позволяет получить ограниченное количество посадочного материала, что препятствует широкому распространению культуры [4]. Применение клонального микроразмножения дает возможность значительно ускорить получение растений, оздоровить от вирусов и получить материал для последующего размножения и закладки безвирусных питомников [5-7]. В публикациях последних лет представлены способы получения регенерантов клематиса через соматический эмбриогенез, культуру каллуса и с помощью меристематических тканей экспланта [8-10]. Клональное микроразмножение с помощью меристематических тканей эксплантов позволяет получить однородный, идентичный материнскому растению растительный материал. Значительное влияние на развитие эксплантов в культуре *in vitro* оказывают регуляторы роста растений. Добавление в питательную среду цитокининов позволяет увеличить количество образовавшихся адвентивных микропобегов. Чаще всего в питательной среде используют БАП, кинетин, 2-*ip*, а также ТДЗ. В ряде работ приведены данные по применению БАП [11-15], кинетина [16-18], 2-*ip* и ТДЗ [19-22] в культуре *in vitro*.

Цель наших исследований – оценка влияния концентраций цитокининов: 6-бензиламинопурина (БАП), тидиазурона (ТДЗ) и кинетина на адвентивное побегообразование у сортов Альпинист, Никитский Розовый, Бал Цветов, Crystal Fountain и Madame Julia Correvon.

**Материалы и методы исследований**

В биотехнологические исследования были включены 5 сортов клематиса, принадлежащих к различным группам, выращиваемые в генофондовой коллекции НБС-ННЦ: Альпинист, Бал Цветов, Никитский Розовый, Crystal Fountain и Madame Julia Correvon.

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00079.

‘Альпинист’. Группа Ланугиноза (М.А. Бескаравайная, 1974). Кустарниковая лиана длиной до 3 м. Листья сложные, из 5 листочков, зеленые и светло-зеленые. Цветки одиночные, раскрытые, бледно-сиреневые, до 14 см в диаметре, крестообразные; пыльники желтые. Чашелистиков 6, обратной-цевидные; пыльники желтые. Ремонтантный сорт позднего срока цветения.

‘Бал Цветов’. Группа Ланугиноза (М.А. Бескаравайная, 1972). Кустарниковая лиана до 2,0 м длиной. Листья сложные, тройчатые, темнозеленые, яйцевидные. Цветки фиолетово-голубые с фиолетово-пурпурной полосой, 14-18 см в диаметре, дискообразные; пыльники коричневые. Чашелистиков 6-8, округлые. Ремонтантный сорт среднего срока цветения.

‘Никитский Розовый’. Группа Витицелла (А.Н. Волосенко-Валенис, М.А. Бескаравайная, 1965). Кустарниковая лиана до 3 м длиной. Листья сложные, тройчатые, плотные, темно-зеленые, яйцевидные. Цветки ярко-розовые, 12-14 см в диаметре, дискообразные; пыльники светло-желтые. Чашелистиков 6, овальные. Ремонтантный сорт среднего срока цветения.

‘Crystal Fountain’ (syn. ‘Fairy Blue’). Группа Патенс (Н. Науакawa, 1994). Кустарниковая лиана до 2,0 м длиной. Листья тройчатые, зеленые, яйцевидные. Цветки махровые сиренево-синие, в центре бледно-голубые, 10-12 см в диаметре, дискообразные. Ремонтантный сорт раннего срока цветения.

‘Madame Julia Correvon’. Группа Витицелла (F. Morel, 1900). Кустарниковая лиана до 3 м длиной. Листья сложные, тройчатые, зеленые, яйцевидные. Цветки красно-пурпурные, 10-12 см в диаметре, крестообразные; пыльники желтые. Чашелистиков 4-6, ромбические. Ремонтантный сорт среднего срока цветения.

