

НЕПРЯМОЙ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS* SP.)

И.В. МИТРОФАНОВА¹, кандидат биологических наук;

О.И. СОКОЛОВ², доктор биологических наук;

В.Н. ЕЖОВ¹, доктор технических наук

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Институт биохимии и физиологии растений микроорганизмов РАН

В Никитском ботаническом саду находится одна из крупнейших коллекций декоративных, плодовых, эфиромасличных и лекарственных растений. Большинство культур можно отнести к трудноразмножаемым растениям, перспективным для озеленения как открытого, так и закрытого грунта и имеющим народнохозяйственное значение.

Род *Clematis* L. – ломонос принадлежит к семейству лютиковых (*Ranunculaceae* Juss.). Это – нежная и ломкая самоцепляющаяся лиана. Крупноцветковые клематисы размножают вегетативным путем, так как большинство гибридных сортов практически не завязывают семена. Наряду с этим, выращенные сеянцы часто недостаточно декоративны и не сохраняют свойств материнского растения. Известно, что клематисы необычайны по своей красоте и привлекательности. Наряду с этим, многие виды клематиса имеют большое народнохозяйственное значение, так как содержат эфирные масла, дубильные вещества, витамин С, фитонциды, а также обладают фунгицидным действием, подавляя развитие плесневых грибов. Известны виды клематиса, используемые в тибетской, китайской и монгольской медицине [6, 15].

Существующие традиционные методы размножения данной культуры не позволяют с высокой долей эффективности получать достаточное количество как посадочного материала, так и сырья для пищевой и медицинской промышленности. Современные биотехнологические методы, используя свойство клетки растений – тотипотентность, позволяют успешно тиражировать редкие и единичные растения, а также перспективные и новые сорта. Одним из таких способов является соматический эмбриогенез, представляющий собой процесс асексуального развития зародышеподобных структур из репродуктивных и соматических тканей путем, напоминающим зиготический эмбриогенез [18]. Английские ученые, проводившие свои исследования на клематисе *Clematis integrifolia* × *C. viticella*, не сообщали о каких-либо изменениях в геноме растений, полученных через культуру *in vitro* [31]. Однако ими не были досконально изучены особенности регенерации растений клематиса в условиях *in vitro*. Кроме того, ученым не удалось определить основные факторы, влияющие на пути реализации морфогенетического потенциала органов и тканей исследуемого растения.

Впервые исследования по изучению процессов соматического эмбриогенеза клематиса были начаты в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [34]. В процессе исследования ставился ряд задач. Необходимо было выявить основные факторы, влияющие на морфогенетический потенциал органов и тканей клематиса, и, кроме того, изучить этапы соматического эмбриогенеза, получить регенерацию полноценных растений, представив в результате биотехнологическую методологию получения регенерантов из незиготических зародышей.

Результаты, представленные в этой статье, касаются изучения особенностей непрямого соматического эмбриогенеза клематиса на примере сорта Серенада Крыма и оценки роли абиотических и биотических факторов в процессе регенерации растений через непрямо соматический эмбриогенез.

Материалы и методы

Эксперименты по культуре органов и тканей клематиса проводили на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада УААН –

Национального научного центра в 1996-2005 гг. Гистохимические исследования выполнены в лаборатории физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия).

Для исследований был отобран сорт Серенада Крыма, принадлежащий к группе Ланугиноза. Представители этой группы характеризуются массовым цветением весной на перезимовавшем приросте прошлого года. Летом или осенью более слабое цветение может повториться на приросте текущего года. Побеги достигают длины 2,5 см. Цветки – широко раскрытые, как правило одиночные, крупные диаметром 16-20 см, из 6-8 чашелистиков, преимущественно светлой окраски.

В качестве исходных эксплантов были использованы побеги с почками, которые отбирали в период с февраля по апрель.

Для снижения контаминации побеги с почками клематиса предварительно протирали 96%-ным этанолом. В процессе собственно стерилизации растительных эксплантов использовали 70%-ный этиловый спирт и 4%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента Tween-80 (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «Fatran Lf» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали три состава питательных сред, наиболее часто применяемых при размножении деревьев и кустарников. Эти среды содержат минеральные соли по прописям Гамборга и Эвелеге (B5) [25], Мурасиге и Скуга (МС) [36] и Пирика [39]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамин-НСl, 2,43 мкМ пиридоксин-НСl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 2-3% сахарозы, 0,8% агара, 0,9 мкМ БАП, 0,04 мкМ ИМК. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* клематиса в питательную среду вводили следующие фитогормоны: 6-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил-амин)-пурин (зеатин) *Sigma*, США в концентрации 0,4-6,9 мкМ; β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК) *Sigma*, США – 0,04-4,5 мкМ; 2,4-дихлорфеноксисуксуную кислоту (2,4-Д) *Sigma*, США – 0,9-4,8 мкМ.

