

Роль фітогормонів в індукції морфогенезу експлантами *Calycanthus floridus* L. за розмноження *in vitro*

Лариса А. Колдар, Валентина М. Оксантиук ✉

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України, м. Умань, Черкаська обл., Україна, e-mail: koldar55@ukr.net, valynchuk1@rambler.ru

ORCID ID 0000-0002-6756-4172, ORCID ID 0000-0001-5590-0629

✉ valynchuk1@rambler.ru

Реферат

Мета. Індукція морфогенезу *in vitro*, за культивування експлантів на живильних середовищах, залежить від багатьох взаємопов'язаних факторів. Основними індукторами і координаторами морфогенних процесів в умовах *in vitro* є фітогормони, які вводяться до живильних середовищ у певних концентраціях і відіграють основну роль у регуляції росту і розвитку експлантів. Тому з'ясування залежності морфогенного потенціалу експлантів *Calycanthus floridus* L., розмножуваних *in vitro*, від дії екзогенних регуляторів росту (фітогормонів) визначено метою досліджень. **Матеріали і методи.** Роботу виконували в лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендропарку «Софіївка» Національної академії наук України. Для досліджень використовували рослинний матеріал *C. floridus*, отриманий з насіння пророщеного *in vitro*. Для визначення ефективності росту, розвитку та морфогенного потенціалу експлантів *C. floridus* використовували живильні середовища згідно з прописами Мурасіге і Скуга (МС) та Драйвера і Куніюкі (DKW). Стимулювання морфогенезу проводили за використання фітогормонів: 6-бензиламинопурину (6-ВАР) – 0,1–2,0 мг/л, індолилмасляної кислоти (β -ІМК) – 0,01–1,0 мг/л та цистеїну – 0,5–2,0 мг/л. **Результати та обговорення.** Отримані в ході експерименту дані засвідчили, що ріст, розвиток та збільшення морфогенного потенціалу експлантів, а відповідно і коефіцієнта розмноження значною мірою залежать від вмісту та концентрацій у живильних середовищах фітогормонів. У експлантів *C. floridus*, культивованих на живильних середовищах за прописами Мурасіге і Скуга

(МС), модифікованих додаванням 0,5 мг/л 6-БАП та 0,08 β-ІМК та Драйвера і Куніюкі (DKW) за вмісту 0,5 мг/л 6-БАП; 0,08 мг/л β-ІМК та 1,0 г/л цистеїну, виявлено активне проходження процесів морфогенезу і збільшення коефіцієнта розмноження. **Висновки.** Досліджено морфогенну спроможність експлантів *C. floridus* та виявлено, що активному проходженню процесів морфогенезу у експлантів і збільшенню показників коефіцієнта розмноження, сприяло модифікування живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП та 0,08 β-ІМК та Драйвера і Куніюкі за вмісту 0,5 мг/л 6-БАП; 0,08 мг/л β-ІМК; 1,0 г/л цистеїну.

Ключові слова: *Calycanthus* L., декоративність, живильні середовища, коефіцієнт розмноження, рістрегулюючі речовини.

The role of phytohormones in the induction of morphogenesis by *Calycanthus floridus* L. explants for *in vitro* propagation

Larysa A. Koldar, Valentyna M. Oksantiuk ✉

National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine, Uman,
Cherkasy region, Ukraine, e-mail: koldar55@ukr.net, valynchuk1@rambler.ru
ORCID ID 0000- 0002-6756-4172, ORCID ID 0000-0001-5590-0629

✉ valynchuk1@rambler.ru

Abstract

Aims. Induction of morphogenesis *in vitro* by the cultivation of explants on nutrient media depends on many interrelated factors. The main inducers and coordinators of morphogenic processes *in vitro* are phytohormones, which are introduced into nutrient media in certain concentrations and play a major role in regulating the growth and development of explants. Therefore, elucidation of the morphogenic potential dependence of explants of *Clycanthus floridus* L. the effect of exogenous growth regulators (phytohormones) is determined by the aim of the research. **Materials and methods.** The work was conducted in the Plant Micropropagation Laboratory of the National Dendrological Park "Sofiyivka" of the National Academy of Sciences of Ukraine. Plant material *C. floridus* was used for research obtained from seeds sprouted *in vitro*. To determine the efficiency of growth, development, and morphogenic potential of *C. floridus* explants used basal nutrient media according to Murashige and Skoog (MS) and Driver and Kuniyuki Walnut (DKW). Morphogenesis was stimulated by exogenous phytohormones: 6-benzylaminopurine (BAP) – 0.1–2.0 mg/l, β-indolylbutyric acid (IBA) – 0.01–