Исследования по введению вегетативных почек в культуру *in vitro* и регенерации микропобегов клематиса проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ». Применяли известные биотехнологические методы [8; 23; 24]. Вегетативные почки клематиса изучаемых сортов, изолированные в январе-феврале, стерилизовали 1 мин в 70 %-ом этаноле, 10 мин в 1 %-ом растворе Thimerosal (Sigma, США), затем 12 мин в растворе, содержащем 0,3–0,4 %-ом  $\text{Cl}_2$  Дез ТАБ (Китай), с добавлением 2-3 капель Tween 20 и культивировали на модифицированной нами среде МС [12]. Для индукции регенерации микропобегов в среду вводили 2,20–4,40 мкМ БАП, 0,049 мкМ НУК, 2,0 мг/л тиамин, 30 г/л сахарозы и 10 г/л агар-агара. На этапе индукции побегообразования для проведения 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. Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с регулируемыми условиями: 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения  $37,5 \text{ мкм м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  и температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Для оценки влияния регуляторов роста на адвентивное побегообразование в питательные среды вводили цитокинины: БАП – 2,20; 4,40 и 8,90 мкМ, кинетин – 4,60; 11,62 и 23,20 мкМ и ТДЗ – 3,0; 6,0 и 9,0 мкМ. Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (фирма ESCO, Сингапур).

Субкультивирование эксплантов осуществляли 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, их длину и количество междоузлий). Также учитывали цвет микропобегов и листьев, скручивание листьев, деформацию микропобегов.

Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

## Результаты и их обсуждение

Индукционными факторами развития эксплантов при культивировании *in vitro* являются тип и концентрация регуляторов роста в питательной среде [23]. Инициацию развития почек на среде МС, дополненной 2,20–4,40 мкМ БАП, 0,049 мкМ НУК и 10 мг/л рибавирина, наблюдали на 8-10-е сутки культивирования.

Для изучения влияния различных цитокининов на регенерационный потенциал клематиса на этапе собственно микроразмножения в качестве эксплантов использовали верхушки и сегменты микропобегов длиной 1 см с узлом. Экспланты помещали на базовую среду МС, дополненную регуляторами роста: БАП, ТДЗ и кинетином. В качестве контроля использовали среду МС без цитокинина.

Установлено, что адвентивные микропобеги изучаемых пяти сортов клематиса регенерировали во всех вариантах опыта. Высокая частота побегообразования отмечена на средах, дополненных 6 и 9 мкМ ТДЗ (табл. 1). Так, на среде МС, содержащей 6 мкМ ТДЗ, получено в среднем  $7,0 \pm 1,6$  микропобегов/эксплант у сорта Альпинист,  $7,0 \pm 1,9$  – у сорта Crystal Fountain,  $4,0 \pm 1,8$  – у сортов Бал Цветов, Никитский Розовый и Madame Julia Correvon.

Длина микропобегов составляла  $1,5 \pm 0,04$  см у сортов Альпинист и Crystal Fountain, 1,4 см – у сортов Никитский Розовый и Madame Julia Correvon, 1,3 см – у сорта Бал Цветов (табл. 2).

Таблица 1

**Влияние концентраций различных регуляторов роста на формирование адвентивных микропобегов 5 сортов клематиса *in vitro***

Концентрация цитокинина, мкМ	Количество образовавшихся микропобегов/эксплант, шт.				
	Альпинист	Бал Цветов	Никитский Розовый	Crystal Fountain	Madame Julia Correvon
<b>БАП</b>					
2,20	$1,5 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,7$
4,40	$2,5 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,2$	$2,2 \pm 1,3$	$2,4 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,3$
8,90	$3,0 \pm 1,2$	$2,7 \pm 1,2$	$2,7 \pm 1,2$	$2,8 \pm 1,2$	$2,7 \pm 1,4$
<b>ТДЗ, мкМ</b>					
3,0	$5,0 \pm 1,4$	$3,0 \pm 1,3$	$3,0 \pm 1,3$	$5,0 \pm 1,6$	$3,0 \pm 1,3$
6,0	$7,0 \pm 1,6$	$4,0 \pm 1,8$	$4,0 \pm 1,8$	$7,0 \pm 1,9$	$4,0 \pm 1,8$
9,0	$11,0 \pm 1,9$	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$	$9,0 \pm 2,0$	$6,0 \pm 1,0$
<b>кинетин</b>					
4,60	$1,0 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$	$1,0 \pm 1,3$	$0,9 \pm 0,2$
11,62	$2,5 \pm 1,2$	$1,9 \pm 1,2$	$2,1 \pm 1,1$	$2,0 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,7$
23,20	$2,7 \pm 1,4$	$2,1 \pm 1,1$	$2,0 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,7$

