Solving the global problem of plant biodiversity conservation is impossible without finding new approaches. In addition to the existing traditional methods of *ex situ* biodiversity conservation, modern biotechnological means are increasingly being used to ensure the possibility of sustainable management for genetic resources. One of the directions in biodiversity conservation is the creation of *in vitro* gene bank, in the form of slowly growing collections. The purpose of our research is to study the influence of cultivation factors on the duration of deposition of an endemic species grown in the natural flora of the Western Caucasus, *Campanula sclerophylla* Kolak. For the first time, a method has been developed to preserve plants of the endemic species *Campanula sclerophylla* Kolak. under *in vitro* conditions for 360 days. Deposition was carried out at different temperatures (7, 9, and 22 °C), illumination (100 and 1 200 lux), on a Murashige and Skoog medium (½ MS) supplemented with sorbitol, mannitol and abscisic acid (ABA). The plant material was evaluated after 180 and 360 days of cultivation by studying the morphometric parameters of micro-shoots. It is shown that the preservation of viability and reduction of the growth kinetics in micro-shoots of *Campanula sclerophylla* during 360 days of deposition was facilitated by the complex effect of factors such as temperature 9 and 22 °C, illumination (100 и 1 200 lx) and the presence of osmotic substances (mannitol, sorbitol) and growth inhibitor (ABA) in the nutrient medium. Moreover, the best morphometric indicators in the micro-shoots of *Campanula sclerophylla* Kolak. were recorded on ½ MS with the content of sorbitol and ABA (1.0 mg/l and 2.0 mg/l, respectively). At the same time, the viability of *Campanula sclerophylla* explants was 47.1–65 %.

Key words: *Campanula sclerophylla,* cultivation factors, mannitol, sorbitol, abscisic acid, *in vitro* gene bank, slow-growing culture.

УДК 581.14.6:634.738 doi:10.31360/2225-3068-2022-81-106-115

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭТАПА РИЗОГЕНЕЗА ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ КЛЕМАТИСА

Муратова С.А., Папихин Р.В., Хорошкова Ю.В.

Мичуринский государственный аграрный университет,
г. Мичуринск, Тамбовская обл., Россия, e-mail: smuratova@yandex.ru

В статье рассмотрены результаты научных исследований по изучению влияния β-индолилмасляной кислоты (ИМК) и ультразвука (УЗ) на эффективность ризогенеза микрочеренков клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ в условиях *in vitro*. Максимальная частота укоренения клематиса при введении ауксина в питательную среду ризогенеза достигнута на среде MS УК с содержанием сахарозы 20 г/л при 0,25 и 0,5 ИМК. При таком способе индукции ризогенеза частота укоренения микрочеренков клематиса составляла 56,3–57,9 %, при этом, больше всего корней на укоренённый микрочеренок образовалось на безгормональной среде и среде с самой низкой концентрацией ауксина, также на этих

средах корни быстрее всего росли. При выдерживании микропобегов в растворе ИМК (50 мг/л, 24 ч) с последующим культивированием их на среде без гормонов частота ризогенеза возросла до 72,2 %. Существенно увеличилось среднее число корней на укоренённый микрочеренок с 2,4 шт. до 3,1 шт. Выбор оптимальных режимов и способов ультразвукового облучения микрочеренков позволил повысить эффективность укоренения клематиса и ускорить процесс ризогенеза. Положительный эффект получен при обработке микрочеренков в растворе ИМК (50 мг/л) ультразвуком частотой 22 кГц в течение 1 мин при плотности мощности ультразвука 2,67–5,6 Вт/см^2 с последующим выдерживанием оснований микрочеренков в растворе ауксина в течении 24 часов и высадкой их на среду без гормонов. Обработка УЗ микрочеренков клематиса при оптимальных параметрах воздействия ультразвукового излучения позволила ускорить процесс ризогенеза, повысить частоту укоренения до 88,2–90,0 % и увеличить число корней на укорененный черенок до 3,7–4,3 шт.

Ключевые слова: клематис, культура *in vitro,* микрочеренки, ризогенез, ауксин, ультразвук.

