

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРЯМОГО СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА 8 СОРТОВ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS SP.*)

И.В. МИТРОФАНОВА¹, кандидат биологических наук;

Н.В. ЗУБКОВА¹;

М.К. СОКОЛОВА²

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Институт биохимии и физиологии растений микроорганизмов РАН

Прямой соматический эмбриогенез представляет собой процесс образования соматических эмбриоидов непосредственно из клеток соматических тканей экспланта в условиях *in vitro* и в большей степени подобен формированию зиготических зародышей. Впервые этот путь регенерации растений был описан в 1980 году [51]. Клетки, из которых образуется соматический зародыш, были названы как «проэмбриогенные детерминированные клетки» (ПЭДК), которые уже сами по себе работают на развитие эмбриоида. Соматическое развитие зародышей очень пластично и подвержено влиянию, как самой культуры, так и условий культивирования. В настоящее время уже установлено, что основными параметрами, определяющими соматический эмбриогенез, являются тип экспланта, стадия развития экспланта и взаимодействие между средой и эксплантом [1, 6, 7, 14, 27, 37, 47, 54].

В настоящее время о разработке соматического эмбриогенеза как способа регенерации растений *in vitro* известно у ряда покрытосеменных и голосеменных древесных растений, таких как *Abies* [56], *Acacia* [52], *Aesculus* [32], *Agave* [47], *Albizia* [55], *Betula* [18], *Citrus* [25], *Eucalyptus* [43], *Juglans* [15], *Liriodendron* [38], *Pinus* [50], *Populus* [39], *Prunus* [16], *Robinia* [28], *Salix* [26], *Tilia* [17], *Zizyphus* [8, 40].

Изучив особенности непрямого соматического эмбриогенеза на примере сорта клематиса Серенада Крыма [42], нами была поставлена задача по созданию системы прямого соматического эмбриогенеза из вегетативных почек 8 сортов клематиса: Серенада Крыма, Юность, Невеста, Crimson Star, Космическая Мелодия, Вечный Зов, Ай-Нор, Лесная Опера, относящихся к 3 группам (Ланугиноза, Жакмана, Витицелла). Необходимо было оценить их способность к регенерации растений в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей клематиса выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра с 1996 по 2005 гг. Гистохимические исследования проведены в лаборатории физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия).

Для исследований были отобраны ряд сортов различных групп:

а) группа Ланугиноза (сорта Серенада Крыма, Юность, Невеста, Crimson Star) характеризуется массовым цветением весной на перезимовавшем приросте прошлого года. Летом или осенью более слабое цветение может повториться на приросте текущего года. Их побеги достигают длины до 2,5 м. Цветки широко раскрытые, как правило, одиночные, крупные, диаметром до 16-20 см, из 6-8 чашелистиков, преимущественно светлой окраски;

б) группа Жакмана (сорта Космическая Мелодия, Вечный Зов). Представители группы отличаются пышным цветением, которое происходит летом на приросте текущего года. На зиму их побеги, достигающие длины 3-4 м, обрезают до уровня почвы. Сорта этой группы развивают мощную корневую систему и имеют крупные цветки диаметром от 8 до 15 см, чаще всего сине-фиолетово-пурпурных тонов, без запаха, с простым околоцветником из 4-6 окрашенных чашелистиков.

в) группа Витицелла (Ай-Нор, Лесная Опера). Растения обильно цветут на приросте текущего года, поэтому на зиму их побеги следует обрезать до уровня почвы. Это древесные

лианы длиной до 3-3,5 м, обычно с желтеющими и обгорающими у основания побегов листьями. Цветки крупные, диаметром до 12 см и более, раскрытые или несколько поникающие, чаще всего из 5-6 чашелистиков, с преобладанием в окраске розово-красно-пурпурных бархатистых тонов.

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

Для снижения контаминации побеги с почками клематиса предварительно протирали 96%-ным этанолом. В процессе собственно стерилизации растительных эксплантов использовали различные антисептики, такие как 70%-ный этиловый спирт, 2,5%, 3%, 4%-ные растворы гипохлорита натрия (NaClO), 0,08%-ный раствор AgNO₃, 1%-ный раствор Thimerosal. 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 питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [44]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамин-НСl, 2,43 мкМ пиридоксина-НСl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. рН среды доводили до показателя 5,6 [41].

Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* клематиса в питательную среду вводили 6-бензиламинопуридин (БАП) *Sigma* (США) в концентрации 0,44-8,80 мкМ и 0,09 мкМ β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК) *Sigma* (США). В качестве основного углевода для культивирования органов и тканей была использована сахароза в концентрации 20-30 г/л.

Пробирки и колбы с эксплантами помещали в культуральную комнату, где в зависимости от культивируемого объекта исследования и эксперимента поддерживалась температура 24 °С, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения 40 мкМ м⁻² с⁻¹ и 70%-ная относительная влажность воздуха.

Субкультивирование тканей и органов проводили через 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°C, после чего заливали в ПЭГ-1500 [4, 11, 12].

Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон. 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; промывали дистиллированной водой. Затем срезы подсушивали и заключали в синтетическую среду DePex (*Serva*, Германия).

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DMLB» (Германия).