Таблица 2

**Морфометрические показатели адвентивных микропобегов клематиса на питательных средах МС, дополненных различными концентрациями ТДЗ и БАП**

Сорт	Концентрация ТДЗ, мкМ					
	3,0		6,0		9,0	
	средняя длина, см	кол-во междоузлий, шт.	средняя длина, см	кол-во междоузлий, шт.	средняя длина, см	кол-во междоузлий, шт.
Альпинист	$1,1 \pm 0,01$	3,0	$1,5 \pm 0,04$	4,0	$1,9 \pm 0,04$	$4,6 \pm 0,2$
Бал Цветов	$1,0 \pm 0,03$	3,0	$1,3 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,4$
Никитский Розовый	$1,0 \pm 0,04$	3,0	$1,4 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,04$	4,0
Crystal Fountain	$1,1 \pm 0,03$	3,0	$1,5 \pm 0,04$	4,0	$1,8 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,4$
Madame Julia Correvon	$1,0 \pm 0,02$	3,0	$1,4 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,04$	4,0
<b>Концентрация БАП, мкМ</b>						
2,20		4,40		8,90		
Альпинист	$1,08 \pm 0,04$	3,0	$1,4 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,04$	$3,4 \pm 0,2$
Бал Цветов	$1,2 \pm 0,03$	3,0	$1,2 \pm 0,04$	3,0	$1,9 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,1$
Никитский Розовый	$1,06 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,02$	3,0	$1,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,3$
Crystal Fountain	$1,10 \pm 0,03$	3,0	$1,3 \pm 0,02$	3,0	$1,9 \pm 0,03$	3,0
Madame Julia Correvon	$0,98 \pm 0,02$	3,0	$1,3 \pm 0,03$	3,0	$1,7 \pm 0,04$	3,0

Количество междоузлий равнялось 3,2-4 шт./побег. Визуальные наблюдения показали, что микропобеги были хорошо сформированы, компактные, с укороченными междоузлиями, имели ярко-зеленую окраску. Дальнейшее субкультивирование способствовало росту числа дополнительных побегов. Так, у клематиса сорта Crystal Fountain их количество достигало 10-12 шт./эксплант через 4 недели культивирования (рис. 1).

На среде МС, содержащей 9,0 мкМ ТДЗ, получено в среднем  $11,9 \pm 1,9$  микропобегов/эксплант у сорта Альпинист,  $9,0 \pm 2,0$  у сорта Crystal Fountain,  $6,0 \pm 1,0$  – у сортов Никитский Розовый и Madame Julia Correvon,  $5,0 \pm 1,0$  – у сорта Бал Цветов. Длина микропобегов составила  $1,7 \pm 0,04$  –  $1,9 \pm 0,04$  см, а количество междоузлий –  $4,0$ – $4,6 \pm 0,2$  шт./побег. Адвентивные микропобеги были компактные и визуально не имели морфологических отклонений; в дальнейшем их можно было использовать для микро-черенкования *in vitro* (рис. 2).



Рис. 1. Адвентивное побегообразование в культуре сегментов побега клематиса сорта Crystal Fountain на среде, дополненной 6 мкМ ТДЗ