Среди цветочно-декоративных растений, широко используемых в озеленении, клематисы пользуются заслуженной популярностью. Потребность в посадочном материале большого количества сортов требует привлечения современных эффективных технологий размножения растений, таких как клональное микроразмножение. Важнейшим этапом клонального микроразмножения, во многом определяющим его эффективность, является укоренение полученных *in vitro* микропобегов. Процесс корнеобразования – это последовательность различных биохимических и физиологических событий. Какой бы способ укоренения не использовался, процесс адвентивного корнеобразования включает несколько этапов: индукцию, инициацию, появление корней за пределами побеговой части микрочеренка [5]. Интенсивность корнеобразования зависит от генома растений и условий укоренения. Важнейшую роль в индукции формирования и развития корней играют вещества ауксинового типа действия: НУК, ИУК и ИМК [3, 4, 6, 7, 13]. Применение ауксинов в составе питательной среды – основной способ укоренения микрочеренков клематиса в условиях *in vitro*. Совместное применение ИМК и ИУК в концентрации по 0,5 мг/л оказалось наиболее эффективным для укоренения различных сортов клематисов [6]. По данным других авторов лучшие результаты по укоренению сортов клематиса ‘Wildfire’, ‘Fujimusume’ и ‘Asagosumy’ получены при использовании индолилмасляной кислоты в концентрации 1,0−2,0 мг/л на среде Андерсена [7]. Максимальная частота укоренения (95–98 %) сорта ‘Princess Diana’ получена при концентрации ИУК 0,4 мг/л на питательной среде Мурасиге-Скуга со сниженной вдвое концентрацией макросолей и 20 г/л сахарозы [13].

Интересным направлением исследований является применение УЗ для облучения изолированных тканей растений в культуре *in vitro*. Анализ литературных источников показывает, что ультразвуковая обработка вызывает изменения проницаемости, эластичности и вязкости клеточных мембран, транспорта через мембраны, а также конформации и активности мембраносвязанных ферментов и ферментов, участвующих в гормональной регуляции и ответе на стрессовые воздействия путём запуска системы антиоксидантной защиты [14, 17, 19]. У проростков, облученных *in vitro* ультразвуковыми волнами, может наблюдаться усиленный рост или может начаться органогенез, но реакция зависит от вида растений, а также от частоты и периода воздействия УЗИ [16, 18]. В литературе есть сведения об успешном применении УЗ для стимуляции процесса образования корней как у одревеснев ших и зелёных черенков [2, 10], так и у микрочеренков в стерильных условиях [9].

Как биохимические, так и биофизические факторы необходимо рассматривать по отношению к каждому конкретному виду или сорту. Поэтому нужны планомерные исследования, позволяющие раскрыть морфогенетический потенциал изучаемого объекта.

Цель данной работы – выявление особенностей влияния ИМК, вещества ауксинового типа действия, при разном способе обработки микрочеренков в сочетании с УЗ обработкой микрочеренков на ризогенез *in vitro* клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’.

Объекты и методы исследования. Биологическим объектом исследования был клематис ‘Purpurea Plena Elegans’ – популярный сорт, входящий в группу Витицелла.

Для укоренения использовали микропобеги клематиса длиной 2,0–3,0 см. На стадии укоренения микрочеренков использовали минеральную основу среды по прописи Мурасиге-Скуга [15], с уменьшенным вдвое количеством макросолей, с добавлением сахарозы – 20 г/л, пиридоксина HCl – 0,5 мг/л, никотиновой кислоты – 0,5 мг/л, тиамина HCl – 0,4, инозитола – 50 мг/л, 8 г/л агара. Среда ризогенеза была без регуляторов роста или с добавлением 0,25, 0,5 или 1,0 мг/л β-индолилмасляной кислоты (ИМК). pH питательной среды – 5,7–5,8. Среды стерилизовали автоклавированием (1,2 атм., 20 мин). Витамины и β-индолилмасляную кислоту стерилизовали фильтрованием (“Millipore” 0,22 μm, France) и добавляли после автоклавирования.

Для облучения микрочеренков УЗ использовали ультразвуковую установку УЗДН-2Т. Параметры УЗ излучения: частота излучения – 22 кГц; мощность воздействия в пределах P = 0–10,0 Вт/см^2. Плотность мощности ультразвука рассчитывали по количеству выделившейся за единицу времени тепловой энергии в пересчёте на единицу площади.