Результаты и обсуждение

Этап введения растений в условия *in vitro* является одним из самых сложных. От него зависит, сможет ли исследователь в дальнейшем изучить морфогенетический потенциал органов и тканей и разработать эффективную биотехнологическую систему получения растений. Отбирая исходный эксплант, необходимо выявить оптимальные сроки введения в культуру *in vitro* и определить оптимальный способ стерилизации растительного материала.

Известно, что у многих растений способность к регенерации в культуре органов и тканей ограничена периодом вегетативного роста. Так ткани, отобранные для введения в условия *in vitro* в период покоя, интенсивнее образуют корни. При этом экспланты, вычлененные в период активного роста материнского растения, могут образовывать почки и побеги [7, 9].

В опытах с клематисом были использованы вегетативные почки сортов Серенада Крыма, Юность, Невеста, Crimson Star, Космическая Мелодия, Вечный Зов, Ай-Нор, Лесная Опера, которые отбирали в период покоя (декабрь-январь), в начале фазы вегетации (февраль-апрель), а

также в мае-июне. Предварительные опыты показали, что растительный материал, отобранный нами с материнских растений в период с июля по ноябрь, не был способен к регенерации растений или количество почек, образующих микропобеги, не превышало 5-10% на всех испытанных нами питательных средах. В процессе исследований были установлены оптимальные сроки введения вегетативных почек в условия *in vitro* (рис. 1).

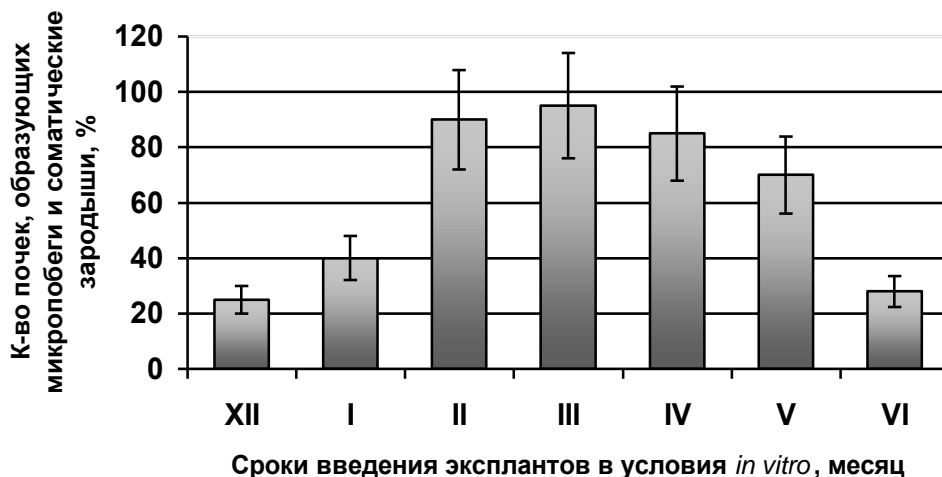


Рис. 1. Зависимость регенерационного потенциала вегетативных почек клематиса от сроков введения в условия *in vitro*

Основным показателем, характеризующим эксплант на данном этапе изучения, была его способность к регенерации в условиях *in vitro*. Так, в период с февраля по апрель количество почек, образующих микропобеги или соматические зародыши, достигало 90-100%. Кроме того, было отмечено, что и при последующем субкультивировании регенерационный потенциал таких эксплантов не снижался, а наоборот увеличивался от пассажа к пассажи. Количество почек, способных к регенерации в декабре и январе, не превышало показателя 25-40%. В мае – с началом развития почек возникали также трудности на этапе стерилизации первичных эксплантов, из-за этого количество почек, способных к регенерации составило 70%. Кроме повышения уровня контаминации происходило значительное повреждение тканей в результате действия стерилизующих агентов.

Известно, что культивирование древесных и кустарниковых растений в условиях *in vitro* является более сложным процессом, чем травянистых [5]. В частности, это связано с трудностями получения асептической культуры [3, 9, 31]. Ряд исследователей используют повторную стерилизацию эксплантов традиционными стерилизующими веществами перед введением в условия *in vitro* [22, 23] или культивирование изолированных эксплантов в течение нескольких суток на провокационных средах, что стимулирует проявление скрытой инфекции, с последующей повторной стерилизацией заинфицированных эксплантов [34]. В последние годы все более активно в питательные среды добавляют антибиотики. Однако антибиотики, наряду с бактерицидным действием, могут быть токсичными для растительных тканей и ингибировать развитие и рост эксплантов [48, 49, 58].

Вегетативные почки клематиса для введения в условия *in vitro* отбирали с побегов предыдущего года и проводили сравнительное изучение различных способов стерилизации, учитывая в экспериментах количество инфицированных, потемневших и развившихся почек. В таблице 1 приведены результаты получения асептической культуры клематиса.