Пробирки и колбы с эксплантами помещали в культуральную комнату, где в зависимости от культивируемого объекта исследования и эксперимента поддерживалась температура 20-30°C, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения 5-60 мкМ м⁻² с⁻¹ и 70%-ная относительная влажность воздуха. Субкультивирование тканей и органов проводили через 15-30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5%-ного глутарового альдегида с 2%-ным формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при -20 °С, после чего заливали в ПЭГ-1500 [5, 13, 14]. Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон. Срезы окрашивали акридиновым оранжевым (АО – ядра клеток светятся ярко-зеленым, ядрышки – желтовато-красного цвета), удаляя ПЭГ-1500 дистиллированной водой, покрывая срезы акридиновым оранжевым (0,1%) на 2-3 мин, промывая затем дистиллированной водой. При окраске толуидиновым синим (краситель для нуклеиновых кислот) срезы доводили до воды, окрашивали 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего на 2-3 мин, ополаскивали в дистиллированной воде. При окраске DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indole. (*Sigma*, США) – флуоресцентный краситель на ядерную ДНК срезы доводили до воды, окрашивали DAPI в течение 10 мин, затем промывали дистиллированной водой. Срезы подсушивали и заключали в синтетическую среду DePex (*Serva*, Германия).

Все препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DMLB» (Германия), который работает как в режиме флуоресценции, так и в режиме обычного просвечивающего микроскопа.

Результаты и обсуждение

Большинство растений клематиса, находящихся в коллекционном генофонде НБС-ННЦ, являются возрастно-старыми. Изучение морфогенетических потенций тканей и органов взрослого растения в условиях *in vitro* представляет большой научный и практический интерес. Прежде всего это связано с тем, что использование в качестве первичного экспланта ткани взрослого растения позволяет получать посадочный материал с хозяйственно ценными признаками. Однако работа с материалом от взрослых растений затрудняется тем, что с увеличением возраста в тканях и органах растения происходят процессы, приводящие к ингибированию роста и регенерационной способности. Полученные в результате регенерации микропобеги характеризуются медленным ростом и низкой способностью к укоренению. Несмотря на это, ученые всего мира, работающие над этой проблемой, продолжают свои исследования и разрабатывают все новые и новые биотехнологии для каждой конкретной культуры [7, 17, 19-21, 23, 28, 32, 33].

Изучение влияния состава питательных сред на процессы индукции развития вегетативных почек

Разработка биотехнологии получения растений невозможна без подбора питательных сред. Как показали наши исследования, культивирование изолированных почек клематиса на питательных средах, отличающихся по составу минеральных солей, концентрациями витаминов, фитогормонов, сахарозы и агара, приводило к различным морфогенетическим процессам.

В процессе эксперимента использовали три состава питательных сред, наиболее часто применяемых при размножении деревьев и кустарников. Эти среды содержат минеральные соли по прописям Гамборга и Эвелега (B5), Мурасиге и Скуга (МС) и Пирика. Исследуемые питательные среды отличаются друг от друга по содержанию азота, фосфора и калия. Так, например, в состав минеральных солей по МС азот, фосфор и калий входят в относительно высоких концентрациях. Соли по B5 содержат достаточное количество калия и фосфора и значительно меньше азота, по сравнению с прописью МС. Макросоли по Пирику содержат азота в 8 раз, а калия и фосфора в – 2 раза меньше, чем соли по МС.

Полученные результаты показали, что на всех испытанных вариантах сред почки клематиса сорта Серенада Крыма оставались зелеными, но регенерация микропобегов происходила только на средах МС и Пирика. Каллус, формирующийся в основании почек на среде B5, не давал им развиваться (табл. 1). Начало образования микропобегов отмечали на 10-14 сутки культивирования. На питательной среде МС образовывалось до трех дополнительных микропобегов. Через 2-3 месяца на средах Пирика и МС длина микропобегов достигала $9,0 \pm 0,1$ см. Однако на среде МС микропобеги имели ярко-зеленую окраску, количество междоузлий достигало в среднем $6,0 \pm 0,1$ на эксплант. На среде Пирика микропобеги были более тонкие и количество междоузлий достигало в среднем $2,5 \pm 0,1$ на эксплант. Поэтому в последующих экспериментах в качестве базовой среды была использована питательная среда МС.

Исследование воздействия фитогормонов на процесс непрямого соматического эмбриогенеза и прямого вторичного эмбриогенеза клематиса

Известно, что фитогормоны играют важную роль в осуществлении взаимодействия клеток, тканей и органов растений. Малые концентрации этих веществ необходимы для индукции и регулирования физиологических и морфогенетических процессов. Для каждого вида и сорта растения экспериментально подбираются соответствующие концентрации и соотношения фитогормонов в питательной среде. Так, цитокинины, помимо активизации клеточного деления и роста, стимулируют дифференциацию клеток, гистогенез и побегообразование. Они также влияют на дифференциацию каллуса, индуцируют развитие пазушных почек, рост боковых побегов, закладку адвентивных почек и последующую регенерацию растений [1-3, 9, 10, 41]. Ауксины, активизирующие процесс деления и растяжения клеток, необходимы для формирования проводящей системы и корней растений. Ткани, насыщенные ауксином, обладают аттрагирующим действием, то есть способностью притягивать питательные вещества,

которые затем откладываются как запасные в семенах, плодах, клубнях, корнеплодах или же активно используются в период роста и развития меристемы. Ауксины играют существенную роль в дифференциации клеток. Так, например, индукция деления покоящихся вакуолизированных паренхимных клеток с помощью ауксина представляет собой дедифференциацию. Наряду с этим, ауксин обуславливает явление апикального доминирования, то есть взаимную координацию роста главного и боковых побегов [4, 7, 28].