Микрочеренки (2,0–3,0 см), культивируемых *in vitro* растений, нарезали в количестве 25–30 шт. на вариант и помещали в цилиндрическую насадку излучателя с 10 мл жидкой среды MS УК с добавлением ауксина (ИМК, 50 мг/л) так, чтобы основания всех микропобегов были погружены в жидкость. Ультразвуковое воздействие осуществлялось непосредственно на основания микрочеренков, находящихся в цилиндрической насадке излучателя в непрерывном режиме. Время воздействия на микрочеренки 60 с.

Использовали следующие мощности облучения:

1 вариант – 0,7 Вт/см^2;

2 вариант – 2,7 Вт/см^2;

3 вариант – 4,7 Вт/см^2;

4 вариант – 5,7 Вт/см^2;

5 вариант – 6,7 Вт/см^2.

После облучения микрочеренки 24 часа выдерживали в растворе ауксина, в котором осуществляли облучение, в темноте, после чего высаживали их на питательную среду укоренения MS УК, не содержащую гормонов, в конические колбы на 250 мл.

Культивирование растений осуществляли в специально оборудованной культуральной комнате при 16-часовом световом дне с освещённостью 2 400 люкс (люминесцентные лампы Osram L36W Cool Daylight), температуре воздуха 24 ±2 °С и влажности воздуха 55–60 %.

Эффективность обработки оценивали через 2–6 недель культивирования по числу укоренившихся микропобегов, количеству образовавшихся корней на одно укоренённое микрорастение и их длине.

Результаты и их обсуждение. Известно, что эффективность укоренения микрочеренков *in vitro* во многом определяется биологической предрасположенностью изучаемых генотипов к вегетативному размножению. Для стимуляции ризогенеза декоративных культур ауксины достаточно часто используют в относительно небольших концентрациях, так как высокие концентрации ауксинов в среде могут стимулировать каллусогенез [4, 13].

У сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ максимальная эффективность ризогенеза была достигнута на средах с 0,25 и 0,5 мг/л ИМК (рис. 1). Дальнейшее повышение концентрации ауксина в питательной среде не вело к повышению частоты ризогенеза, снижало количество корней на укоренённый микрочеренок (рис. 2) и замедляло рост корней. При этом анализ динамики ризогенеза при использовании различных концентраций ауксина показывает, что быстрее всего корни у клематиса образуются и растут на среде MS УК без гормонов. В этом случае процесс образования корней начинается через 2,5–3 недели культивирования, через 3–4 недели начинается укоренение на средах с добавлением ИМК.

Присутствие ауксина в среде, при общей стимуляции ризогенеза, может ингибировать рост корней [11]. Поэтому используют альтернативные способы применения ауксинов. В связи с этим прибегают к кратковременной обработке оснований микрочеренков (от нескольких часов до нескольких дней) препаратами с ауксиновой активностью с последующим помещением черенков на среды без регуляторов роста или же непосредственно в субстрат [1, 8, 12].

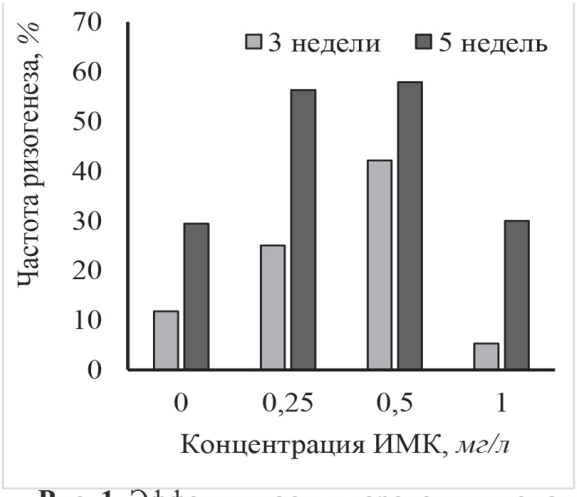

Рис. 1. Эффективность укоренения клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ при разной концентрации ауксина