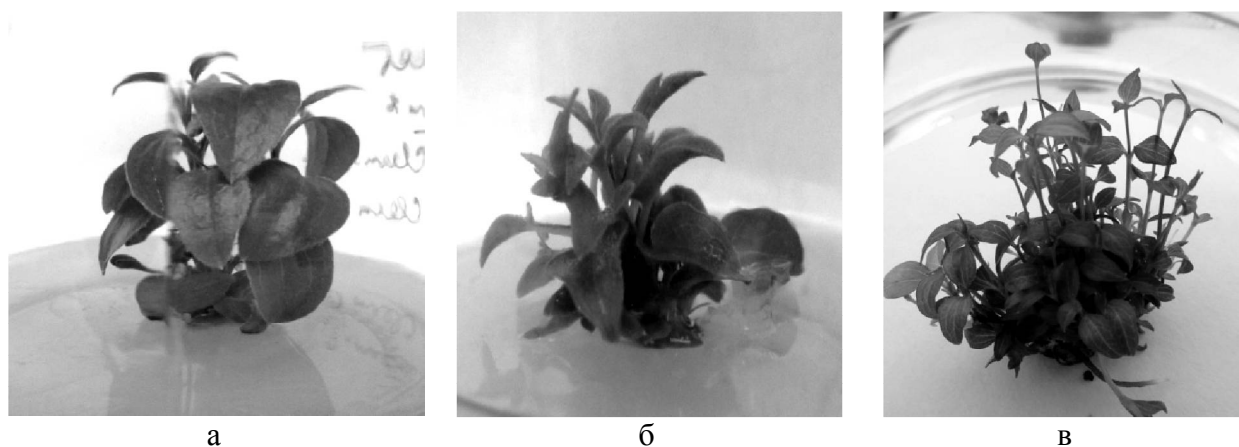


Рис. 2. Формирование дополнительных микропобегов клематиса сорта Альпинист после 8 недель культивирования на питательной среде МС, дополненной: а) 3,0 мкМ ТДЗ; б) 6,0 мкМ ТДЗ; в) 9,0 мкМ ТДЗ

Использование в исследованиях 4,40 мкМ БАП также способствовало адвентивному побегообразованию у всех сортов клематиса. Получено  $2,5 \pm 1,1$  шт./эксплант у сорта Альпинист,  $2,4 \pm 1,1$  – у сорта Crystal Fountain,  $2,3 \pm 1,2$  – у сорта Никитский Розовый,  $2,3 \pm 1,3$  – у сорта Madame Julia Correvon (табл. 1). Среднее количество междоузлий составило 3,0 шт./микропобег. Одновременно отмечено наличие удлиненных междоузлий, образование единичных непропорционально крупных листьев. Из данных, представленных в табл. 2, следует, что адвентивные микропобеги максимальной длины развивались на среде, содержащей 8,90 мкМ БАП. Однако увеличение концентрации БАП стимулировало появление многочисленных морфологических изменений: формирование деформированных побегов, оводнение, скручивание листьев, наличие желто-зеленой окраски, формирование рыхлого каллуса в основании, что приводило к замедлению их развития. Такие микропобеги нельзя было использовать для дальнейшего микроразмножения *in vitro*. Полученные нами данные согласуются с результатами ряда исследователей [8; 12; 26].

В присутствии 11,62–23,20 мкМ кинетина отмечали максимальную частоту регенерации адвентивных микропобегов клематиса изучаемых сортов. Получено 2,5–2,7 адвентивных микропобега у клематиса сорта Альпинист, 1,9–2,1 – у сорта Бал Цветов, 2,1–2,0 – у сорта Никитский Розовый, 1,8–2,0 – у сорта Madame Julia Correvon и 2,0 – у сорта Crystal Fountain. Однако при визуальном осмотре микропобеги имели ряд морфологических изменений: желто-зеленые изогнутые микропобеги, удлиненные междоузлия, оводнение листьев и микропобегов, появление желто-коричневых пятен на листьях, отмирание верхушки. Микропобеги были непригодны для дальнейшего размножения в условиях *in vitro*.