Таблица 1

Влияние минерального состава различных питательных сред на образование и регенерацию микропобегов из вегетативных почек клематиса сорта Серенада Крыма (через 30 сут после введения в условия *in vitro*)

Питательная среда	К-во почек, образующих микропобеги, %	Интенсивность регенерации*
Мурасиге и Скуга	70,5 ± 6,5	±
Гамборга и Эвелега	0	—
Пирика	87,6 ± 9,3	+

* + - активная регенерация (образование 2-3 микропобегов);
± - средняя регенерация (образование 1-2 микропобегов);
— - слабая регенерация

После введения вегетативных почек и индукции их развития на первичных питательных средах МС и Пирика дальнейшее размножение клематиса осуществляли с помощью микрочеренкования побегов. В качестве вещества цитокининового типа действия нами был использован зеатин, а в качестве веществ ауксинового типа действия – ИМК и 2,4-Д. Микрочеренки с одним и двумя междоузлиями высаживали на питательную среду МС, содержащую 1,8 мкМ зеатина и 0,04 мкМ ИМК. В процессе культивирования в основании микрочеренков образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. Полученный каллус отделяли от основания микропобегов и микрочеренков и разделяли на сегменты, помещая на питательную среду, дополненную 2,4-Д и зеатином. Эффективность влияния различных концентраций 2,4-Д и зеатина на индукцию образования эмбрионного каллуса клематиса представлена в таблице 2.

Таблица 2

Индукция каллусообразования клематиса сорта Серенада Крыма на питательных средах с 2,4-Д и зеатином

Концентрация фитогормонов, мкМ	К-во эксплантов, образующих каллус, %	Тип каллуса, %*		
		Э	НЭ	С
контроль (0)	0	-	-	-
2,4-Д				
0,9	0	-	-	-
1,8	0	-	-	-
2,3	0	-	-	-
4,5	60 ± 2,3	-	100	-
6,8	52 ± 5,6	-	100	-
зеатин				
0,9	25 ± 2,1	25 ± 2,6	59 ± 2,3	16 ± 1,2
1,8	100	100	0	0
2,3	100	88 ± 6,6	5 ± 0,1	7 ± 0,1
4,6	86 ± 6,3	57 ± 4,9	10 ± 1,1	33 ± 4,6
6,9	72 ± 7,6	20 ± 1,2	69 ± 4,3	11 ± 1,0

* Э – эмбрионный; НЭ – неэмбрионный; С – смешанный; - - образование каллуса не происходит

Присутствие в питательной среде 2,4-Д в концентрации 4,5 мкМ и 6,8 мкМ стимулировало образование рыхлого неэмбрионного каллуса белого цвета. В процессе исследования нами было отмечено, что на среде, содержащей 1,8 мкМ зеатина, клетки культивируемого каллуса активно делились, и образующийся каллус имел плотную структуру. Эмбрионный каллус формировался также на средах, дополненных 2,3 мкМ и 4,6 мкМ зеатина. На питательных средах, содержащих 0,9 мкМ, 2,3 мкМ, 4,6 мкМ и 6,9 мкМ зеатина наблюдали образование каллуса смешанного типа.

Как показали наши исследования, в течение месяца отмечали появление меристематических зон и меристематических бугорков (рис. 1). Эти образования отличались от основной массы клеток ярко-зеленой окраской. Только гистологический анализ позволил продемонстрировать, что в эмбрионной массе имеются два типа клеток: первые клетки имели относительно плотную цитоплазму, достаточно тонкие клеточные стенки и очень мелкие вакуоли (эмбрионные клетки); вторые – мутную цитоплазму и крупные вакуоли (неэмбрионные клетки) (рис. 2, а). На третьи сутки культивирования активизировались процессы митотической и меристематической активности в эмбрионной массе клеток (рис. 2, б). Прозембрио начинал формироваться в результате асимметричных делений, чаще всего непосредственно внутри каллуса.

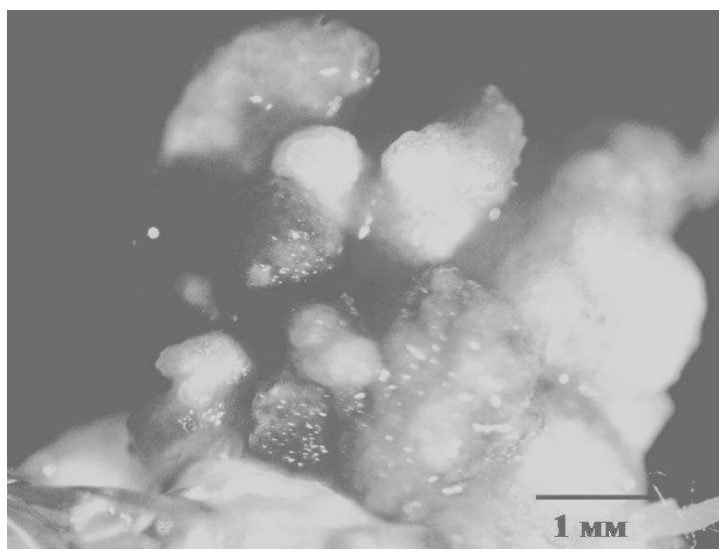


Рис. 1. Формирование меристематических бугорков на поверхности каллуса клематиса сорта Серенада Крыма

Теоретические исследования в области соматического эмбриогенеза показывают, что вся эмбрионная масса клеток детерминирована на процесс образования эмбриоида, но это не так. Только часть клеток способна к формированию соматического зародыша. Наблюдения на примере клевера и фисташки подтверждают гипотезу о том, что именно регуляторы роста инициируют асимметричное деление и приводят к изменению полярности клеток [30, 38]. Скорее всего, экзогенные регуляторы роста непосредственно изменяют полярность клеток путем интерференции градиента рН или электрического поля вокруг клеток.