Таблица 1

**Результаты по получению асептической культуры вегетативных почек клематиса
после использования различных способов стерилизации**

Антисептик	Режим стерилизации, мин	Количество почек, %		
		инфицированных	потемневших	развившихся
70% C ₂ H ₅ OH 2,5% NaClO	1	84,0 ± 9,8	0	16,0 ± 5,1
	15			
70% C ₂ H ₅ OH 2,5% NaClO	1	48,0 ± 6,8	10,0 ± 3,5	52,0 ± 8,4
	20			
70% C ₂ H ₅ OH 3% NaClO	1	68,0 ± 7,3	21,0 ± 5,7	21,0 ± 2,5
	10			
70% C ₂ H ₅ OH 3% NaClO	1	8,0 ± 3,8	14,0 ± 2,7	78,0 ± 7,6
	15			
70% C ₂ H ₅ OH 4% NaClO	1	0	2,0 ± 1,6	98,0 ± 10,6
	15			
70% C ₂ H ₅ OH 4% NaClO	1	43,0 ± 6,9	20,0 ± 5,1	37,0 ± 5,2
	10			
1% Thimerosal 70% C ₂ H ₅ OH 0,08% AgNO ₃	10	22,0 ± 4,8	55,0 ± 5,3	23,0 ± 3,9
	1			
	2-3			

Использование 2,5%-ного и 3%-ного раствора гипохлорита Na в качестве стерилизующего агента не способствовало значительному снижению контаминации. В этом случае количество инфицированных эксплантов составило 48-84%. Обработка растительного материала 4%-ным раствором гипохлорита Na (экспозиция – до 10 мин) оказалась также неэффективной. Кроме того, основную часть составляла скрытая инфекция, которая проявлялась через 2-3 недели культивирования. Неэффективным оказался и способ последовательной стерилизации с использованием 70%-ного этилового спирта, 1%-ного раствора Thimerosal и 0,08%-ного раствора AgNO₃. Отсутствие дезинфицирующего эффекта, на наш взгляд, было обусловлено тем, что плотно прилегающие друг к другу листовые примордии препятствуют проникновению вглубь стерилизующих агентов. Наряду с этим, побеги с почками отбирали с нижней части стебля, поэтому растительный материал был значительно загрязнен почвой. Стерилизация отрастающих почек также оказывалась малоэффективной, так как антисептик легко проникал в ткани экспланта, что способствовало мгновенному его потемнению и гибели. Увеличение экспозиции также приводило к потемнению тканей, при этом количество инфицированных эксплантов уменьшалось лишь на 10%. Дополнительное использование антибиотика – доксицилина гидрохлорида в концентрации 0,158-1580,0 мкМ для уменьшения бактериальной инфекции элиминировало бактериальное заражение, однако действие этого антибиотика оказывало отрицательное действие на последующее развитие почек.

Из испытанных нами приемов единственно эффективным оказался способ последовательного применения 70%-ного этилового спирта и 4%-ного раствора гипохлорита Na (экспозиция 15 мин), после которого растительный материал трижды промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 15-20 мин. Количество стерильных эксплантов достигало 98%. После стерилизации и удаления покровных чешуй с помощью стерильных инструментов под бинокулярным микроскопом марки МБС-9 сегмент побега с почками переносили на питательную среду для индукции побегообразования или соматического эмбриогенеза.

Для индукции соматического эмбриогенеза было взято вещество цитокининового типа действия БАП и испытано в различных концентрациях (0,44-8,80 мкМ) на фоне постоянной концентрации ИМК, которая составила 0,09 мкМ (рис. 2).

