

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA*×*HYBRIDA HORT.*)

А. Ш. Тевфик
И. В. Митрофанова
Т. Н. Кузьмина

Никитский ботанический сад —
Национальный научный центр НААН Украины, АР Крым

E-mail: in_vitro@ukr.net

Получено 14.04.2014

Получены регенеранты канны садовой (*Canna*×*hybrida hort.*) сортов Suevia, Дар Востока, Ливадия. Установлено, что жизнеспособность и регенерационный потенциал микропобегов канны зависят от генотипа. Определены оптимальные регуляторы роста, влияющие на процесс морфогенеза растений *in vitro*. На этапе микроразмножения различных сортов канны садовой необходимо добавление в питательную среду 1,24–1,91 мг/л тидиазурона. Выявлено, что активное корнеобразование микропобегов сортов Дар Востока и Suevia индуцирует присутствие в питательной среде ауксинов: β-индолил-3-уксусной и α-нафтилуксусной кислот. Отмечено, что микропобеги сорта Suevia способны образовывать спонтанные корни. Результаты гистологических исследований подтвердили формирование меристематических островков при культивировании эксплантов канны *in vitro*.

Ключевые слова: канна, регенерация, меристематический островок.

В связи с высокой поражаемостью ценных сортов декоративных растений грибными и вирусными болезнями в последние годы активно разрабатываются новые методы диагностики болезней и размножения растений. Культура *in vitro* в комплексе с другими методами обеспечивает оздоровление растений, позволяет получать посадочный материал в большем количестве и в более сжатые сроки, чем при использовании традиционных методов размножения [1, 2].

Канна садовая (*Canna* × *hybrida hort.*) — многолетнее травянистое растение семейства Cannaceae Juss, порядка Zingiberales Nakai, с подземным симподиальным корневищем и с прямым ложным стеблем высотой 0,5–2,5 м. При оформлении садов и парков канны создают крупные красочные массивы благодаря ярким цветкам различной окраски и бананоподобным листьям [3, 4]. Имеются лишь единичные сообщения зарубежных ученых, касающиеся биотехнологических исследований канны таких видов, как *Canna indica* L. и *Canna edulis* Ker. Поэтому выявление морфогенетического потенциала органов и тканей в условиях *in vitro* перспективных сортов канны садовой является актуальным.

Целью исследования было выявление морфогенетического потенциала органов и

тканей и разработка биотехнологических приемов микроразмножения перспективных сортов канны садовой.

Материалы и методы

В исследовании использовали перспективные сорта канны садовой (*Canna* × *hybrida hort.*) из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада (НБС, г. Ялта): 2 сорта селекции НБС (Дар Востока, Ливадия) и 2 сорта зарубежной селекции (President, Suevia).

Исследования проводили в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС. В работе использовали общепринятые методы культуры органов и тканей растений [5], а также разработанные в отделе биотехнологии растений НБС [2]. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки.

Экспланты, прошедшие стерилизацию, в асептических условиях помещали в пробирки на агаризованную питательную среду. В качестве базовых сред использовали модифицированные питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) [6] и Пиррика [7] с регуляторами роста (Sigma, США): 1,5–4 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 1,27–1,91 мг/л тидиазурона (ТДЗ), 0,5 мг/л кинетина,

1,5 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), 1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК). Для индукции развития экспланты переносили в культуральную комнату с температурой 24 ± 1 °С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2–3 клк.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа [8]. Повторяемость опытов была пятикратной.

Для проведения гистологических исследований в качестве фиксатора использовали смесь Карнуа (этиловый спирт : хлороформ: уксусная кислота 6:3:1). После фиксации объекты хранили в 70%-м этаноле.

Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике [9], заключающейся в последовательном обезжизивании и пропитывании материала ксилолом с последующим переводом объекта в парафин. Парафиновые срезы толщиной 12–15 мкм делали на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим [10]. Анализировали материал с помощью микроскопов Jenaval и AxioScoreA.1 (Zeiss, Германия) методами светлого поля, а также поляризационной микроскопии. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s и цифровой фотокамеры Olympus SP-350 с применением программы AxioVisionRel. 4.8.2.