Только после 12-14 суток культивирования в каллусе клематиса можно наблюдать образование соматических зародышей из индуцированных эмбрионных детерминированных клеток (рис. 2, в). Однако только на 27-30-е сутки был отчетливо виден сам зародыш (рис. 2, г).

Присутствие в среде зеатина индуцировало образование биполярных структур на поверхности и внутри каллуса. Визуально удалось наблюдать появление соматических зародышей на поверхности каллуса только через 5-7 суток после их формирования в самом каллусе. Все образовавшиеся незиготические зародыши имели светло-зеленую окраску и

плотное соединение с материнским каллусом. В процессе культивирования такого каллуса часть эмбриоидов свободно отделялась. Однако на их поверхности формировался каллус, который препятствовал их дальнейшему развитию.

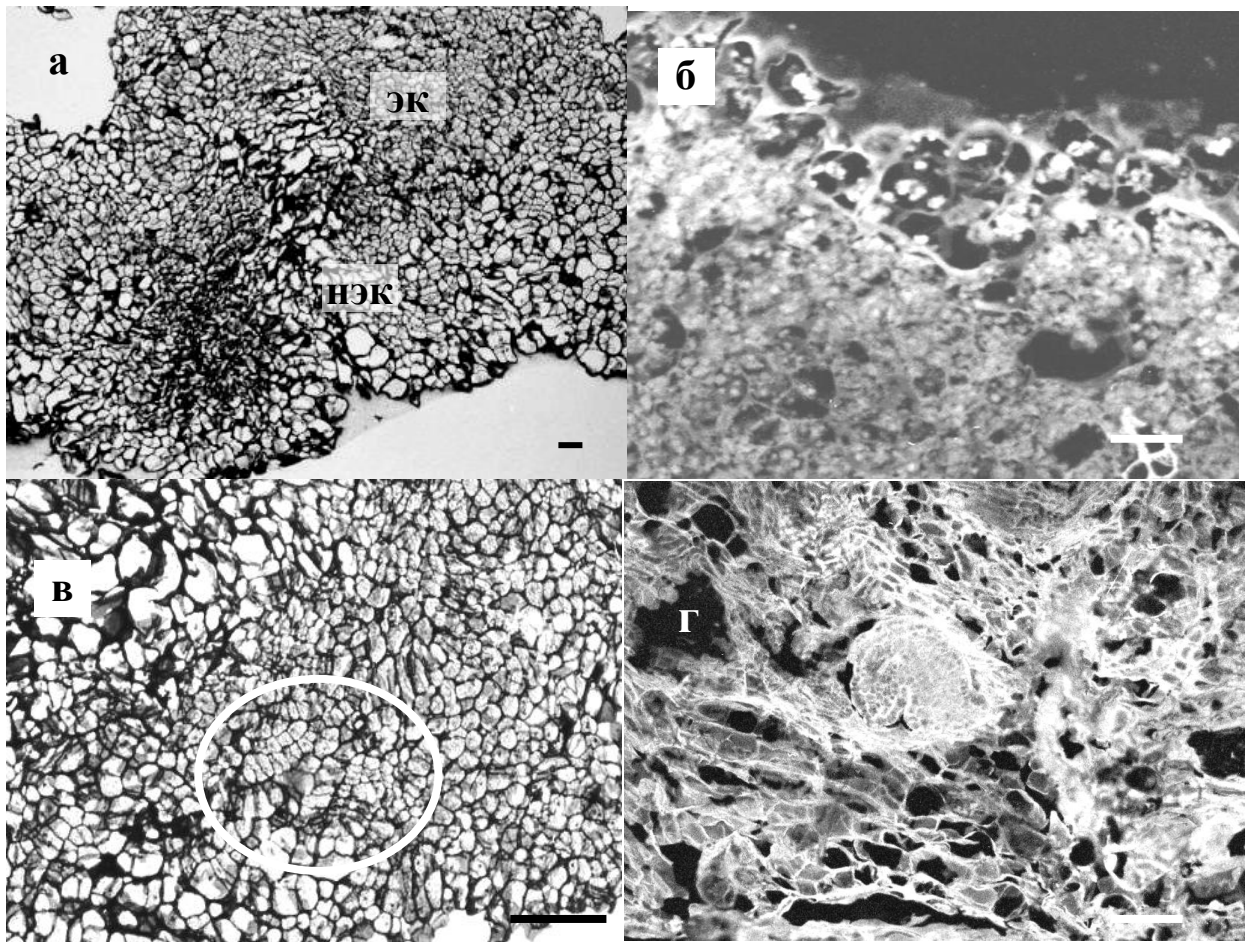


Рис. 2. Развитие соматических зародышей в эмбрионной клеточной массе клематиса: а) эмбрионные клетки (ЭК) и неэмбрионные клетки (НЭК) в каллусе; б) активизация клеточных делений в эмбрионной массе на 3-и сут культивирования; в) появления эмбриоподобных структур на 10-12-е сут культивирования; г) образовавшийся соматический зародыш