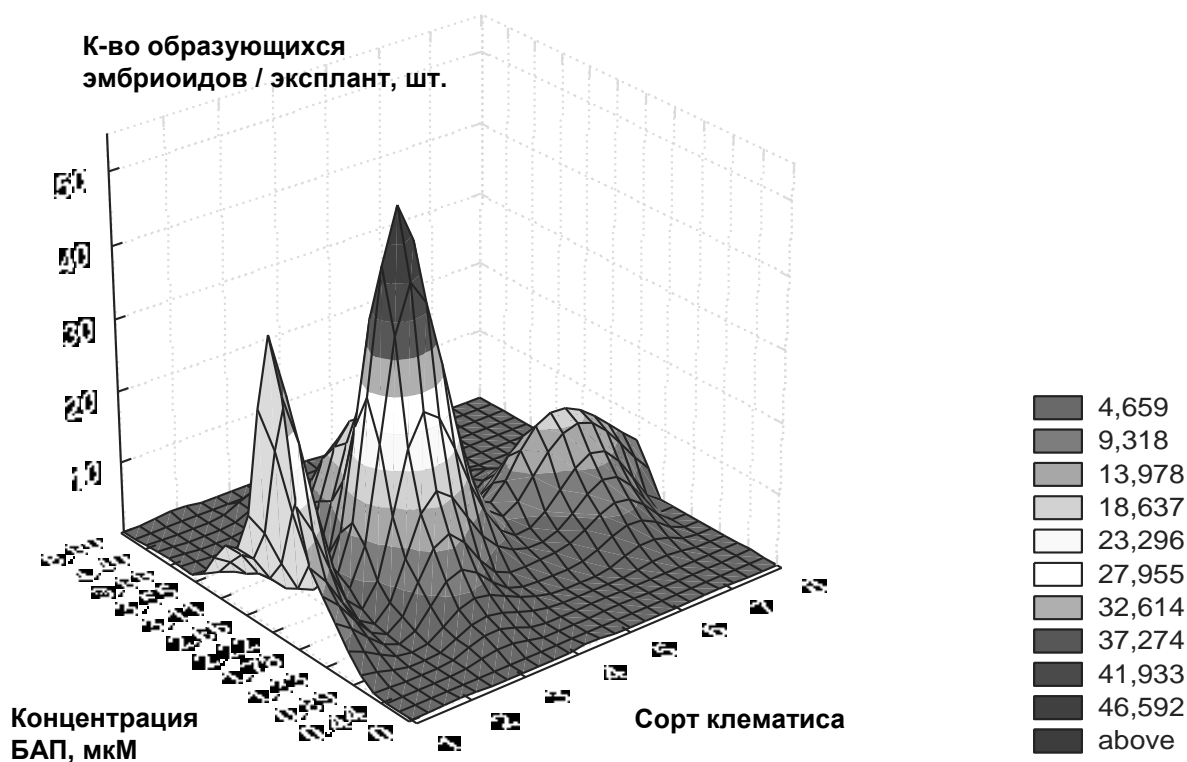


Рис. 2. Зависимость образования соматических зародышей через прямой соматический эмбриогенез у разных сортов клематиса от содержания БАП в питательной среде МС. Сорта клематиса: 1 – Серенада Крыма; 2 – Юность; 3 – Невеста; 4 – Crimson Star; 5 – Космическая Мелодия; 6 – Вечный Зов; 7 – Ай-Нор; 8 – Лесная Опера

В результате проведенных экспериментов нам впервые удалось индуцировать прямой соматический эмбриогенез у всех исследуемых сортов клематиса. Различие заключалось в том, что через 30 сут после помещения почки на питательную среду количество образовавшихся соматических зародышей отличалось у каждого сорта, культивируемого в условиях *in vitro*. Наряду с этим, была установлена зависимость способности эксплантов формировать эмбриониды от концентрации БАП в питательной среде. Как видно на рисунке 2, оптимальной оказалась концентрация БАП равная 2,22 мкМ, присутствие которой в среде индуцировало соматический эмбриогенез и образование максимального количества зародышей у всех сортов клематиса. На контрольной среде без фитогормонов лишь в единичных случаях наблюдали развитие микропобегов у сортов Юность, Crimson Star, Космическая Мелодия, Лесная Опера. Увеличение концентрации БАП до 4,40 мкМ также способствовало побегообразованию, а не формированию эмбрионидов, однако количество микропобегов было значительно меньше, чем при культивировании на среде, дополненной 2,22 мкМ. Кроме того, нами было отмечено, что более высоким морфогенетическим потенциалом обладали почки сортов клематиса, относящихся к группам Ланугиноза и Жакмана. Так количество соматических зародышей у сорта Невеста составляло около 40 штук на эксплант.

У всех исследуемых сортов образование соматических зародышей происходило непосредственно на поверхности вегетативных почек, чаще всего в зоне меристематических клеток апекса. Уже на 20 сутки отмечали появление массы глобулярных структур (рис. 3, а). Сами структуры были абсолютно гладкие, округлой или чуть продолговатой формы светло-зеленого и желтоватого цвета. Изначально эти структуры очень плотно прилегали друг к другу. В таком виде они могли находиться до стадий сердечка, торпеды или семядольной (рис. 3, б).

После этого на 30-40 сутки культивирования эмбриониды начинали свободно отделяться друг от друга. Однако этот процесс зависел от сорта клематиса. Лучше всего отделялись друг от друга соматические зародыши сортов Юность, Невеста, Crimson Star и Ай-Нор. Характерной особенностью эмбрионидов в этот период было прорастание корешка. После этого начиналась регенерация микропобега (рис. 4, а, б). Средняя длина корешка и побега через 14 суток после начала прорастания практически не различалась у исследуемых сортов.

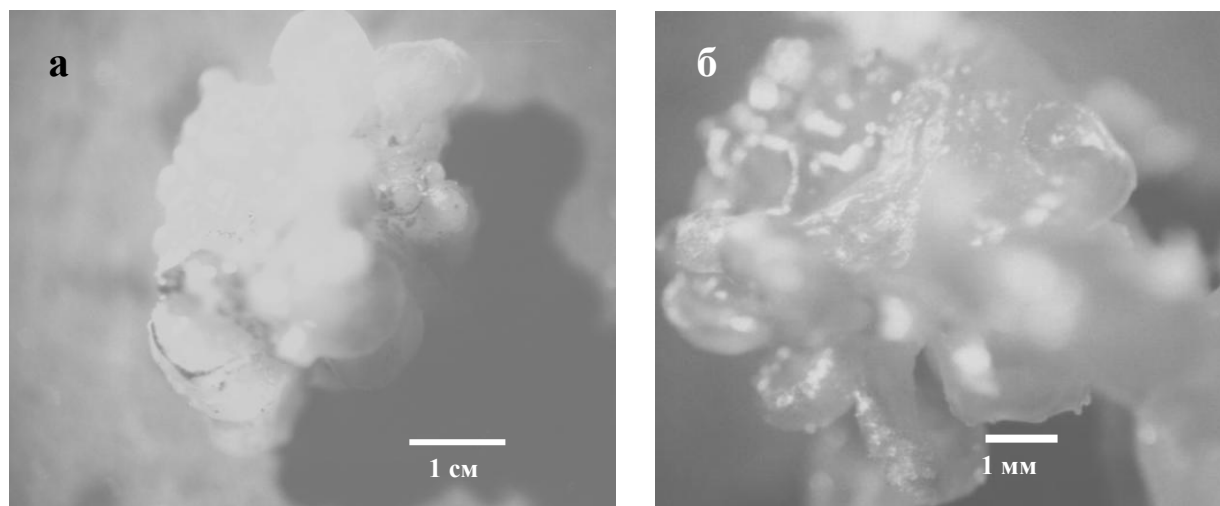


Рис. 3. Соматические зародыши, образовавшиеся на поверхности апикальной меристемы клематиса сорта Ай-Нор: а – глобулярные структуры; б – семядольная стадия развития эмбрионидов