1.00 mg/L and cysteine – 0.5–2.0 mg/l. **Results and discussion.** The data obtained during the experiment showed that the growth, development and increase of the morphogenic potential of explants, and, accordingly, the multiplication coefficient, largely depend on the content and concentrations of phytohormones in nutrient media. In explants *C. floridus* cultured on nutrient media according to Murashige and Skoog, modified with the addition of 0.5 mg/L 6-BAP and 0.08 β -IBA and Driver and Kuniyuki with a content of 0.5 mg/L 6-BAP; 0.08 mg/l β -IBA and 1.0 g/L cysteine, active morphogenesis processes and an increase in the multiplication coefficient were detected. **Conclusions.** The morphogenic capacity of *C. floridus* explants was investigated. It was found that the active passage of morphogenesis processes in explants and an increase in the multiplication coefficient indicators were facilitated by modification of nutrient media prescribed by Murashige and Skoog with the addition of 0.5 mg/L 6-BAP and 0.08 β -IBA and Driver and Kuniyuki with the content of 0.5 mg/L 6-BAP; 0.08 mg/l β -IBA; 1.0 g/L cysteine.

Key words: *Calycanthus* L., decorativeness, nutrient media, multiplication coefficient, growth regulating substances.

Вступ/Introduction. Однією з актуальних проблем сьогодення є збереження існуючого асортименту декоративних рослин та його збагачення за рахунок інтродукції, яка надає можливості введення в культуру нових видів та внутрішньовидових таксонів з господарсько-цінними ознаками.

До перспективних інтродуцентів України належать представники роду *Calycanthus* L., які за своїми декоративними властивостями не поступаються багатьом аборигенним та інтродукованим рослинам. До роду *Calycanthus* здебільшого зараховують три види – *C. floridus* L., *C. fertilis* Walt. та *C. occidentalis* Hook. et Arn., однак окремі літературні джерела повідомляють, що за морфологічними ознаками та молекулярними даними до калікантових належить ще один вид – *C. chinensis* (W. C. Cheng & S. Y. Chang) W. C. Cheng & S. Y. Chang ex P. T. Li (Takhtajan, 2009; Zhou, Renner, Wen, 2006). Нині *C. fertilis* Walt. класифікують як синонім різновиду *C. floridus* var. *glaucus* (Willd.) Torr. & A. Gray, а у роді *Calycanthus* L. налічують чотири визнані види: *C. brockianus* Ferry & Ferry f.; *C. chinensis* (W. C. Cheng & S. Y. Chang) W. C. Cheng & S. Y. Chang ex P. T. Li; *C. floridus* L. та *C. occidentalis* Hook. & Arn., що зазначається у базі даних Королівського ботанічного саду в Кью (*Calycanthus* L., 2020).

Природний ареал роду невеликий, однак розірваний і включає ареали *C. brockianus* у штаті Джорджія та *C. floridus* в Алабамі, Флориді, Джорджії та

інших штатах Південно-Атлантичного побережжя і *C. occidentalis* у Північній та Центральній Каліфорнії (США), тоді як *C. chinensis* має природний ареал на південному сході Китаю у провінції Чжецзян (Govaerts, 1999).