В таблице 3 представлены результаты образования соматических зародышей под влиянием различных концентраций зеатина. Так, максимальное количество эмбриоидов на эксплант ($25 \pm 2,6$ шт.) было получено на среде МС, дополненной $1,8 \text{ мкМ}$ зеатина через 4 недели культивирования. На стадии созревания в условиях *in vitro* отмечали образование глобулярных, сердцевидных и торпедовидных эмбриоидов подобно развитию зиготических зародышей. Подобное развитие биполярных структур отмечали и у других видов растений [26, 32, 35, 43]. Некоторые первичные экспланты клематиса формировали сферические структуры диаметром $0,1-0,5 \text{ мм}$, которые не развивались в полноценные растения.

Прорастание соматических зародышей происходило в течение достаточно длительного периода культивирования (30-40 сут). Сначала отмечали рост корешка. На следующем этапе происходило вытягивание и окрашивание гипокотилия в зеленый цвет. Было установлено, что развитие соматических зародышей в условиях *in vitro* зависело от его морфологического типа.

Таблица 3

**Образование соматических зародышей клематиса на питательной среде МС,
дополненной зеатином**

Концентрация зеатина, мкМ	К-во эксплантов, образующих эмбриониды, %	К-во образовавшихся соматических зародышей / эксплант, шт.	
		2 недели	4 недели
контроль (0)	0	0	0
0,4	20 ± 2,7	0	4 ± 0
0,9	25 ± 7,3	2 ± 0	7 ± 0
1,8	80 ± 6,0	10 ± 3,1	25 ± 2,6
4,5	0	0	0

Наблюдения в процессе экспериментов позволили выявить 7 морфологических типов образовавшихся соматических зародышей клематиса: 1) односемядольный (эмбрионид формируется с одной семядолью, а вторая, чаще всего, недоразвита или полностью редуцирована); 2) двусемядольный (напоминает зиготический зародыш клематиса); 3) полисемядольный (образующийся и развивающийся эмбрионид имеет три и более семядолей); 4) трубчатый (семядоли эмбриоида срастаются между собой в виде трубы); 5) эмбрионид с вытянутым гипокотилем и практически редуцированными семядолями (семядоли зародыша очень узкие и в зоне эпикотилия апекс не выражен); 6) эмбрионид подобный зиготическому зародышу (внешнее сходство с зиготическим зародышем, однако развитие останавливается на этапе раскрытия семядолей, затем эмбрионид погибает); 7) эмбрионид, имеющий форму цветной капусты, семядоли которого очень сильно разрастаются и деформируются (рис. 3).

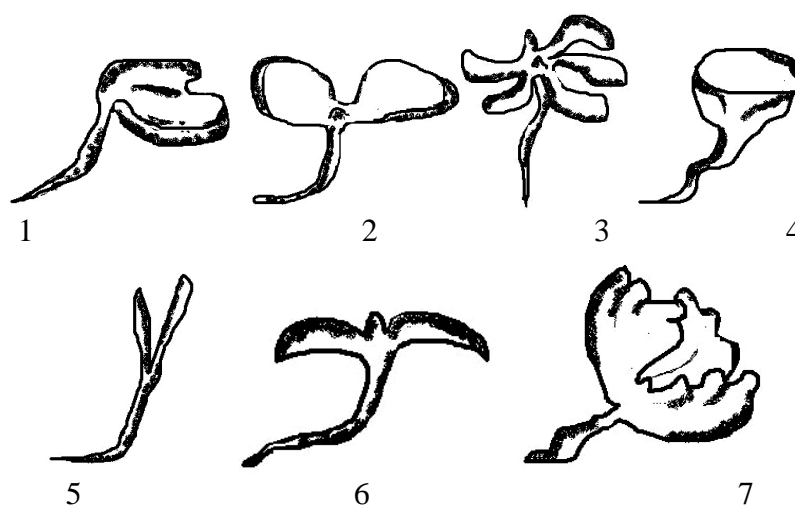


Рис. 3. Морфологические типы соматических эмбрионидов клематиса, сформированных в культуре *in vitro*: 1 – односемядольный; 2 – двусемядольный; 3 – полисемядольный; 4 – трубчатый; 5 – эмбрионид с вытянутым гипокотилем; 6 – эмбрионид, подобный зиготическому зародышу; 7 – эмбрионид, имеющий форму цветной капусты

При последующем культивировании всех типов соматических зародышей и эмбриоподобных структур было установлено, что только 4 морфологических типа эмбриоида имели способность к регенерации растений – № 1-4.

При культивировании соматического зародыша чаще всего наблюдали одновременное прорастание побега и корня. Однако корни развивались более активно. Подобное нормальное развитие биполярных соматических зародышей отмечено рядом исследователей

и на других видах растений [11, 27-29, 42]. Характерной особенностью проростков клематиса было образование и рост 2-х корешков без ярко выраженных корневых волосков.