Результаты и обсуждение

Одним из факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro*, является состав питательной среды. В зависимости от поставленных задач, этапов клонального микроразмножения в питательные среды добавляют регуляторы роста цитокининового и ауксинового типов действия [6]. Для инициации развития в условиях *in vitro* первичных эксплантов (вегетативных почек) канны садовой нами была использована модифицированная питательная среда Мурасиге–Скуга с 2–4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ [11].

Собственно микроразмножение. В процессе исследования в качестве индукторов адвентивного побегообразования применяли цитокинины БАП и ТДЗ. Микропобеги канны садовой сортов Suevia, Дар Востока и Ливадия, культивируемые на питательной среде с добавлением 1,27–1,91 мг/л ТДЗ, на 12-е сут образовывали адвентивные побеги. Последующее культивирование таких побегов способствовало увеличению их длины (рис. 1).

Длина адвентивного побега сорта Suevia при добавлении в питательную среду МС 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК на 18-е сут культивирования составила 3 см. Однако при дальнейшем культивировании на данной питательной среде отмечали меньшее количество сформировавшихся адвентивных побегов на эксплант, чем при использовании 1,27 мг/л

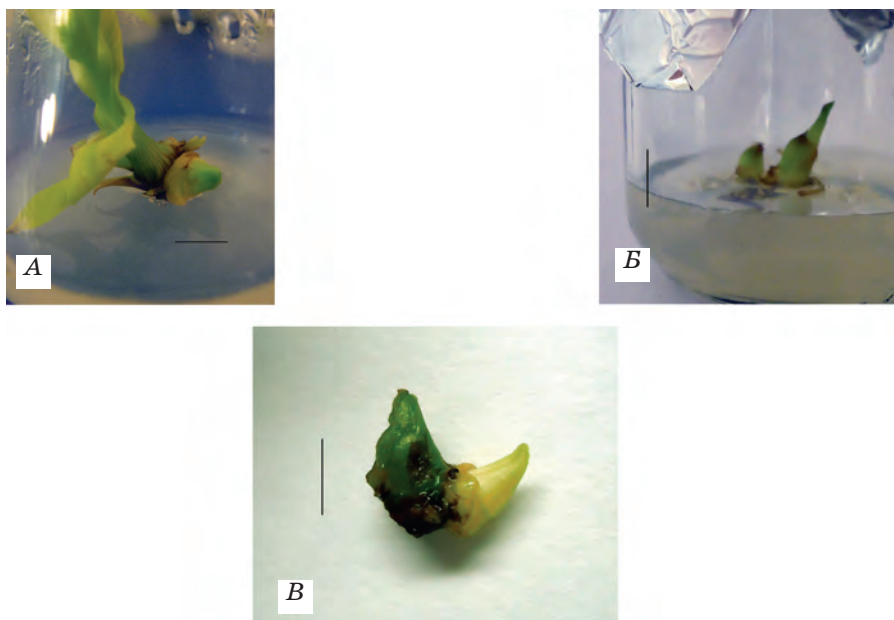


Рис. 1. Адвентивное побегообразование канны садовой на 21-е сут культивирования: А — у сорта Suevia на питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ; Б — у сорта Ливадия на питательной среде МС с 1,94 мг/л ТДЗ; В — у сорта Дар Востока на питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ (здесь и далее масштаб 1 см)

ТДЗ (до 7 шт./эксплант). На 60-е сут культивирования на питательной среде, дополненной БАП и ИУК, образованы 2 дополнительных микропобега на эксплант.

Исследования показали, что в базальной части некоторых микропобегов канны садовой сорта *Suevia* формируются меристемойды зеленой и светло-бежевой окраски. Количество меристемойдов и их окраска зависели от продолжительности культивирования. Так, на 120-е сут культивирования наблюдали образование меристемойдов зеленой окраски ($5,67 \pm 0,41$ шт./эксплант). При дальнейшем культивировании отмечали формирование меристемойдов белой окраски (табл. 1).

У канны садовой сорта *Ливадия* на питательной среде МС, дополненной 2,55 мг/л ТДЗ, на 10-е сут культивирования появлялись адвентивные побеги. В процессе дальнейшего культивирования таких эксплантов наблюдали постепенное потемнение и отмирание основного побега. При отделении адвентивных побегов от основного побега и последующем культивировании формировались меристемойды и новые адвентивные почки. Через 90 сут культивирования *in vitro* на данной питательной среде коэффициент размножения составил $6,5 \pm 0,75$ (табл. 2). Однако, уже на 100-е сут культивирования образовавшиеся меристемойды начинали коричневеть, что чаще всего приводило к их гибели.