Цінність калікантів полягає в тому, що вони відрізняються широкою екологічною амплітудою, довговічністю, швидкістю росту, тривалим періодом цвітіння. Рослини видів роду *Calycanthus* є джерелом цінного декоративного матеріалу для використання в зеленому будівництві (Oleshko, Havryliuk, 2011; Koldar, 2015). Крім того вони придатні для контейнерного вирощування, а зрізані квітучі пагони – для створення рослинних композицій. Поширення ці рослини набувають і в медичній практиці, де використовують корені, кору, листки, квітки, насіння, а ефірні олії в парфумерії (Moerman, 1998; Zhand, 1998). Корінні американці використовували калікант як традиційну лікарську рослину. Відмінною особливістю рослин цього роду є насичений запах камфори, інколи схожий на фруктовий або медовий, який видають всі частини рослини, більшою мірою – квітки, а меншою – листки, стебла і коріння. У сухоцвітів цей запах зберігається впродовж кількох років. Рослини цього роду часто називають "Sweet Shrub" – солодкий чагарник, "Allspice" – запашний перець, назви яких вказують на ароматичні властивості рослин.

Варто зазначити, що представники роду *Calycanthus* є цінними декоративними рослинами для зеленого будівництва і можуть бути використані у групових та солітерних насадженнях завдяки красивому оригінальному вигляду листків, квіток та біоморфи рослин. Проте, незважаючи на цілий комплекс цінних властивостей та приємний аромат рослин роду *Calycanthus*, як у нашій країні, так і в країнах Європи і навіть в США вони культивуються дуже рідко.

За ботанічним описом каліканти – листопадні чагарники заввишки до 1–4 м із супротивно розташованими яскраво зеленими листками завдовжки 5–20 см, завширшки – 2–5 см. Каліканти – одні з найдивовижніших і оригінальних рослин, період цвітіння яких починається в першій декаді червня, інколи в липні у віці чотирьох–п'яти років. Цвітуть вони витонченими квітками з приємним ароматом, які за формою нагадують латаття. Плід каліканта – грушоподібний, сухий багатогорішок (цинерарій) із зморшкуватою поверхнею завдовжки 5–7 см.

За висотою росту ці рослини належать до групи середніх чагарників, вирощуваних на освітлених або злегка затінених територіях.

Л. Дільс (Diels, 1912), а пізніше В. Грант (Grant, 1950), вказували, що рослинам роду *Calycanthus* властивий рідкісний спосіб запилення – кантарофілія (перехресне запилення квіток жуками з родини блесянок (*Nitidulidae* Latreille)), які живляться пилком або соковитими тканинами квітки.

Однією з передумов успішного впровадження рослин у виробництво є розробка методів масового розмноження і вирощування садивного матеріалу. Для використання у лісівництві, декоративному садівництві, зеленому будівництві цілком придатний садивний матеріал насінневого походження. Проте збереження генетичної однорідності декоративних рослин потребує вегетативного розмноження. Застосовуючи класичні методи розмноження (живцями, щепленням) ми одержуємо відносно обмежену кількість рослин. Виникає необхідність використання нових більш перспективних методів розмноження, одним із яких є розмноження у культурі *in vitro*, розроблений на основі біотехнології з метою одержання масового садивного матеріалу, за якого, при мінімальній кількості маточних рослин, у короткі строки, можна отримати велику кількість генетично однорідного, морфологічно вирівняного садивного матеріалу. Щодо розмноження калікантів зеленими та здерев'янілими живцями, то вони не дають високого відсотку укорінення навіть за обробки рістрегулюючими речовинами. Дослідження анатомічної будови здерев'янілих живців показали, що формування калюсу залежить від вмісту у паренхімних тканинах пагонів секреторних клітин з ефірними оліями, що стримує формування коренів на живцях. За живцювання калікантів зеленими живцями з'ясовано, що вони мають невисоку ризогенну здатність (Oleshko, Navrylyuk, 2011; Oleshko, Navrylyuk, 2012).

Мета роботи – з'ясувати залежність морфогенного потенціалу експлантів *Calycanthus floridus* L., розмножуваних *in vitro*, від дії екзогенних регуляторів росту (фітогормонів).