Последующие субкультивирование соматических зародышей на среду, содержащую 1,8 мкМ зеатина и различные концентрации ИМК, приводило к образованию вторичных эмбриоидов на поверхности уже сформированных и развивающихся соматических зародышей (табл. 4).

Таблица 4

Влияние концентрации ИМК на вторичный эмбриогенез клематиса

Концентрация ИМК, мкМ	К-во эмбриоидов, формирующих вторичные зародыши, %	К-во вторичных эмбриоидов / эксплант, шт.	
		2 недели	4 недели
контроль (0)	0	0	0
0,4	33 ± 1,7	3 ± 0,1	12 ± 0,1
0,9	95 ± 10	15 ± 2,7	30 ± 5,2
1,8	29 ± 1,2	2 ± 0,1	5 ± 0,1
4,5	10 ± 2,1	0	2 ± 0,1

В процессе эксперимента было установлено, что частота вторичного эмбриогенеза зависела от концентрации ИМК в питательной среде. Оптимальной оказалась концентрация 0,9 мкМ ИМК, при которой среднее количество эмбриоидов на эксплант составило 30±5,2 штук. Средний размер зародыша в начале семядольной стадии достигал 1,5±0,7 мм. На свету в течение 30 сут размер семядолей составил 4-5 мм. Образовавшиеся вторичные эмбриоиды легко отделялись друг от друга. Культивирование отделенных вторичных соматических зародышей показало, что если эмбриоид помещали в культуральный сосуд, он активно начинал развиваться и расти и на 30-45 сутки достигал размера 9-10 мм. Высокие концентрации ИМК угнетали рост эмбриоидов и значительно снижали частоту вторичного эмбриогенеза клематиса.

Наряду с этим, дополнительные соматические зародыши формировались на проростках, развивающихся из эмбриоидов в зоне между гипокотилем и эпикотилем. Эта зона, на наш взгляд, являлась центром индукции образования новых соматических зародышей (рис. 4).

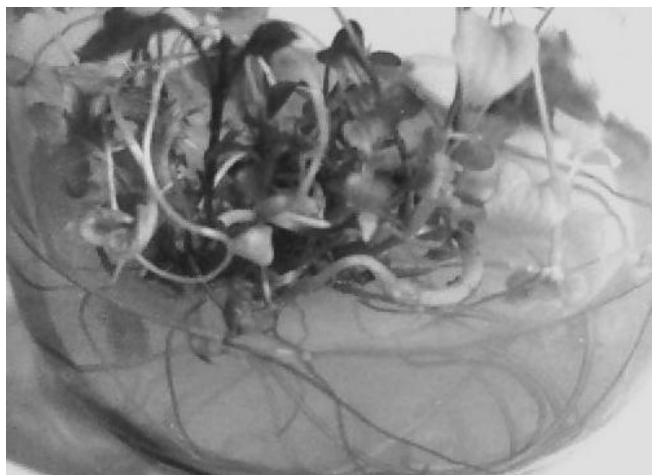


Рис. 4. Вторичный эмбриогенез клематиса сорта Серенада Крыма на питательной среде МС, дополненной 1,8 мкМ зеатина и 0,9 мкМ ИМК

Очень часто ученым не удается найти такой центр и поддерживать фазу образования зародышей на определенном уровне. Культивируя соматические зародыши клематиса на питательной среде МС, содержащей 1,8 мкМ зеатина и 0,9 мкМ ИМК, нам удалось поддерживать постоянное формирование эмбриоидов на протяжении 2-3 лет, снизив количество пассажей до 6-7 в год. Вторичные эмбриоиды, развиваясь в проростки, также в зоне между гипокотилем и эпикотилем формировали дополнительные соматические зародыши.

Роль интенсивности освещения и температуры в процессе непрямого соматического эмбриогенеза клематиса

В ряде работ было показано, что существует тесная взаимосвязь между действием качества света на растение и накоплением в нем отдельных гормонов и ингибиторов роста [8, 16]. Известно также, что оптимальная температура, при которой культивируются соматические зародыши большинства видов растений находится в пределах 21-25 °С [27, 28, 32].

Нами в процессе исследований было выявлено воздействие физических факторов на развитие соматических зародышей в каллусе клематиса. На рисунке 5 показано, что понижение и повышение температуры не влияет столь значительно на развитие эмбриоидов. Наилучший результат образования соматических эмбриоидов был получен при температуре 26°С. Количество соматических зародышей достигало $30 \pm 5,8$ штук на эксплант. Однако среди зародышей можно было наблюдать эмбриоиды на разных стадиях развития: от глобулярной до семядольной.

