

УДК 582.548.25:57.085.23

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA* HORT.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*© 2014 г. **А.Ш. Тевфик¹, И.В. Митрофанова^{1,2}, Т.Н. Кузьмина¹**¹Никитский ботанический сад, Ялта²УНЦ биологии и экологии субтропических растений и ландшафтоведения НУБиП, Ялта

biotechyalta2014@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2014

Индукцирована регенерация микропобегов канны садовой (*Canna* × *hybrida* Hort.) из вегетативной почки в условиях *in vitro*. Определены оптимальные концентрации цитокинина тидиазурон для активного побегообразования канны садовой сортов Суевия, Дар Востока и Ливадия (1.24–1.91 мг/л). Представлены результаты гистологических исследований образовавшихся меристемоидов канны. Получены укорененные растения 3 сортов канны садовой.

Ключевые слова: канна, меристемоид, регенерация, культура *in vitro*.

Введение

Канна садовая (*Canna* × *hybrida* Hort.) – многолетнее травянистое растение семейства Cannaceae Juss, порядка Zingiberales Nakai с прямым ложным стеблем высотой 0.5–2.5 м и с очередными крупными широкоовальными листьями от сизо-зеленой до фиолетово-красной окраски [1]. В последние годы канна часто используется при оформлении парков, садов, скверов и представляет интерес благодаря крупным малиновым, красным, оранжевым, лососевым, желтым цветкам, собранным в соцветия.

Применение методов культуры органов и тканей в комплексе с другими методами позволяет оздоровить растения, снижает потери при укоренении регенерантов, ускоряет селекционный процесс и создает условия для депонирования ценных сортов путем замедления роста и развития эксплантов в виде медленно растущих коллекций и криосохранения.

Цель настоящего исследования – изучение особенностей адвентивного побегообразования канны садовой в условиях *in vitro*.

Экспериментальная часть

Изучали перспективные сорта канны садовой из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ, Ялта): Дар Востока, Ливадия и Суевия. Исследования проводили в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ. Применяли методы

культуры органов и тканей растений общепринятые [2] и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС-ННЦ [3]. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки. Экспланты, прошедшие стерилизацию, в асептических условиях помещали в пробирки на модифицированную питательную среду Мурасиге–Скуга (МС) [4]. В среды добавляли регуляторы роста: цитокинины – 6-бензиламинопури (БАП) и тидиазурон (ТДЗ) (*Sigma*, США), ауксин – индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (*Sigma*, США). Для индукции развития экспланты переносили в культуральную комнату с температурой 24±1°C, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2–3 клк.

Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике [5]. Парафиновые срезы делали толщиной 12–15 мкм на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим [6]. Анализировали материал с помощью микроскопа *AxioScope A.1* (*Zeiss*, Германия) методом светлого поля. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения *AxioCamERC5s* и с применением программы *AxioVisionRel. 4.8.2*.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа [7]. Повторность опыта была пятикратной.

Результаты и их обсуждение

Важное значение для развития эксплантов имеет добавление в питательные среды регуля-

Таблица

Влияние регуляторов роста на адвентивное побегообразование канны садовой (шт.)

Сорт	Питательная среда	Продолжительность культивирования, суток		
		30	60	90
Суевия	МС + 1.27 мг/л ТДЗ	1.25±0.29	2.75±0.29	4.25±0.29
	МС + 1.5 мг/л БАП + 1.5 мг/л ИУК	0.75±0.29	2.0±0.47	2.0±0.47
Дар Востока	МС + 1.27 мг/л ТДЗ	0.75±0.29	1.75±0.29	2.75±0.29
	МС + 1.5 мг/л БАП + 1.5 мг/л ИУК	–	–	–

торов роста [3]. Предварительно нами были проведены исследования по получению дополнительных побегов канны садовой сорта Суевия. Однако коэффициент адвентивного побегообразования был невысоким [8]. В связи с этим в последующих исследованиях для индукции адвентивного побегообразования нами были использованы БАП и ТДЗ.

У микропобегов канны садовой сортов Дар Востока и Суевия на среде МС, дополненной 1.27 мг/л ТДЗ, на 12-е сутки культивирования отметили появление адвентивных побегов. При последующем культивировании отмечали увеличение их количества. Так, на 90-е сутки микропобеги канны садовой сортов Дар Востока и Суевия образовали в среднем от 2.75 до 4.25 дополнительных побегов/эксплант соответственно (таблица).