### Заключение

Полученные результаты показали, что тип и концентрации цитокининов в питательной среде оказывают значительное влияние на адвентивное побегообразование 5 сортов клематиса в культуре сегментов микропобега *in vitro*. Установлено, что максимальное количество микропобегов без видимых морфологических изменений формировалось на средах, дополненных 6 и 9 мкМ ТДЗ. Образовавшиеся микропобеги использовали для дальнейшего клонального микроразмножения. Наличие в питательной среде 2,20–4,40 мкМ БАП также стимулировало адвентивное побегообразование. Повышение концентрации БАП приводило к появлению многочисленных видимых морфологических изменений. Аналогичные результаты получены при использовании 4,60–23,2 мкМ кинетина. Среди изучаемых сортов сегменты микропобегов сортов Альпинист и Crystal Fountain обладали высоким морфогенетическим потенциалом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clematis on the Web [Электронный ресурс] Режим доступа. URL: <http://www.clematis.hull.ac.uk/>.
2. Зубкова Н.В. Перспективный сортимент *Clematis* L. для использования в селекции // Тр. Кубанского гос. аграрного ун-та. 2015. №4 (55). С. 78-80.
3. Зубкова Н.В. Коллекция рода *Clematis* L. (*Ranunculaceae* Juss.) в Никитском ботаническом саду-Национальном научном центре // Цветоводство: история, теория, практика: Материалы VII междунар. науч. конф. Минск, 2016. С. 122-123.
4. Бескаравайная М.А. Клематисы. М.: Росагропромиздат, 1991. 189 с.
5. 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.
6. Kreen S., Svensson M., Rumpunen K. Rooting of clematis microshoots and stem cuttings in different substrates // Scientia Hort. 2002. Vol. 96. P. 351-357.
7. 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 // Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур: Сб. науч. тр. Гос. Никит. бот. сада. 2014. Т. 138. С. 5-56.
8. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
9. Zhang Q.X., Hu H.K., Wang A.X., Fang Y.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration of clematis 'Multi-Blue' // Propagation of Ornamental Plants. 2011. Vol. 11, N 1. P. 21-27.
10. Raja Naika H., Krishna V. Plant regeneration from callus culture of *Clematis gauriana* Roxb. – A rare medicinal plant // Turkish J. Biology. 2008. Vol. 32(2). P. 99-103.
11. 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.
12. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур: Сб. науч. тр. Гос. Никит. бот. сада. 2014. Т. 138. С. 57-101.
13. Корзина Н.В., Митрофанова И.В. Развитие эксплантов клематиса (*Clematis* L.) на этапе введения в условия *in vitro* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014. № 64. С.67-74.
14. Mitrofanova I., Brailko V., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O. Clonal micropropagation and some Physiology aspects of essential Roses valuable cultivars regeneration in vitro // Agriculture & Forestry. 2016. Vol. 62. P. 73-81.
15. Nobre J., Santos C., Romano A. Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2000. Vol. 60. P. 75-78.
16. Mitrofanova I., Lesnikova-Sedoshenko N., Rabotyagov V., Mitrofanova O. Plant regeneration of some cultivars in *Lavandula angustifolia* Mill. // On in vitro Culture and Horticultural Breeding: Abstracts Book of the IX Intl. Symp. (13-17 March, 2016, Gisa, Efypt). 2016. P. 29-30.

17. Nesterowicz S., Kulpa D., Moder K., Kurek J. Micropropagation of an old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the dendrological garden at Przelewiec // *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2006. Vol.5, N 1. P. 27-35.
18. Sansberro P., Rey H., Mroginski L. In vitro plantlet regeneration of *Schinopsis balansae* (*Anacardiaceae*) // *Trees*. 2003. Vol. 17. P. 542-546.
19. Иванова Н.Н., Хохлов С.Ю., Митрофанова И.В. Различные пути регенерации растений *Diospyros kaki* Thunb. сорта Золотистая в условиях *in vitro* // Бюл. ГНБС. 2016. Вып. 120. С.24-30.
20. Mitrofanova I.V., Tefvik A.Sh., Mitrofanova O.V., Brailko V.A., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Features of canna regeneration in vitro and plantlets adaptation in vivo // *Acta Horticulturae*. 2017. Vol. 1155. P. 447-454.
21. 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.
22. Kim M-S., Klopfenstein N.B., Cregg B.M. In vitro and ex vitro rooting of micropropagated shoots using three green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones // *New Forests*. 1998. Vol.16. P. 43-57.
23. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
24. Kyte L., Kley J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from Test Tubes: An introduction of Micropropagation, 4<sup>th</sup> edn Portland, OR, US: Timber Press. 2013. 274 p.
25. 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.
26. Huang L.C., Huang B.L., Murashige T.A. Micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 1998. Vol. 34. P. 141-146.