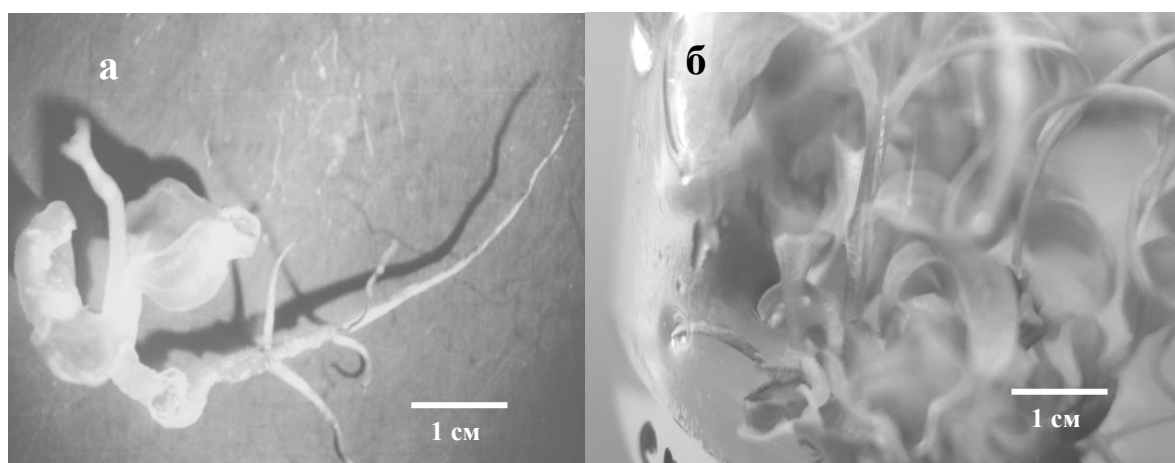


Рис. 4. Развитие проростков из соматических зародышей клематиса: а) микрофотография проростка; б) массовое прорастание соматических зародышей

В таблице 2 представлены показатели средней длины микропобегов и корней проростков, полученных из соматических зародышей через 21 сутки культивирования. Как видно из результатов исследования, достаточно активно развивались корни сортов Невеста, Crimson Star, Вечный Зов, Ай-Нор и их средняя длина составила $4,8 \pm 1,5$, $4,5 \pm 1,2$, $4,2 \pm 1,1$, $3,9 \pm 1,1$ соответственно. Кроме того, у проростков сортов Невеста, Crimson Star и Ай-Нор формировалось от 2,1 до 2,5 корешков на эксплант.

Таблица 2

Морфологические параметры проростков клематиса, полученных из соматических зародышей через 21 сут от начала их прорастания

Сорт	Средняя длина побега, см	Среднее к-во корней, шт	Средняя длина корня, см
Серенада Крыма	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,1 ± 1,0
Юность	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,3 ± 1,2
Невеста	1,7 ± 0,4	2,5 ± 1,1	4,8 ± 1,5
Crimson Star	1,4 ± 0,2	2,1 ± 1,3	4,5 ± 1,2
Космическая Мелодия	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,1 ± 1,3
Вечный Зов	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	4,2 ± 1,1
Ай-Нор	1,3 ± 0,3	2,3 ± 1,2	3,9 ± 1,1
Лесная Опера	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,0 ± 1,4

Наряду с этим, характерной особенностью этих сортов была способность первичных соматических зародышей ко вторичному эмбриогенезу. Частота вторичного эмбриогенеза различалась у исследуемых сортов. Высокая частота эмбриогенеза, которая достигала 65-100% была отмечена у сортов Невеста, Crimson Star, Серенада Крыма, Юность, Ай-Нор при культивировании на среде, содержащей 2,2 мкМ БАП (табл. 3). Остальные три сорта проявляли низкую частоту вторичного эмбриогенеза, которая не превышала 30-50%.

Вместе с тем было установлено, что вторичные соматические зародыши всех исследуемых сортов формируются непосредственно на поверхности первичных эмбриоидов без этапа каллусообразования (рис. 5). Однако в этом случае прохождение всех видимых визуальнo стадий развития эмбриоида происходит синхронно. Индукция образования эмбриоида, его формирование и развитие, а также регенерация растений происходили на одной и той же питательной среде. Если соматические зародыши отбирали на глобулярной, сердцевидной и торпедовидной стадиях и помещали на среды с уменьшенным содержанием БАП или без цитокинина, эмбриоиды останавливали свое развитие и могли в течение 2-3 недель находиться без признаков роста. Таким образом, зародыши можно было сгруппировать по размеру и стадии развития и затем пускать их в размножение в биотехнологической системе когда это потребуется.