Матеріали і методи/Materials and Methodology. Матеріалом для досліджень слугували експланти рослин, одержані в результаті пророщування насіння *C. floridus in vitro*. Для виявлення залежності росту, розвитку та морфогенного потенціалу експлантів *C. floridus* з використанням живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга (МС) та Драйвера і Куніюкі (DKW) використовували метод культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*, зумовлених регуляторами росту (Driver, Kuniyuki, 1984; Murashige, Skoog, 1962). Модифікацію живильних середовищ проводили за використання ріст регулюючих речовин цитокінінової та ауксинової груп у п'яти варіантах за триразового повторення. В основу живильного субстрату входили макро- та мікроелементи, глюкоза або сахароза та 7 г/л агар-агару. Для стимулювання морфогенезу у експлантів, базові живильні середовища МС та DKW модифікували додаванням фітогормонів: 6-бензиламінопурину (6-БАП) – 0,1–2,0 мг/л, індолилмасляної кислоти (β -ІМК) – 0,01–1,0 мг/л. Кращому проходженню у експлантів окисно-відновних реакцій сприяло додавання цистеїну – 0,5–2,0 мг/л. Для активного пагоноутворення до середовища

додавали мезоінозит – 100 мг/л, комплекс вітамінів згідно з прописами, 3% сахарози, 0,7% агар-агару за рН 5,6–5,8. Розрахунок коефіцієнта розмноження проводили після другого пасажу. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$, відносній вологості повітря 70–75%, фото-періоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 2–3 тис. люкс. Під-готування посуду, матеріалів, інструментів та живильних середовищ проводили згідно рекомендацій Ф. Л. Калініна, Н. В. Катаєвої; М. Д. Мельничука з колегами (Kalynyn et al., 1980, Kataeva & Butenko, 1983, Melnychuk et al., 2003).

Результати та обговорення/Results and Discussion. Вивчення основних етапів онтогенетичного розвитку рослин, культивованих *in vitro*, потребує більш досконалого дослідження шляхів морфогенезу, за якими проходять регенераційні процеси у рослин. Морфогенний потенціал рослин у системах *in vitro* проявляється в більш широкому діапазоні ніж у природних умовах, завдяки еволюційно зумовленій регенераційній здатності (Zhuravlev & Omel'ko, 2008). Головною умовою, необхідною для включення програми регенерації є порушення цілісності рослинного організму. В дослідях *in vitro* такі умови досягаються за рахунок пошкодження, екстрадиції експланта, а також змінами інтенсивності і фотоспектру освітлення та додавання до живильного середовища фізіологічно активних речовин. Залежно від дії як ендогенних так і екзогенних факторів процеси морфогенезу у експлантів набувають різних напрямків (Kataeva & Butenko, 1983, Zhuravlev & Omel'ko, 2008). Вони можуть відбуватися різними способами і мати різні морфогенетичні прояви за одержання рослин-регенерантів. Реалізація конкретного шляху морфогенезу, як у природних умовах так і в культурі *in vitro* значною мірою детермінована генетичними та фізіологічними характеристиками індивіду, від якого одержано вихідний матеріал, а також умовами вирощування, зокрема співвідношенням у живильних середовищах фітогормонів цитокінінової та ауксинової груп.

За розмноження рослин *in vitro* розрізняють два типи морфогенезу: прямий – утворення рослин-регенерантів із експлантів, завдяки активації меристем та непрямий – утворення рослин-регенерантів із первинного чи субкультивованого калюсу. Індукція морфогенезу *in vitro*, за культивування експлантів на живильних середовищах, а в подальшому – рослин-регенерантів, залежить від багатьох взаємопов'язаних факторів. Відомо, що роль основних індукторів, регуляторів і координаторів морфогенних процесів в умовах *in vitro* відіграють фізіологічно активні сполуки, які вводяться до живильних середовищ у певних концентраціях і відіграють основну роль у регуляції росту і розвитку експлантів (Kruglova, Seldimirova, 2013).

У наших дослідках модифікацію живильних середовищ проводили за використання рістрегулюючих речовин цитокінінової та ауксинової груп. За прописом МС до живильного середовища додавали 6-БАП у концентрації 0,1–1,0 мг/л та β -ІМК – 0,01–0,2 мг/л. За першого пасажу спостерігали ріст лише пазушних пагонів, які відокремлювали від основного експланта і пасажували на живильне середовище, яке сприяло активному проходженню морфогенезу. Через 14 ± 3 діб з'являлись адвентивні бруньки і за 9 ± 2 наступних діб спостерігали проростання пагонів, які в процесі росту, впродовж наступних 8–10 діб, досягали 3 ± 1 см (рис. 1).