Поступила в редакцию 03.07.17

*N.N. Ivanova, I.V. Mitrofanova, N.V. Zubkova*

#### CYTOKININ EFFECT ON SHOOT FORMATION IN CLEMATIS *IN VITRO*

The investigation results of such cytokinins as 6-benzylaminopurine (BAP), tidiazuron (TDZ) and kinetin effect on the adventitious shoot formation in clematis under *in vitro* culture are presented. Clematis cultivars Alpinist, Nikitsky Rosovyi, Bal Tsvetov, Crystal Fountain and Madame Julia Correvon, growing in the collection plots of NBG-NSC were involved in the research. As explants we used apexes and segments of microshoots cultured *in vitro*, 1 cm long with a single node. The explants were established on the basal MS medium supplemented with plant growth regulators: BAP (2,20; 4,40 and 8,90  $\mu\text{M}$ ), TDZ (3,0; 6,0 and 9,0  $\mu\text{M}$ ) and kinetin (4,60; 11,62 and 23,20  $\mu\text{M}$ ). MS medium free of cytokinin was used as a control. Flasks and test tubes with the explants were maintained in a culture room under the controlled conditions: 16-hour photoperiod, light intensity  $37,5 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and temperature  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Some special features of nodal segments development in the studied clematis cultivars at the particular stage of micropropagation *in vitro* depending on cytokinin type and concentration were found out. It was determined that the maximum numbers of adventitious microshoot without any morphological abnormalities were formed on the media supplemented with BAP and TDZ. In the presence of kinetin, some microshoots had a number of morphological changes and were not suitable for further micropropagation. The explants of Alpinist and Crystal Fountain cultivars demonstrated high morphogenetic capacity under *in vitro* culture.

*Keywords:* *Clematis* L., *in vitro* culture, explant, adventitious microshoots.

#### REFERENCE

1. *Clematis on the Web* [Elektronnyj resurs], URL: <http://www.clematis.hull.ac.uk/>
2. Zubkova N.V. [Perspektive CLEMATIS L. assortment in breeding], in *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2015, no. 4 (55), pp. 78-80 (in Russ.).
3. Zubkova N.V. [Collection of genus *Clematis* L. (*Ranunculaceae* Juss.) in Nikita botanical gardens-National scientific center], in *Mater. VII mezd. nauschn. konf. «Zvetovodstvo: istoriya, teoriya, praktika»*, 24-26 maya, 2016 г, Minsk, Belarus, Minsk, 2016, pp. 122-123 (in Russ.).
4. Beskaravajnaja M.A. Klematisy [Clematis], M.: Rosagropromizdat, 1991, 189 p. (in Russ.).
5. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina E.L., and Chirkov S.N. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanica Gardens and biotechnology of fig plants regeneration, in *Acta Hort*, 2016, vol. 139, pp. 303-309.
6. Kreen S., Svensson M., and Rumpunen K. Rooting of clematis microshoots and stem cuttings in different substrates, in *Scientia Hort*, 2002, vol. 96, pp. 351-357.
7. Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., and Ivanova N.N. [Using of biotechnological methods for plants improvement and propagation of virus-free planting material of perspective ornamental plants], in *Sb. nauch. tr. Gos. Nikit. botan. sada «Metodologija biotehnologicheskikh i virusologicheskikh issledovanij cennyh mnogoletnih kul'tur»*, 2014, vol. 138, pp. 5-56 (in Russ.).