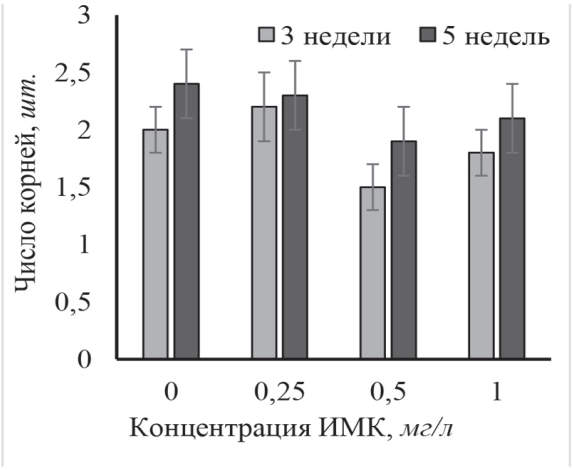

Рис. 2. Число корней на укорененный микрочеренок клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ при разной концентрации ауксина

Также на эффективность ризогенеза влиял способ введения индуктора ризогенеза в микрочеренки. При укоренении микропобегов клематиса на безгормональной среде после их выдерживания в течение суток в растворе ИМК (50 мг/л) частота ризогенеза повысилась до 72,2 %. Существенно увеличилось среднее число корней на укоренённый микрочеренок с 2,4 шт. до 3,1 шт.

В опытах с микрочеренками клематиса было установлено, что эффективность применения второй методики можно существенно повысить путём совместного применения раствора ауксина и ультразвуковой обработки оснований микрочеренков. При этом, как правило, чем ниже укореняемость микрочеренков в контроле, тем больше был выражен положительный эффект ультразвукового излучения.

Применение ультразвукового облучения для стимуляции ризогенеза клематиса показало, что для этой культуры наиболее эффективными были варианты с низкими значениями плотности мощности. Это, по нашему мнению, связано с морфологическими особенностями культуры в условиях *in vitro*, а именно, тонкими побегами, удлинёнными междоузлиями, мягким эпидермисом.

Максимальный эффект был получен в варианте с обработкой оснований микрочеренков клематиса в растворе ИМК (50 мг/л) УЗ при плотности мощности 2,67–5,6 Вт/см^2 и высадке их на безгормональную среду укоренения через сутки после озвучивания. При оптимальных параметрах озвучивания процесс корнеобразования на микрочеренках проходил быстрее. Через три недели культивирования частота ризогенеза в первом варианте опыта составила 66,7 %, во втором варианте опыта 70,0 % по сравнению с 50,0 % в контроле при замачивании в течении суток в растворе ИМК и 11,8 % при высадке микрочеренков на безгормональную среду без обработки ауксином. Итоговая частота укоренения возросла почти на 20 % с 72,2 % в контроле до 90,0 % во втором варианте опыта и до 88,2 % в 3 варианте опыта (рис. 3). Число корней на укоренённый микрочеренок возросло с 3,1 шт. в контроле до 4,3 шт. во 2 варианте и до 3,7 шт. в 3 варианте опыта (рис. 4). При этом с максимальной скоростью корни росли в 6 варианте опыта (рис. 5).

Положительный эффект применения ультразвукового облучения для стимуляции корнеобразования ранее был показан на ягодных и плодовых культурах [9, 10]. При этом выбор оптимальных параметров ультразвукового облучения зависел от видовых особенностей растений.