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що вміст у живильному середовищі МС 0,5 мг/л 6-БАП та 0,08 β -ІМК сприяв активному проходженню процесів морфогенезу і збільшенню коефіцієнта розмноження до 4 в порівнянні з іншими варіантами (табл. 1).



Рисунок 1. Морфогенез експлантів *C. floridus* за другого пасажу

Figure 1. Morphogenesis of *C. floridus* explants in the second passage

Таблиця 1. Залежність коефіцієнта розмноження *C. floridus* від концентрацій ріст регулюючих речовин у середовищі МС

Table 1. Dependence of the multiplication coefficient of *C. floridus* on the growth concentrations of regulatory substances in the MS-medium

Варіант/ Variant	Рістрегулюючі речовини, мг/л/ Growth regulating substances, mg/l		Коефіцієнт розмноження/ Multiplication coefficient
	6-БАП/6-BAP	β -ІМК/ β -IBA	
I	0,1	0,01	$1,3 \pm 0,17$
II	0,3	0,05	$3,5 \pm 0,15$
III	0,5	0,08	$4,7 \pm 0,24$
IV	0,8	0,1	$2,1 \pm 0,13$
V	1,0	0,2	$1,2 \pm 0,11$

За збільшення концентрацій 6-БАП до 0,1–0,2 мг/л та β -ІМК до 0,1–0,2 мг/л та зменшення до 0,1 мг/л процеси морфогенезу, а відповідно і коефіцієнт розмноження знижувалися до 2 та 1 відповідно.

Стимулювання процесів морфогенезу у експлантів *C. floridus* проводили з використанням живильного середовища за прописом Драйвера і Куніюкі (DKW) з додаванням 6-БАП у концентрації 0,1–1,0 мг/л та β -ІМК – 0,01–0,2 мг/л. Вміст глюкози, як незамінного джерела енергії і будівельного матеріа-

лу для утворення нових клітин становив 3%. Для сприяння кращому проходженню у рослин окисно-відновних реакцій, до живильного середовища додавали цистеїн 0,5–1,5 мг/л. (табл. 2).

Таблиця 2. Залежність коефіцієнта розмноження *C. floridus* від концентрацій рістрегулюючих речовин у середовищі DKW

Table 2. Dependence of multiplication coefficient of *C. floridus* on growth concentrations of regulatory substances in DKW-medium

<i>Варіант/ Variant</i>	<i>Рістрегулюючі речовини, мг/л/ Growth regulating substances, mg/l</i>			<i>Коефіцієнт розмноження/ Multiplication coefficient</i>
	6-БАП/ 6-BAP	β-ІМК/ β-IBA	цистеїн/cysteine	
I	0,1	0,01	0,5	1,3±0,15
II	0,3	0,05	0,8	3,4±0,18
III	0,5	0,08	1,0	5,4±0,21
IV	0,8	0,1	1,2	2,2±0,12
V	1,0	0,2	1,5	1,2±0,20

Перші ознаки проростання спостерігали з появою пазушних бруньок, які з'явилися на 3–5 діб раніше, ніж у попередньому досліді, а проростання пагонів було значно активнішим і через 9–12 діб вони досягали 3–4 см та були придатними до наступного пасажування.

Найактивніше пагоноутворення, на середовищі DKW, за другого пасажу, спостерігали у варіанті III, яке містило 0,5 мг/л 6-БАП, 0,08 мг/л β-ІМК та 1,0 г/л цистеїну, а коефіцієнт розмноження був більшим і становив п'ять. У варіантах з меншими концентраціями фітогормонів, морфогенез експлантів значно знижувався, а коефіцієнт розмноження був 1–3. Менша морфогенна активність була характерна для експлантів у варіантах IV та V, у яких вміст фітогормонів збільшували до 0,8–1,0 мг/л 6-БАП; 0,1–0,2 мг/л β-ІМК та 1,2–1,5 мг/л цистеїну, проте коефіцієнт розмноження становив відповідно лише два та один. Це дає підстави вважати, що розмноження *C. floridus* методом культури *in vitro*, за використання ріст регулюючих речовин цитокінінової та ауксинової груп відповідних концентрацій, сприяє успішному проходженню процесів морфогенезу та підвищенню коефіцієнта розмноження.