При длительном культивировании канны садовой сорта Суевия (150 суток и субкультивирование каждые 30 суток на эту же питательную среду) наблюдали образование до 7 адвентивных побегов на эксплант. Кроме того, в базальной части некоторых побегов наблюдали формирование меристематических (5–10 шт./эксплант).

Результаты исследования показали, что увеличение концентрации ТДЗ до 1.91 мг/л при культивировании эксплантов сорта Суевия приводило к образованию каллуса ярко-зеленой окраски, который впоследствии темнел и отмирал. Вместе с тем, при добавлении в питательную среду МС 1.5 мг/л БАП и 1.5 мг/л ИУК отмечали меньше сформировавшихся адвентивных побегов (2 шт./эксплант), чем при использовании 1.27 мг/л ТДЗ. Возможно это связано с активным корнеобразованием (до 7 корней на эксплант). Наряду с этим, при культивировании микропобегов канны садовой сорта Дар Востока на питательной среде МС с 1.5 мг/л БАП и 1.5 мг/л ИУК дополнительные побеги не формировались. Были получены регенеранты с хорошо развитыми корнями (5.0±0.47 шт./микропобег).

В процессе исследований, при использовании 1.91 мг/л ТДЗ, на начальном этапе культивирования у канны садовой сорта Ливадия развились вытянутые в длину адвентивные побеги.

В этом случае продолжительное культивирование эксплантов индуцировало образование меристематических. Так, через 6–7 месяцев в асептических условиях отметили образование до 40 меристематических размером от 0.1 до 0.7 см. Культивирование микропобегов канны садовой сорта Ливадия на питательной среде МС, дополненной 2.55 мг/л ТДЗ, также способствовало образованию меристематических. Однако на 100-е сутки культивирования такие меристематические начинали коричневеть.

Проведенные гистологические исследования позволили выявить некоторые особенности развития образующихся меристематических канны садовой (рисунок).

В процессе исследований было отмечено, что при добавлении в питательную среду ТДЗ у сорта Ливадия образовалось скопление меристематических в основании микропобега. В некоторых случаях можно было наблюдать дальнейшее развитие этих структур за счет активного деления клеток (рисунок А). Однако длительное культивирование меристематических на питательной среде МС с 2.55 мг/л ТДЗ приводило к их постепенному отмиранию (рисунок Б). Вместе с тем, в основании микропобегов сорта Суевия формировались отдельные зоны, обладающие меристематической активностью, и меристематические (рисунок В). В базальной части некоторых микропобегов сорта Суевия наблюдали образование неморфогенного каллуса (рисунок Г). Клетки каллуса были паренхимного типа – крупные, вакуолизированные, не способные к дедифференциации.

Как показали наши исследования, увеличение некоторых меристематических и дальнейшее формирование вегетативных почек канны садовой сорта Ливадия происходили на 30-е сутки. При перенесении на среду МС с добавлением 1.5 мг/л БАП и 1.5 мг/л ИУК уже сформировавшихся микропобегов размером 1.5 см происходило их удлинение на 5 см и разворачивание пары листьев. При продолжительном культивировании