Таблица 3

Вторичный эмбриогенез у различных сортов клематиса при культивировании первичных соматических зародышей на средах, дополненных БАП

Сорт	Частота вторичного эмбриогенеза, %	
	Концентрация БАП, мкМ	
	0,89	2,22
Серенада Крыма	15 ± 1,3	65 ± 4,5
Юность	43 ± 3,7	100
Невеста	24 ± 2,1	95 ± 4,7
Crimson Star	19 ± 2,6	100
Космическая Мелодия	0	34 ± 3,9
Вечный Зов	0	47 ± 4,9
Ай-Нор	27 ± 3,9	92 ± 4,2
Лесная Опера	0	50 ± 2,5

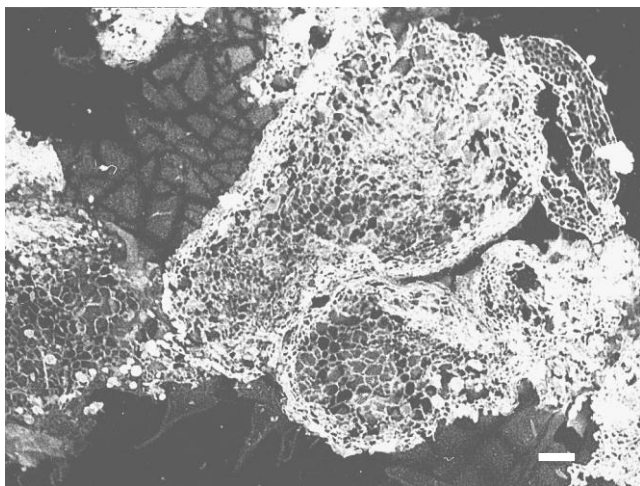


Рис. 5. Образование вторичных эмбрионов на поверхности первичных соматических зародышей клематиса

Кроме того, нами было отмечено, что существовала зона активизации образования соматических зародышей – то есть существовал эксплант клематиса, который был способен индуцировать соматический эмбриогенез как первичный, так и вторичный. Такой эксплант был назван нами «индуктор». Его появление в любом из культуральных сосудов вызывало образование соматических эмбриоидов. Этот индуктор мог состоять из одного или группы соматических зародышей. Возможно именно этот индуктор и является центром эмбриогенеза растений *in vitro*. Известно, что у животных реагирующая система, дифференцируясь под влиянием индуктора, часто сама

становится индуктором для возникающих зачатков органов и тканей и все развитие эмбриона представляет собой цепь следующих друг за другом индукционных взаимодействий [2]. Подобное было отмечено нами у исследуемых растений клематиса. Можно предположить, что воздействие индуктора на соседние экспланты происходит через питательную среду, в которую выделяются индуцирующие вещества (метаболиты, гормоны и др.) или возможно это влияние электрических полей, передающихся от экспланта к экспланту непосредственно в культуральном сосуде. Использование нами среды, на которой находился индуктор, для активизации соматического эмбриогенеза клематиса не дало положительных результатов. Это дало нам возможность исключить влияние индуктора через питательную среду. Или может быть действие через среду кратковременно и нам не удалось зафиксировать этот момент. Наряду с этим, для осуществления индукции необходимо, чтобы клетки, подвергающиеся воздействию индуктора, обладали соответствующей компетенцией. Когда речь идет о биотехнологической системе размножения *in vitro* в регенерации растений участвуют только компетентные клетки. Кроме того, детерминация индуцированных клеток клематиса наступала на 7-8 сутки культивирования.

Данные литературных источников, касающихся величины эмбриогенного потенциала культивируемых клеток растений, свидетельствуют о том, что из 10^3 - 10^4 клеток лишь одна обнаруживает способность к формированию соматического зародыша [29]. На суспензионной культуре моркови был применен оригинальный способ, предусматривающий фракционирование исходных клеточных суспензий и выделение из них клеточных фракций, характеризующихся высоким эмбриогенным потенциалом [13, 24]. Известно, что способы фракционирования позволяют получать в препаративных количествах фракции одиночных глобулярных, сердцевидных, торпедовидных эмбриоидов и проростков [10].

Проявление воздействия индуктора на соматический эмбриогенез, выражающееся в активном образовании дополнительных зародышей на эксплантах, помещенных на питательную среду, было отмечено практически у всех сортов клематиса кроме сорта Космическая мелодия. Возможно, у данного сорта нам не удалось выявить такой зоны активации эмбриогенных процессов. Удаление индуктора из культурального сосуда значительно снижало частоту эмбриогенеза или регенерации вообще не происходило. Кроме того, было отмечено, что индуктор может работать достаточно продолжительный отрезок времени. У сортов Юность, Невеста и Crimson Star это явление наблюдали на протяжении 2-3 лет. Таким образом, как в случае с первичным соматическим эмбриогенезом, так и с вторичным наиболее эффективно работала биотехнологическая система у группы клематисов Лангуиноза.

Несмотря на имеющиеся публикации о критическом периоде в процессе регенерации растений *in vitro* и необходимости смены питательных сред на разных этапах морфогенеза [10, 37], нами было отмечено, что у исследуемых сортов клематиса не наблюдали привыкмости клеток к экзогенным фитогормонам и приостановления процесса эмбриогенеза. Именно соматический зародыш или группа соматических зародышей являются тем критическим фактором, который стимулирует или тормозит процесс образования проэмбрио. На рисунке 6 можно увидеть именно такой центр индукции эмбриогенеза, где дополнительные зародыши образуются, развиваются и прорастают.