Висновки/Conclusions. Унаслідок дослідження залежності морфогенної спроможності та коефіцієнта розмноження експлантів *C. floridus* від вмісту фітогормонів у живильних середовищах з'ясовано, що найвищими морфогенними потенціями характеризувались експланти, культивовані на живильних середовищах за прописами Мурасіге і Скуга (МС) модифікованих додаванням 0,5 мг/л 6-БАП та 0,08 β-ІМК та Драйвера і Куніюкі (DKW) за вмісту 0,5 мг/л 6-

БАП; 0,08 мг/л β -ІМК та 1,0 г/л цистеїну, на яких активно відбувалися процеси морфогенезу, що супроводжувалось збільшенням показників коефіцієнта розмноження до чотирьох та п'яти відповідно.

Список посилань/References

- Calycanthus* L. (2020). *World Checklist of Selected Plant Families*. URL: <http://apps.kew.org/wcsp/>.
- Diels, L. (1912). Über primitive Ranales der australischen Flora. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. 48, Beiblatt zu den Botanischen Jahrbüchern. Nr. 107. S. 7–13. (in German).
- Driver, J., & Kuniyuki, A. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *Horticultural Science*. Vol. 19. P. 507–509.
- Govaerts, R. (1999). World Checklist of Seed Plants 3(1, 2a & 2b). Deurne: MIM. 1–1532.
- Grant, V. (1950). The pollination of *Calycanthus occidentalis*. *American Journal of Botany*. Vol. 37(4). P. 294–297.
- Kalynyn, F. L., Sarnatskaia, V. V., & Polyshchuk, V. E. (1980). *Metody kul'tury tkaney v fyziologii y byokhymii rastenyi*. Kyiv: Naukova dumka, 488 s. (in Russian).
- Kataeva, N. V., & Butenko, R. H. (1983). *Klonal'noe mykrorazmnozheniye rastenyi*. Moskva: Nauka, 96 s. (in Russian).
- Koldar, L. A. (2015). Perspektyvy vykorystannia vydiv rodu *Calycanthus* Lindl. u zelenomu budivnytstvi Pravoberezhnoho Lisostepu Ukrainy. *Materialy mizhnar. nauk. konf. «Aktual'ni problemy sadovo-parkovoho mystetstva»* 27–28 travnia 2015 r. Uman'. 2015. S. 93–95. (in Ukrainian).
- Kruglova, N. N., & Seldimirova, O. A. (2013). The pathways of morphogenesis in vitro of wheat androcylic callus cells. *Plant physiology and genetics*. Vol. 45. No 5. P. 382–389. (in Russian).
- Melnichuk M. D., Novak T. V., & Kunakh V. A. (2003). *Biotekhnolohiia roslyn*. Kyiv: Vyshcha osvita. 520 s. (in Ukrainian).
- Moerman, D. E. (1998). *Native American Ethnobotany*. Portland, OR: Timber Press, 927 p.
- Murashige, T. M., & Skoog, F. K. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- Oleshko, V. V., & Havryliuk, O. S. (2011). Introduktsiia vydiv rodu *Kalikantus* (*Calycanthus* L.) ta perspektyvy vprovadzhennia ikh v ozelenennia. *Naukovyy visnyk VNU im. Lesi Ukrainky*. No 19. S. 30–31. (in Ukrainian).
- Oleshko, V. V., Havrylyuk O. S. (2012). Vegetative propagation of species of strawberry shrub *Calycanthus* L. genus in the Volyn Forest-steppe of Ukraine. *News Biosphere Reserve «Askania-Nova»*. No 14. P. 190–194. (in Ukrainian).
- Takhtajan, A. L. (2009), Flowering plants [corr. 2nd ed.]. N. Y. Springer Science+Business Media, 871 p.
- Zhang, R., & Liu, H. (1998). *Wax shrubs in world: ('Calycanthaceae')*. China Science and Technology Press. P. 1–15.
- Zhou, S., Renner, S. S., & Wen, J. (2006). Molecular phylogeny and intra-and intercontinental biogeography of Calycanthaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 39(1), P. 1–15.