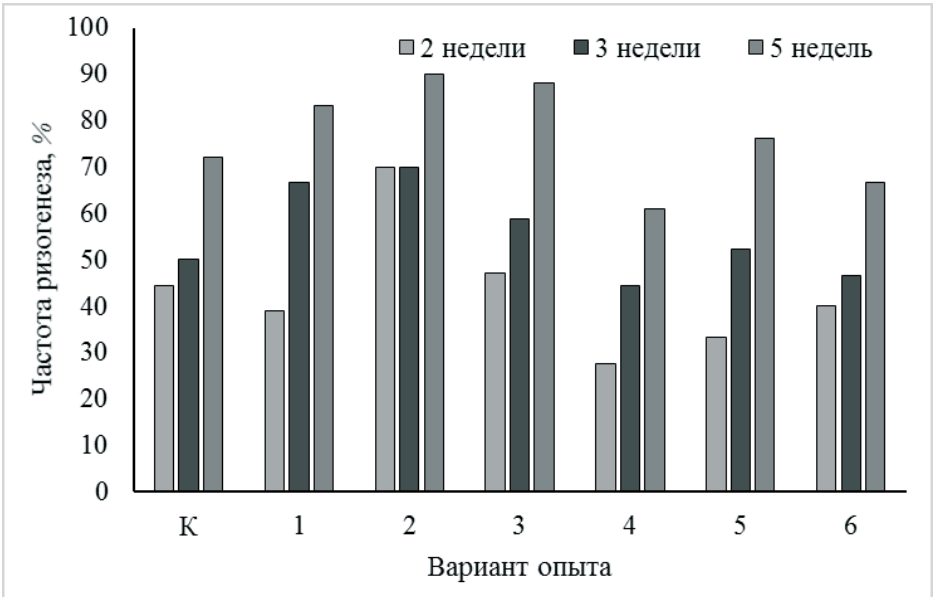

Рис. 3. Влияние УЗ
на эффективность укоренения клематиса
сорта ‘Purpurea Plena Elegans’

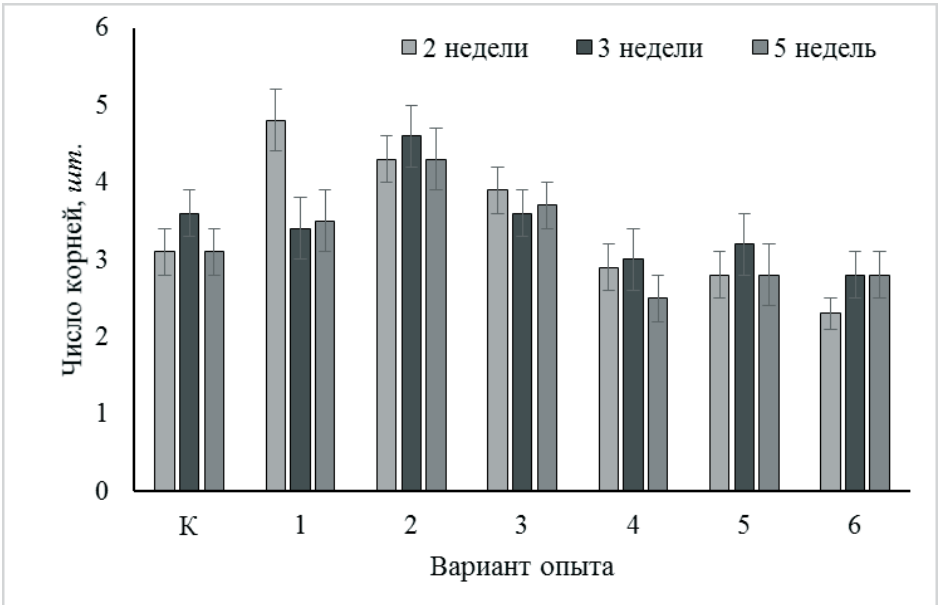

Рис. 4. Влияние УЗ
на интенсивность корнеобразования на микрочеренках
клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’