Рис. 6. Зона активизации образования вторичных соматических зародышей на среде МС, дополненной 2,22 мкМ БАП

Вторичные зародыши формируются чаще всего по краю семядолей соматических эмбриоидов. Было отмечено также образование зародышей непосредственно из апикальной зоны эмбриоидов. Первоначально наблюдали образование прозрачных структур круглой формы, затем они становились белыми и увеличивались в размерах. Так как этот процесс происходил на свету глобулярные эмбриоиды окрашивались в зеленый цвет и имеют гладкую блестящую поверхность. зародыши плотно прилегали друг к другу, но их легко можно было разделить между собой. На основании проведенных исследований были определены основные факторы, влияющие на процесс прямого соматического эмбриогенеза

клематиса (рис. 7). Такими факторами являлись: концентрация экзогенного цитокинина БАП, температура, интенсивность освещения, индуктор соматического эмбриогенеза и генотип. Было установлено, что при концентрации БАП 2,22 мкМ, температуре 24 °С и интенсивности освещения 40 мкМ м⁻² с⁻¹ активизация процессов первичного и вторичного соматического эмбриогенеза происходит только в присутствии индуктора. Доля его влияния составила 50%. Доля влияния генотипа (сорт клематиса, отобранный для исследований) не превышала 30%. Доля влияния концентрации БАП достигала 10%. Доли влияния температуры и интенсивности освещения занимали соответственно по 5%.

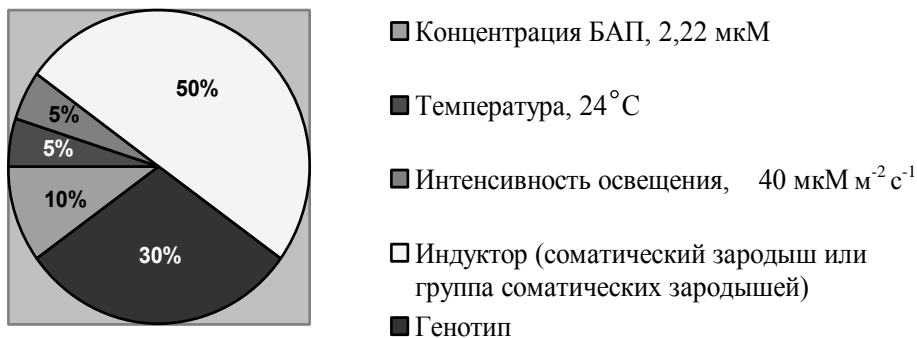


Рис. 7. Долевое влияние основных факторов на процессы прямого соматического эмбриогенеза клематиса

Таким образом, исходя из результатов исследований, нами было установлено, что дальнейшее развитие соматических эмбриоидов и получение полноценных регенерантов клематиса протекает в тех же условиях, что и индукция соматического эмбриогенеза. В отличие от многих других видов растений, при размножении которых через соматический эмбриогенез последовательно используются две или три питательные среды [20, 25, 36, 46,

53, 57], у клематиса на одной и той же среде были получены соматические зародыши и регенеранты. Интересным оказался и тот факт, что в качестве экзогенного фитогормона индуцирующего формирование соматических зародышей использовали цитокинин БАП, хотя у большинства растений, культивируемых *in vitro* для этой цели используется вещество ауксинового типа действия 2,4-Д [19, 21, 29, 33, 35, 45].

На основании этих исследований разработаны способ прямой регенерации, позволяющий на одной питательной среде непосредственно из вегетативной почки получать соматические зародыши и регенеранты у 8 сортов клематиса. Представленная система соматического эмбриогенеза позволяет не только размножать виды и сорта клематиса, но и затем сохранять растительный материал в форме медленнорастущих коллекций *in vitro* и пополнять коллекции других ботанических садов.

Список литературы

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. Ун-та, 2002. – 232 с.
2. Биологический энциклопедический словарь / Под ред. М.С. Гилярова. – 2-е изд. – М.: Сов. энциклопедия, 1989. – 864 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 730 с.
7. Митрофанова И.В. Микроклональное 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.
8. Митрофанова И.В., Шевелуха В.С. Соматический эмбриогенез зизифуса (*Zizyphus jujube* Mill.) в культуре *in vitro* // Известия ТСХА. – 1995. – Вып. 1. – С. 120-127.
9. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
10. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология. – М.: Наука, 1991. – С. 166-185.
11. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
12. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высш. школа, 1960. – 205 с.
13. Смит М.В., Моисеева Р.А. Эффективность соматического эмбриогенеза в клеточных суспензиях разных сортов и линий моркови // Биология культивируемых клеток и биотехнология. – Новосибирск, 1988. – 250 с.
14. 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.
15. 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.
16. Camara Machado A.D., Puschmann M., Puhlinger H., Kremen R., Katinger H., Laimer da Camara Machado M. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation // Plant Cell Rep. – 1995. – Vol. 14. – P. 335-340.
17. Chalupa V. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of Oak (*Quercus robour* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.) // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9. – P. 398-401.