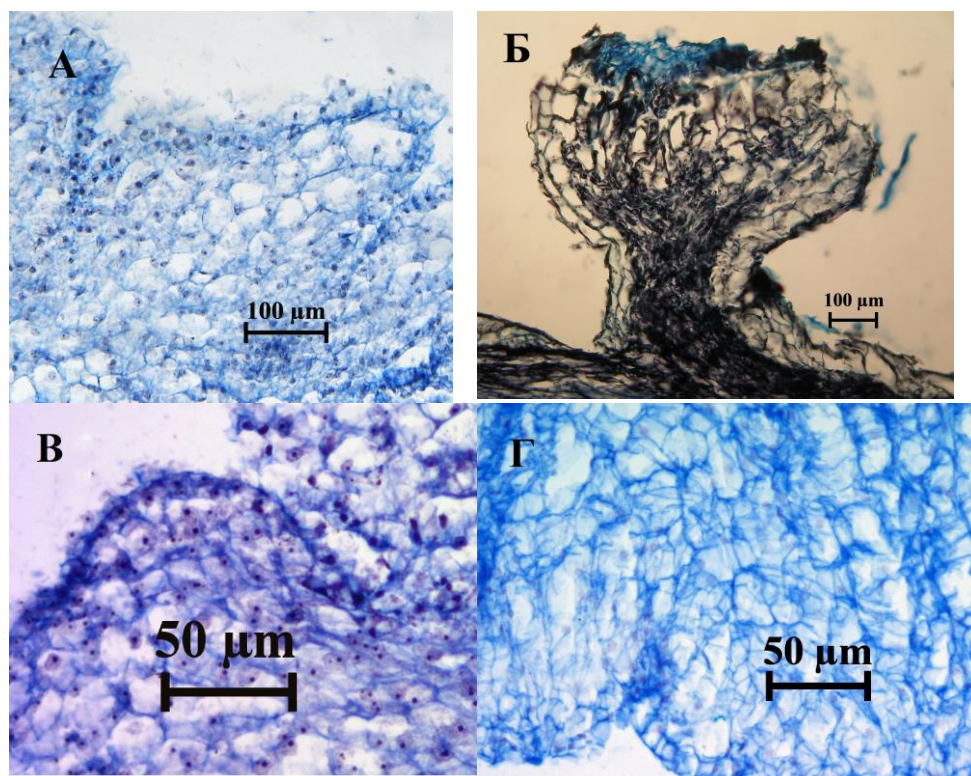


Рис. Гистологические исследования органогебеза канны садовой: а – образование меристемоида сорта Ливадия; б – отмирающий меристемоид сорта Ливадия; в – образование меристемоида сорта Суевия; г – неморфогенный каллус сорта Суевия

ровании образовалось до 4 корней/эксплант длиной до 5 см.

і депонуванні цінного рослинного генофонду» (№ ГР Ф. 0111U003361).

Выводы

Выявлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Ливадия необходимо добавление в питательную среду 1.91 мг/л ТДЗ. Для сортов Дар Востока и Суевия оптимальной концентрацией является 1.24 мг/л ТДЗ. Гистологический анализ подтвердил получение меристемоеидов сортов Суевия и Ливадия. Установлено, что для получения регенерантов канны садовой на этапе ризогенеза необходимо присутствие в питательных средах ИУК.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории дендрологии и цветоводства НБС-ННЦ Н.В. Зубковой за любезно предоставленные растения канны садовой.

Робота виконана в рамках науково-технічних програм НБС-ННЦ НААН України по темі 10.00.02.08 «Створити біотехнологічні системи соматичного ембріогенезу та органогенезу в in vitro садових культур і виявити особливості діагностування фітопатогенів при розмноженні

Список литературы

1. Феофилова Г.Ф. Ассортимент и технология выращивания перспективных сортов канны для южных районов страны // Труды Никитского ботан. сада. 1991. Т. 112. С. 41–50.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
3. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1970. 255 с.
6. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. 2000. Т. 85. № 6. С. 168–171.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
8. Тевфик А.Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida* Hort.) в культуре вегетативных почек *in vitro* // Труды Никитского ботан. сада. 2012. С. 426–435.

THE INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON REGENERATION CAPACITY OF GARDEN CANNA (*CANNA* × *HYBRIDA* HORT.) *IN VITRO*

A.Sh. Tefvik, I.V. Mitrofanova, T.N. Kuzmina

Regeneration *in vitro* of microshoots from vegetative buds of canna (*Canna* × *hybrida* Hort.) has been induced. The optimal concentrations of cytokinin TDZ (1.24–1.91 mg/l) for active shoots formation of *Canna* cvs. Suevia, Dar Vostoka, Livadia have been established. The results of histological studies are presented of canna meristemoids that have developed. Rooting plants of 3 canna cultivars have been obtained.

Keywords: *Canna*, meristemoid, regeneration, *in vitro* culture.

References

1. Feofilova G.F. Assortiment i tekhnologiya vyrashchivaniya perspektivnykh sortov kanny dlya yuzhnykh raionov strany // Trudy Nikitskogo botan. sada. 1991. T. 112. S. 41–50.
2. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannykh tkanei i fiziologiya morfogeneza rastenii. M.: Nauka, 1964. 272 s.
3. Mitrofanova I.V. Somaticheskii embriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii polucheniya i sokhraneniya mnogoletnikh sadovykh kul'tur. Kiev: Agrarna nauka, 2011. 344 s.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
5. Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rastenii. M.: Kolos, 1970. 255 s.
6. Zhinkina N.A., Voronova O.N. K metodike okraski embriologicheskikh preparatov // *Botan. zhurn.* 2000. T. 85. №.6. S. 168–171.
7. Lakin G.F. Biometriya: Ucheb. posobie dlya biol. spets. vuzov. M.: Vysshaya shkola, 1990. 352 s.
8. Tefvik A.Sh. Regeneratsiya rastenii kanny sadovoi (*Canna* × *hybrida* Hort.) v kul'ture vegetativnykh pochetk *in vitro* // Trudy Nikitskogo botan. sada. 2012. S. 426–435.