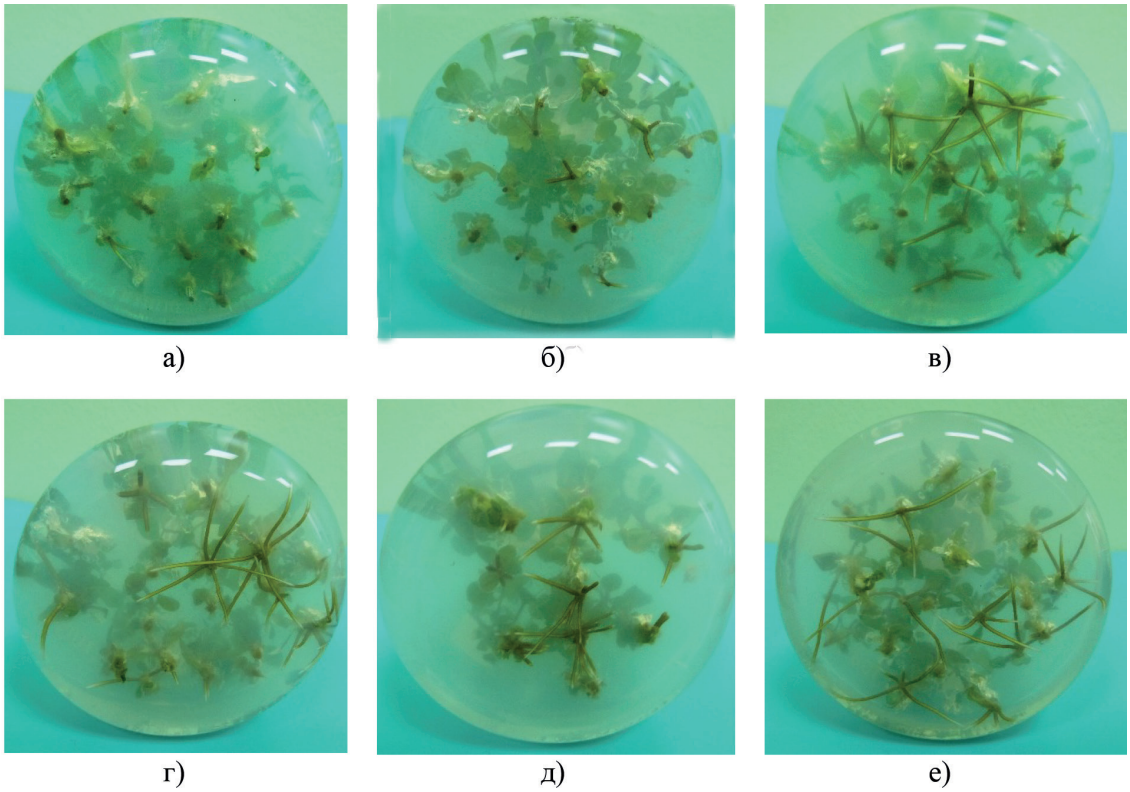

Рис. 5. Укоренение клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ на среде MS УК:
а – контроль без гормонов;
б – 0,25 мг/л ИМК в среду;
в – раствор ИМК 50 мг/л, 24 ч;
г – раствор ИМК 50 мг/л, 24 ч, УЗ 2,67 Вт/см^2;
д – раствор ИМК 50 мг/л, 24 ч, УЗ 4,66 Вт/см^2;
е – раствор ИМК 50 мг/л, 24 ч, УЗ 9,5 Вт/см^2

Выводы. Таким образом, на этапе ризогенеза клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ рекомендуется использовать β-индолилмасляную кислоту в составе питательной среды в концентрации 0,25–0,5 мг/л. При таком способе индукции ризогенеза частота укоренения микрочеренков клематиса составляет 56,3–57,9 %. Обработка ультразвуком в течении минуты оснований микрочеренков клематиса в растворе ИМК (50 мг/л) при плотности мощности 2,67–5,6 Вт/см^2 с последующим выдерживанием оснований микрочеренков в растворе ауксина в течении 24 часов позволяет ускорить процесс образования корней и довести частоту ризогенеза клематиса сорта ‘Purpurea Plena Elegans’ до 88–90 %.

Список литературы

1. Васильева О.Г. Возможности и перспективы клонального микроразмножения интродуцированных видов рододендрона // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – № 3. – С. 120-125.
2. Верещагин А.Л., Хмелева А.Н. Влияние ультразвукового облучения и регуляторов роста на ризогенную активность растительных объектов. – Бийск: Изд-во АГТУ им. И.И. Ползунова, 2010. – 72 с.
3. Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73-85.
4. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сборник научных трудов ГНБС. – Т. 138. – 2014. – С. 57-101.
5. Кефели В.И. Новые данные об эндогенной регуляции роста растений // Агрохимия. – 1966. – № 7. – С. 127-139.
6. Коротков О.И., Комарова И.А. Особенности укоренения сортовых групп клематисов в зависимости от их происхождения // IX Региональная конф. молодых исследователей Волгогр. обл., Волгоград, 9-12 ноября 2004 г.: мат-лы конф. – Волгоград, 2004. – С. 27-28.
7. Кутас Е.Н., Филипеня В.Л., Махонина О.И., Нехвядович А.В., Петралай О.Н., Аранович К.С., Титок В.В. Ризогенез интродуцированных сортов клематисов, обладающих лекарственной и декоративной ценностью в условиях стерильной культуры // Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матеріали дев'ятої Міжнародної науково-практичної конференції. 29–30 червня 2021 р., м. Полтава. РВВ ПДАА, 2021. – С. 33-39. – http: doi.org/10.5281/zenodo.5541344.
8. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Клональное микроразмножение яблони и груши в системе производства высококачественного посадочного материала // Агро XXI. – 2009. – № 4-6. – С. 28-29.
9. Папихин Р.В., Муратова С.А. Влияние ультразвукового излучения на процесс ризогенеза микрочеренков *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2009. – № 4. – С. 18-21.
10. Плаксина Т.В., Мочалова О.В., Верещагин А.Л. и Хмелев В.Н. Влияние ультразвукового облучения на корнеобразование у земляники и вишни // Ползуновский вестник. – 2011. – № 4-1. – С. 250-254.
11. Полевой В.В. Фитогормоны: учебное пособие. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 248 с.
12. Стахеева Т.С. Биологические особенности размножения некоторых представителей рода *Vaccinium* L. // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2009. – № 5. – С. 36-40.
13. Хорошкова Ю.В., Трунов И.А., Мелехов И.Д. Применение ауксинов в составе питательной среды на этапе ризогенеза микрочеренков ягодных и декоративных культур // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2020. – № 4(63). – С. 83-91. – ISSN1992-2582.
14. Dobránszki J., Asboth G., Homoki D., Bíró-Molnár P., Teixeira da Silva J.A., Remenyik J. Ultrasonication of in vitro potato single node explants: activation and recovery of antioxidant defense system and growth responses // Plant Physiol Biochem. – 2017. – Vol. 121. – P. 153-160. – http: doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.022.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – № 95. – P. 473-497.
16. Muratova S.A., Papikhin R.V. The effect of ultrasound irradiation on induction of callus formation and morphogenesis from the leaf discs of apple clonal rootstocks //

Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – Vol. 10(10). – P. 2592-2596. – ISSN 0975-1459.
17. Rokhina E.V., Lens P., Virkutyte J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art // Trends in Biotechnology. – 2009. – Vol. 27 – C. 298-306. – http: doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.001.
18. Teixeira da Silva J.A., Dobránszki J. Sonication (ultrasound) affects in vitro growth of hybrid Cymbidium // Bot. Lith. – 2014. – Vol. 20(2) – C. 121-130. – http: doi.org/10.2478/botlit-2014-0014.
19. Xiaocheng Д.Y., Jianping D., Bochu W. Effects of different sound frequency on roots development of *Actinidia chinensis* plantlet // Journal of Chongqing University (Natural Science Edition). – 2007. – Vol. 30(11). – P. 72-74. – http: doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60492-X.

IMPROVING THE STAGE OF RHIZOGENESIS IN CLONAL MICROROPAGATION OF CLEMATIS

Muratova S.A., Papikhin R.V., Khoroshkova Yu.V.

Michurinsk State Agrarian University,
Michurinsk, Russia, e-mail: smuratova@yandex.ru

The paper discusses cientific research on the effect of indolebutyric acid (IBA) and ultrasound on rhizogenesis effectiveness in clematis microshoots of the cultivar 'Purpurea Plena Elegance' *in vitro*. The maximum frequency of clematis rooting with the introduction of auxin into the nutrient medium of rhizogenesis was achieved MS medium supplied with sucrose of 20 g/l at 0.25 and 0.5 IBA. With this method of rhizogenesis induction, the frequency of clematis microshoots rooting was 56.3–57.9 %, while most roots per rooted microshoot were formed on a hormone-free medium and on a medium with the lowest auxin concentration, also on these media the roots grew fastest. When microshoots were kept in IBA solution (50 mg/l, 24 h), followed by their cultivation on a hormone-free medium, the frequency of rhizogenesis increased to 72.2 %. The average number of roots per rooted microshoot increased significantly from 2.4 pcs. to 3.1 pcs. The choice of optimal modes and methods of ultrasonic irradiation for microshoots allowed us to increase the efficiency of rooting clematis and accelerate the process of rhizogenesis. A positive effect was obtained by treating microshoots in a solution of IBA (50 mg/l) with ultrasound at a frequency of 22 kHz for 1 min at an ultrasound power density of 2.67–5.6 W/cm^2, followed by keeping the microshoots bases in auxin solution for 24 hours and planting them on a hormone-free medium. Processing clematis microshoots with ultrasound with optimal parameters of ultrasonic radiation exposure accelerated the process of rhizogenesis, enhanced rooting frequency to 88.2–90.0 % and increased the number of roots per rooted stalk to 3.7–4.3 pcs.

Key words: clematis, *in vitro*-culture, microshoots, rhizogenesis, auxin, ultrasound.