Результаты исследований показали, что продолжительное культивирование эксплантов сорта канны садовой *Ливадия* на питательной среде с 1,91 мг/л ТДЗ индуцировало образование меристемойдов. Так, на 120-е сут культивирования было получено 11,0 меристемойдов/эксплант. Вместе с тем через 6–7 мес в асептических условиях формировалось максимальное количество меристемойдов (40 шт/эксплант) размером от 0,1 до 0,7 см. Наряду с этим применение 1,91 мг/л ТДЗ не вызывало последующей регенерации этих меристемойдов. Поэтому отдельные меристемойды и группы меристемойдов (по 2–3 шт.) переносили на питательную среду МС, дополненную 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

Проведенные гистологические исследования позволили выявить некоторые особенности развития образующихся меристемойдов канны садовой (рис. 2).

В процессе исследований удалось индуцировать образование меристемойдов у сорта *Ливадия*, в результате можно было наблюдать скопления меристематических очагов в основании микропобега. Кроме того, в некоторых случаях отмечено дальнейшее развитие этих структур в виде меристемы побега и примордиальных листьев (рис. 2, А). Нарис. 2, Б показано, что у канны формируется множество адвентивных почек. Отмечено также появление трахеоподобных структур и скопление паренхимных клеток (рис. 2, В).

Таблица 1. Образование меристемойдов канны садовой сорта *Suevia* в зависимости от продолжительности культивирования на питательной среде МС, дополненной 1,27 мг/л ТДЗ

Продолжительность культивирования, сут	Количество образовавшихся меристемойдов, шт/эксплант	Количество меристемойдов зеленой окраски, %	Количество меристемойдов бежевой окраски, %
120 (контроль)	$5,67 \pm 0,41$	100,00	0
150	$8,50 \pm 0,33^*$	76,47	23,53
165	$13,50 \pm 0,33^*$	43,50	56,50
180	$20,25 \pm 0,55^*$	33,30	66,70

Здесь и далее: * — $P < 0,05$.

Таблица 2. Влияние продолжительности культивирования и концентрации ТДЗ в питательной среде МС на формирование меристемойдов канны садовой сорта *Ливадия*

Продолжительность культивирования, сут	1,91 мг/л ТДЗ		2,55 мг/л ТДЗ	
	Количество меристемойдов на эксплант, шт.	Средняя длина меристемойдов, см	Количество меристемойдов на эксплант, шт.	Средняя длина меристемойдов, см
30 (контроль)	$2,00 \pm 0,47$	$0,90 \pm 0,19$	$1,75 \pm 0,29$	$0,53 \pm 0,13$
60	$2,25 \pm 0,29$	$0,63 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,71^*$	$0,49 \pm 0,08$
90	$3,75 \pm 0,29^*$	$0,55 \pm 0,07$	$6,5 \pm 0,75^*$	$0,5 \pm 0,05$
120	$11,00 \pm 0,47^*$	$0,45 \pm 0,08$	—	—