8. Mitrofanova I.V. *Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnology perennial horticultural plants obtaining and conservation*, K: Agrarna nauka, 2011, 344 p. (in Russ.).
9. Zhang Q.X., Hu H.K., Wang A.X., and Fang Y.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration of clematis 'Multi-Blue', in *Propagation of Ornamental Plants*, 2011, vol. 11, no. 1, pp. 21–27.
10. Raja Naika H., and Krishna V. Plant regeneration from callus culture of *Clematis gouriana* Roxb. – A rare medicinal plant, in *Turkish J. Biology*, 2008, vol. 32 (2), pp. 99–103.
11. Mitrofanova I., Zubkova N., Mitrofanova O., Korotkov O., Korzina N., and Ivanova N. [Clematis: modern biotechnological methods of species and varieties propagation and conservation], in *Cvetovodstvo*, 2015, no. 3. pp. 16-19 (in Russ.).
12. Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., and Mitrofanova O.V. [Methodical base of clonal micropropagation of some ornamental plants], in *Sb. nauch. tr. Gos. Nikit. botan. sada «Metodologija biotekhnologicheskikh i virusologicheskikh issledovaniy cennykh mnogoletnih kul'tur»*, 2014, vol. 138, pp. 57-101 (in Russ.).
13. Korzina N.V., and Mitrofanova I.V. [Development of clematis (*Clematis* L.) explants during the stage of introduction in conditions in vitro], in *Visnik Lviv'skogo universitetu, Serija biologichna*, 2014, no. 64, pp. 67-74 (in Russ.).
14. Mitrofanova I., Brailko V., Lesnikova-Sedoshenko N., and Mitrofanova O. Clonal micropropagation and some Physiology aspects of essential Roses valuable cultivars regeneration in vitro, in *Agriculture & Forestry*, 2016, vol. 62, pp. 73-81.
15. Nobre J., Santos C., and Romano A. Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus*, in *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 2000, vol. 60, pp. 75–78.
16. Mitrofanova I., Lesnikova-Sedoshenko N., Rabotyagov V., and Mitrofanova O. Plant regeneration of some cultivars in *Lavandula angustifolia* Mill, *Abstracts Book of the IX Intl. Symp, On in vitro Culture and Horticultural Breeding* (13-17 Vfrch, 2016, Gisa, Efypt), 2016, pp. 29-30.
17. Nesterowicz S., Kulpa D., Moder K., and Kurek J. Micropropagation of an old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the dendrological garden at Przelewiec, in *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 27-35.
18. Sansberro P., Rey H., and Mroginski L. In vitro plantlet regeneration of *Schinopsis balansae* (*Anacardiaceae*), in *Trees*, 2003, vol. 17, pp. 542–546.
19. Ivanova N.N., Hohlov S.Ju., and Mitrofanova I.V. [Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thund. cultivar «Zolotistaya» in vitro], in *Bulleten' GNBS*, 2016, iss. 120, pp. 24-30 (in Russ.).
20. Mitrofanova I.V., Tevfik A.Sh., Mitrofanova O.V., Brailko V.A., and Lesnikova-Sedoshenko N.P. Features of canna regeneration in vitro and plantlets adaptation in vivo, in *Acta Horticulturae*, 2017, vol. 1155, pp. 447-454.
21. Parzymies M., and Dabski M. The effect of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of *Clematis viticella* (L.) and *Clematis integrifolia* Petit Faucon, in *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 81-91.
22. Kim M-S., Klopfenstein N.B., and Cregg B.M. In vitro and ex vitro rooting of micropropagated shoots using three green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones, in *New Forests*, 1998, vol. 16, pp. 43-57.
23. Butenko R.G. *Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotekhnologii na ih osnove: ucheb. posob.* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology thereof: Textbook], M.: FGK-PRESS, 1999, 160 p. (in Russ.).
24. Kye L., Kley J., Scoggins H., and Bridgen M. *Plants from Test Tubes: An introduction of Micropropagation*, 4<sup>th</sup> edn Portland, OR, US: Timber Press, 2013, 274 p.
25. Murashige T., and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures, *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473-497.
26. Huang L.C., Huang B.L., and Murashige T.A. Micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*, in *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 1998, vol. 34, pp. 141-146.

Иванова Наталия Николаевна,  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
лаборатории биотехнологии и вирусологии растений  
E-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Митрофанова Ирина Вячеславовна,  
доктор биологических наук, заведующая отделом  
биологии развития, биотехнологии и биобезопасности  
E-mail: irimitrofanova@yandex.ru

Зубкова Наталья Васильевна,  
научный сотрудник лаборатории цветоводства  
E-mail: clematisnbs@mail.ru

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени  
Никитский ботанический сад –  
Национальный научный центр РАН»  
298648, Россия, г. Ялта, Никитский спуск, 52

Ivanova N.N.,  
Candidate of Biology, Senior Researcher  
in the Laboratory of Plant Biotechnology and Virology  
E-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Mitrofanova I.V.,  
Doctor of Biology, Head of the Department of Plant  
Developmental Biology, Biotechnology and Biosafety  
E-mail: irimitrofanova@yandex.ru

Zubkova N.V.,  
Researcher in the Laboratory of Floriculture  
E-mail: clematisnbs@mail.ru

Nikita Botanical Gardens –  
National Scientific Center RAS  
Nikitskiy spusk, 52, Yalta, Russia, 298648