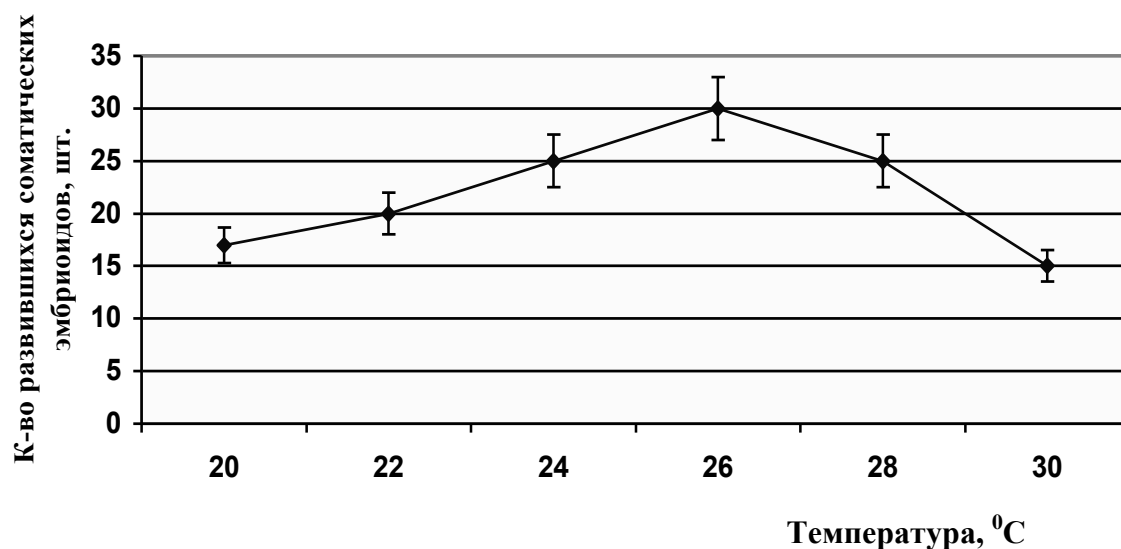


Рис. 5. Зависимость частоты образования соматических зародышей клематиса от воздействия температуры в процессе культивирования *in vitro*

В отличие от температуры, интенсивность освещения оказывала значительное влияние на частоту соматического эмбриогенеза. Уменьшение интенсивности освещения до $12,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ резко снижало частоту соматического эмбриогенеза (рис. 6). Определено оптимальное значение интенсивности освещения ($40 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), при котором количество развившихся эмбриоидов достигало 25-30 штук на эксплант. Все соматические зародыши имели ярко-зеленую окраску. Кроме того, было установлено, что 80% эксплантов, культивируемых при такой интенсивности освещения, имели компетентные клетки, способные образовывать незиготические зародыши.

Результаты экспериментов по влиянию интенсивности освещения на получение соматических зародышей клематиса значительно отличаются от таковых, проводимых на других культурах, так как обычно эмбриоиды образуются в темноте [12, 22, 24, 37, 40]. Это еще раз подтверждает необходимость тщательного изучения особенностей регенерации и подбора условий культивирования к каждому новому виду или сорту растений.

Таким образом, результаты, полученные в процессе экспериментов, позволили нам разработать способ непрямого соматического эмбриогенеза клематиса на примере сорта Серенада Крыма, состоящий из последовательных этапов, выполнение которых необходимо для получения полноценных растений клематиса.

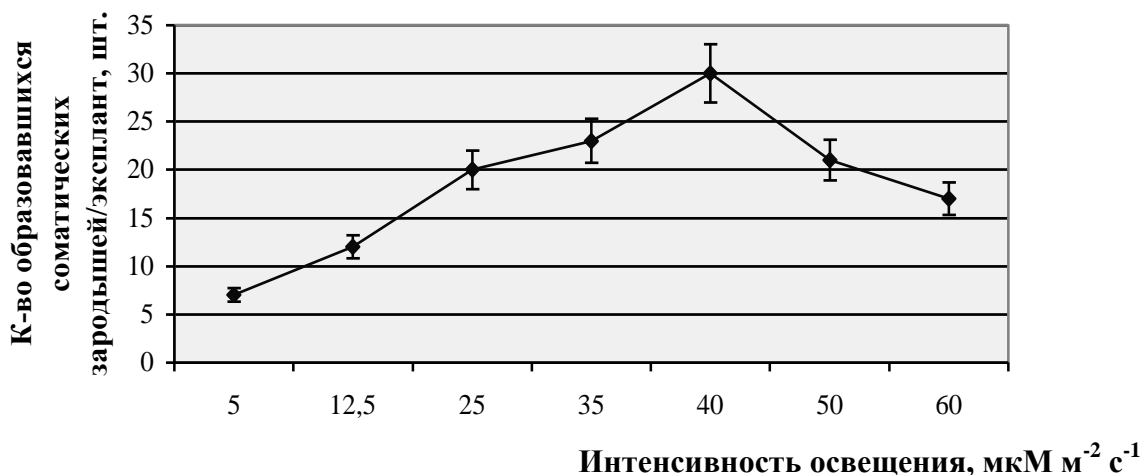


Рис. 6. Зависимость частоты соматического эмбриогенеза от влияния интенсивности освещения в процессе культивирования каллуса клематиса

В начале отбирались растения *in situ*, из которых вычленили меристему или вводили сегмент побега с почками в условия *in vitro*. Побег развивался и в его основании формировался каллус, этот каллус отделяли и помещали на питательную среду с зеатином для индукции образования эмбриогенных структур. Соматические зародыши образовывались в каллусе клематиса. Затем эмбриониды отделяли друг от друга и высаживали на среду для их прорастания. В зоне соединения гипокотилия и эпикотилия у развивающегося проростка образовывались дополнительные зародыши, и начинался прямой вторичный эмбриогенез. Частота вторичного эмбриогенеза не уменьшалась на протяжении 5-7 субкультивирований. Полученные растения адаптировали к условиям *in vivo*, а затем переносили в теплицу для дальнейшего доращивания. Нормально сформированные растения с мощной корневой системой высаживали в открытый грунт, где они зацветали сразу же, в первый год культивирования *in situ*. Весь цикл размножения клематиса через непрямой соматический эмбриогенез составил 1,5-2 года.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений: 35-е Тимиряз. чтен. – М.: Наука, 1975. – 50 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 242 с.
5. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
6. Донюшкина Е.А. Клематисы // Квіти України. – 1999. – № 10. – 72 с.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
8. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 4. – С.795-802.
9. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 730 с.
10. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: ПолиграфКонсалтинг, 2003. – 250 с.

11. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
12. Митрофанова И.В., Шевелуха В.С. Соматический эмбриогенез зизифуса (*Zizyphus jujube* Mill.) в культуре *in vitro* // Известия ТСХА. – 1995. – Вып. 1. – С. 120-127.
13. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
14. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высш. школа, 1960. – 205 с.
15. Риекстиня В.Э., Риекстиныш И.Р. Клематисы. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 287 с.
16. Уоринг Ф., Филипс И. Рост растений и дифференцировка. – М.: Мир, 1984. – 512 с.
17. Ahroni A., Zuker A., Rozen Y., Shejtman H., Vainstein A. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of *gypsophila* // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1997. – Vol. 49, N 2. – P. 101-106.
18. Ammirato P.V. Embryogenesis: Handbook of plant cell culture / Eds. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada. – New York: London: Macmillan, 1983. – Vol. 1. – P. 82-123.
19. Breton Ch., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., Jay-Allemand Ch. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of “Early Mature” walnut trees (*Juglans regia*) that flower *in vitro* // *Tree Physiology.* – 2004. – Vol. 24. – P. 425-435.
20. Carraway D.T., Merkle S.A. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut // *Can. J. For. Res.* – 1997. – Vol. 27. – P. 1805-1812.
21. Conde P., Loureiro J., Santos C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. // *Plant Cell Rep.* – 2004. – Vol. 22, N 9. – P. 632-639.
22. Dal Vesco L.L., Guerra M.P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* – 2001. – Vol. 64. – P. 19-25.
23. Dunstan D.I., Tautorus T.E., Thorpe T.A. Somaic embryogenesis in woody plants // *In Vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. T.A. Thorpe. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 471-538.
24. Fitch M.M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1993. – Vol. 32, N 2. – P. 205-212.
25. 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.
26. Hamama L., Baaziz M., Letouze R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of *jojoba* // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* – 2001. – Vol. 65. – P. 109-113.
27. Han K.H., Park Y.G. Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) // *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – V. 5. – Great Britain: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1999. – P. 149-161.
28. Jain S.M., Ishii K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
29. Litz R.E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees // *Tissue Culture in Forestry and Agriculture* / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin, A. Hollaender. – New York: Plenum Press, 1985. – P. 179-193.
30. Maheswaran G., Williams E.G. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro* // *Ann. Bot.* – 1985. – Vol. 56. – P. 619-630.
31. Mandegaran Z., Sieber V.K. Somatic embryogenesis in *Clematis integrifolia* x *C. viticella* // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2000. – Vol. 62, N 2. – P. 163-165.
32. Merkle S.A. Somatic embryogenesis in ornamentals // *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – P. 13-33.
33. Merkle S.A., Dean J.E. Forest tree biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11, N 3. – P. 298-302.
34. Mitrofanova I.V., Kin E.V., Mitrofanova O.V., Donushkina E.A. Obtaining of somatic embryos in tissue culture of *Clematis* L // *In vitro Plant Cell Biology, Biotechnology and*

Germplasm Preservation: Abst. VII Intl.Conf. (25-28 November 1997, Moscow, Russia). – Moscow, 1997. – P. 136.

35. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Pandei D.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujube* Mill. *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. – 1997. – Vol. 44, N 1. – P. 94-99.

36. 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.

37. Oliveira M.M., Pais M.S.S. Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit) // *Plant Cell Rep.* – 1992. – Vol. 11. – P. 314-315.

38. Onay A. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.) // *Turk. J. Bot.* – 2000. – Vol. 24. – P. 91-95.

39. Pierik R.L.M. *Anthuriuml andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* // *Physiol. Plant.* – 1976. – V. 37. – P. 80-82.

40. Piven N.M., Barredo-Pool F.A., Borges-Argáez I.C., Robert N.L. Key events in the regulation of somatic embryogenesis in monocots: Agaves // *Bull. State Nikitsky Bot. Gardens.* – 2002. – N 86. – P. 12-16.

41. *Plant Cell, Tissue and Organ Fundamental Methods* / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Heidelberg: New York: Springer Verlag, 1995. – 360 p.

42. Salajova T., Salaj J., Kormutak A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. // *Plant Sci.* – 1999. – Vol. 145. – P. 33-40.

43. Souter M., Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis // *J. Exp. Bot.* – 2000. – Vol. 51. – P. 971-983.

**Indirect somatic embryogenesis of *Clematis* sp.
Mitrofanova I.V., Sokolov O.I., Yezhov V.N.**

The results of plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Clematis* have been represented. Influence of culture medium, phytohormone concentration, intensity of illumination and temperature on inducing of somatic embryos formation and developing has been determined.