18. Chalupa V. Somatic embryogenesis in birch (*Betula pendula* Roth.) // For. Sci. – 1995. – Vol. 46. – P. 137-151.
19. Cheong E.J., Pooler M.R. Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incise* cv. February Pink // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22, N 11. – P. 810-815.
20. Conde P., Loureiro J., Santos C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. // Plant Cell Rep. – 2004. – 22, N 9. – P. 632-639.
21. Corredoira E., Vieitez A.M., Ballester A. Somatic embryogenesis in elm // Ann. Bot. – 2002. – Vol. 89. – P. 637-644.
22. del Amo J.B., Picazo I. *In vitro* propagation of *Ficus benjamina* cv. Starlight from axillary buds with BAP and phloroglucinol // Gartenbauwissenschaft. – 1992. – Bd. 57, H 1. – S. 29-32.
23. Dodds J.H., Roberts L.W., Heslop-Harrison J. Experiments in Plant Tissue Culture. 3rd Ed. – UK: Cambridge University Press., 1995. – 272 p.
24. Fujimura T., Komanima A. Synchronization of somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture // Plant Physiol. – 1979. – Vol. 64. – P. 162-164.
25. Gosal S.S., Gill M.I.S., Grewal H.S. Somatic embryogenesis in *Citrus* species // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Angiosperms / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Vol. 2. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 1-21.
26. Gronroos L., von Arnold S., Eriksson T. Callus production and somatic embryogenesis from floral explants of basket willow (*Salix viminalis* L.) // J. Plant Physiol. – 1989. – Vol. 134. – P. 558-566.
27. 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.
28. 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. – Vol. 5. – Great Britain: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1999. – P. 149-161.
29. Hari V. Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis // J. Plant Physiol. – 1980. – Vol. 96. – P. 227-233.
30. Hirai G., Kasai N., Harada T. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1997. – Vol. 48, N 3. – P. 175-180.
31. Jain S.M., Ishii K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
32. Kiss J., Heszky L.E., Kiss E., Gyulai G. High efficiency adventive embryogenesis in somatic embryos of anther, filament, and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture // Plant Cell Tissue and Organ Cult. – 1992. – Vol. 30. – P. 59-64.
33. Kiviharju E., Tuominen U., Tormala T. The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1992. – Vol. 28. – P. 187-194.
34. Lane W.D. Regeneration of Pear plants from shoots meristem // Plant Sci. Lett. – 1976. – Vol. 16, N 2. – P. 337-342.
35. Langhansova L., Konradova H., Vanek T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22, N 10. – P. 725-730.
36. 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.
37. 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.
38. Merkle S.A., Sommer H.E. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera* // Can. J. For. Res. – 1986. – Vol. 16. – P. 420-422.

39. Michler C.H. Somatic embryogenesis in *Populus* spp. // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Angiosperms / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Vol. 2. - Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1995. – P. 89-97.
40. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Pandei D.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizhyphus jujube* Mill. *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol.- 1997. – Vol. 44, N 1. – P. 94-99.
41. Mitrofanova I., Mitrofanova O. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis in vitro* // Propagation of Ornamental Plants - IPPS / Eds. Iv. Iliev, P. Zelev, I. Tzvetkov. – Sofia: SEEK & SHARE: Balkanpress. – 2000. – P. 70-75.
42. Mitrofanova I.V., Yezhov V.N. Plant regeneration of *Clematis* L. through somatic embryogenesis *in vitro* // Bull. State Nikitsky Bot. Gardens. – 2002. – N 86. – P. 16-19.
43. Muralidharan E.M., Mascarenhas A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus* // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Angiosperms / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Vol. 2. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1995. – P. 23-40.
44. 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.
45. Nanda R., Rout G.R. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica* // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2003. – Vol. 73, N 2. – P. 131-135.
46. Onay A. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.) // *Turk. J. Bot.* – 2000. – Vol. 24. – P. 91-95.
47. 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.
48. Pollock K., Barfield D., Shield R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures // *Plant Cell Rep.* – 1983. – Vol. 2. – P. 30-39.
49. Reed B.M. Improved survival of *in vitro* – stored *Rubus* germplasm // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 1993. – Vol. 118, N 6. – P. 354-369.
50. 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.
51. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // *Hort. Rev.* – 1980. – Vol. 2. – P. 268-310.
52. Skolmen R.G. *Acacia (Acacia koa Gray)* // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees 1* / Ed. Bajaj Y.P.S. – Vol. 1. – Berlin: Springer Verlag, 1986. – P. 375-384.
53. Sondahl M.R., Sereduk T.B., Bellato C.M., Chen Z. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cacao // Patent N 0293598, EP, 1987, MK A01H 1/02, A01G 7/00, C12N 5/00, HK 88/49.
54. Souter M., Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis // *J. Exp. Bot.* – 2000. – Vol. 51. – P. 971-983.
55. Tomar U.K., Gupta S.C. Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume – *Albizia richardiana* King. // *Plant Cell Rep.* – 1988. – Vol. 7. – P. 70-73.
56. Vookova B., Kormutak A. Plantlet regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* x *Abies nordmanniana* Hybrid via Somatic Embryogenesis // *Turk. J. Bot.* – 2003. – Vol. 27. – P. 71-76.
57. Wilhelm E., Burg A., Berenyi M., Endemann M., Rodler R. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis and investigations on *Agrobacterium tumifaciens* mediated transformation of Oak (*Quercus robur*) // *Somatic cell genetics and molecular genetics of trees* / Eds. M. Ahuja et al. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1996. – P. 119-125.
58. Yepes L.M., Aldwinckle H.S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1994. – Vol. 37. – P. 257-269.

**Comparative study of features of direct somatic embryogenesis
in 8 cultivars of *Clematis* sp.**

Mitrofanova I.V., Zubkova N.V., Sokolova M.K..

Influence of BAP concentration on inducing of somatic embryo formation has been investigated. The main role of inductor and genotype was demonstrated. On the basis of results the method of direct somatic embryogenesis of clematis has been developed.