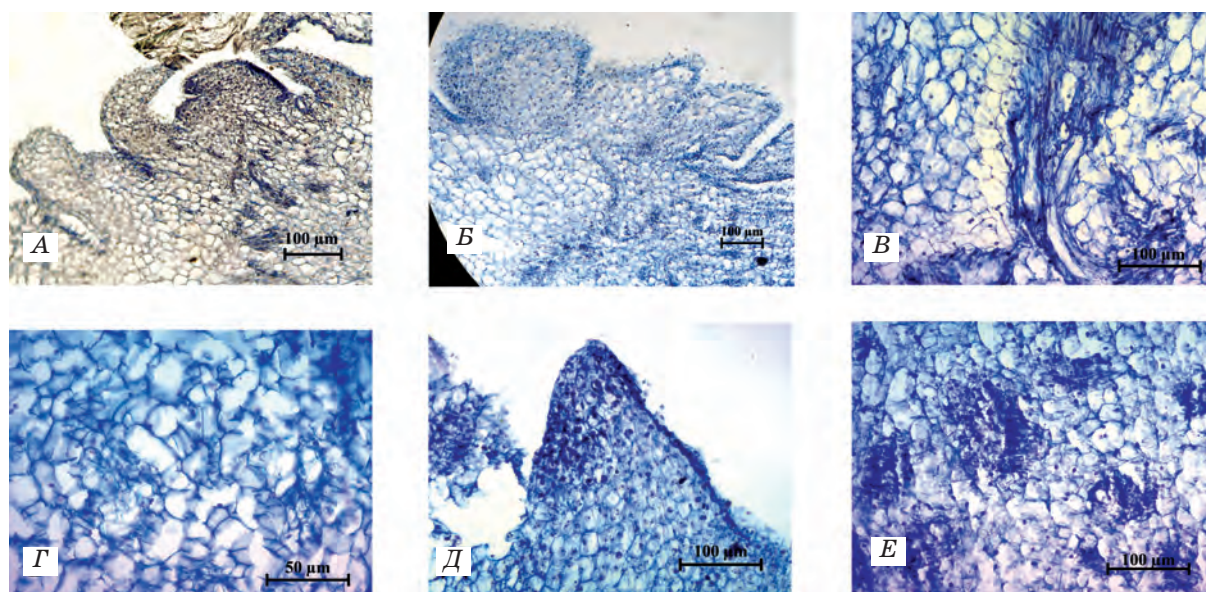


Рис. 2. Гистологические исследования органогенеза *in vitro* канны садовой:

- А — развитие меристемы побега и примордиальных листьев сорта Ливадия;
 Б — образование адвентивных почек в основании микропобега сорта Ливадия;
 В — гистогенез у сорта Ливадия;
 Г — неморфогенный каллус сорта Suevia;
 Д — образование меристемоида сорта Suevia;
 Е — гистогенез у сорта Suevia

Длительное культивирование некоторых меристемоеидов сорта Ливадия способствовало их удлинению и разворачиванию листьев (рис. 3, В).

Результаты гистологического анализа показали, что у сорта Suevia развиваются отдельные меристематические зоны, из которых затем формируются меристемоеиды (рис. 2, Д). У сортов Suevia и Ливадия наблюдали также другой тип дифференциации тканей — гистогенез (рис. 2, Е). Образующийся в основании микропобегов сорта Suevia неморфогенный каллус (рис. 2, Г) состоял из клеток, не способных к дедифференциации. Клетки, составляющие каллус, паренхимного типа — крупные, вакуолизированные.

При культивировании экспланта сорта President (рис. 3, Б) на питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, наблюдали разворачивание листьев. Вместе с тем у канны этого сорта, по сравнению с сортом Suevia, образования дополнительных побегов и корней не отмечали. Культивирование на питательных средах с ТДЗ вызывало образование каллуса в основании микропобегов. После отделения и при последующем культивировании каллус темнел и отмирал.

В процессе исследований у микропобегов сорта канны садовой Дар Востока на пита-

тельной среде Пирика, дополненной 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК, было отмечено разворачивание листьев и образование корней (рис. 3, А).

Укоренение микропобегов in vitro. Как показали наши исследования, некоторые экспланты канны садовой сорта Suevia способны к спонтанному корнеобразованию. Так, при культивировании микропобегов этого сорта отмечено спонтанное корнеобразование на 37-е сут культивирования.

Наряду с этим среднее количество корней на эксплант на 94-е сут культивирования в асептических условиях составило $1,1 \pm 0,31$ шт. (рис. 4). На 145-е сут культивирования в условиях *in vitro* сформировалось до 4 корней/эксплант. При длительном культивировании увеличивалась средняя длина корней.

Для индуцирования ризогенеза микропобегов канны садовой использовали вещества ауксинового типа действия ИУК и НУК.

У сортов канны садовой Suevia и Дар Востока на 15-е сут культивирования на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, происходило образование корней. При последующем культивировании наблюдали активный рост корешков первого, а также образование корешков второго порядка. Так, на 60-е сут культивирования на данной среде отмечали образование

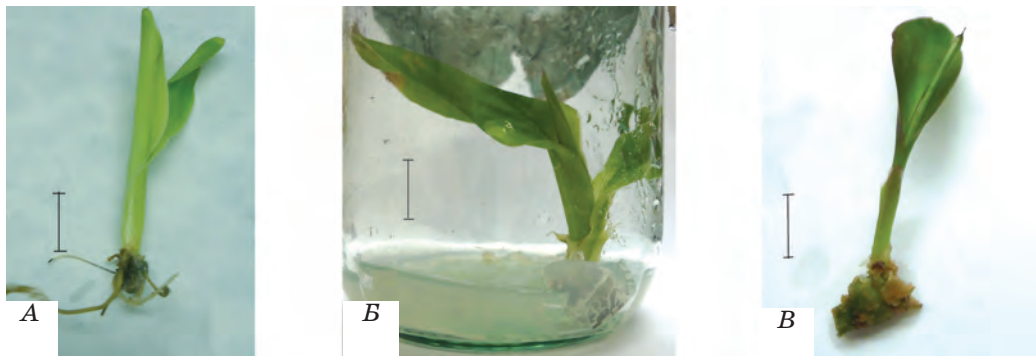


Рис. 3. Микропобеги канны садовой:

А — укорененный микропобег у канны сорта Дар Востока; Б — сорта President; В — сорта Ливадия

Таблица 3. Влияние продолжительности культивирования и регуляторов роста на образование корней канны садовой

Продолжительность культивирования, сут	Питательная среда	Suevia		Дар Востока	
		К-во образовавшихся корней/эксплант, шт.	Средняя длина корней, см	К-во образовавшихся корней/эксплант, шт.	Средняя длина корней, см
30 (контроль)	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	1,75 ± 0,29	2,00 ± 0,71	3,00 ± 0,47	2,70 ± 0,24
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	3,00 ± 0,81	2,81 ± 0,61	1,50 ± 0,33	0,73 ± 0,17
60	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	6,25 ± 1,19*	3,56 ± 0,41	5,00 ± 0,47*	7,43 ± 0,99*
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	6,50 ± 1,00*	6,16 ± 0,95*	2,25 ± 0,29	3,00 ± 0,35*
90	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	—	—	—	—
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	—	—	6,00 ± 0,47*	3,28 ± 0,49*

Примечание: при данном сроке культивирования высаживали на адаптацию.



Рис. 4. Изменение количества и длины спонтанно образующихся корней эксплантов сорта Suevia при культивировании *in vitro*

5–6 корней длиной около 8 см.

Наряду с этим помещение микропобегов сорта Suevia на питательную среду Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК позволило индуцировать активное корнеобразование (6,5 шт./эксплант) на 60-е сут культивиро-

вания (табл. 3). Микропобеги образовывали 6 корней/побег и при более длительном культивировании. Развитие полноценных регенерантов с хорошо развитыми корнями у сорта Дар Востока отмечали на 90-е сут культивирования.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на способность микропобегов канны садовой формировать дополнительные побеги большое влияние оказывает состав регуляторов роста в питательной среде. Так, активное побегообразование микропобегов сортов Дар Востока и Suevia происходило на модифицированной питательной среде МС с добавлением 1,24 мг/л ТДЗ. Показано, что регенерационная способность микропобегов сорта Ливадия повышалась при оптимальной концентрации ТДЗ 1,91 мг/л. Проведенный гистологический анализ подтвердил, что в условиях *in vitro* морфогенетический потенциал этой куль-

туры реализуется через этап формирования меристемOIDов в основании микропобегов у сортов Suevia и Ливадия. Выявлены особенности ризогенеза *in vitro* и получены регенеранты 3 сортов.

REFERENCES

1. Mitrofanova I. V. Microclonal propagation of subtropical and tropical fruits (overview). *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada*. 1997, V. 119, P. 63–95. (In Russian).
2. Mitrofanova I. V. Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnology of obtaining and conservation perennial horticultural plants. *Kyiv: Ahrarna nauka*. 2011, 344 p. (In Russian).
3. Dashkeev E. A. Canna in Moldova. *Kishinev: Shtinitsa*. 1975, 65 p. (In Russian).
4. Feofilova G. F. Assortment and growing technology of promising canna varieties for homeland's south regions. *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada*. 1991, V. 112, P. 41–50. (In Russian).
5. Butenko R. G. Culture of isolated tissues and physiology of plants morphogenesis. *Moscow: Nauka*. 1964, 272 p. (In Russian).
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, 15(3), 473–497.
7. Pierik R. L. M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 1976, N 7, P. 80–82.
8. Lakin G. F. Biometrics: a textbook for universities biological specialties. *Moscow: Vysshaya shkola*. 1990, 352 p. (In Russian).
9. Pausheva Z. P. Handbook of plants cytology. *Moscow: Kolos*. 1970, 255 p. (In Russian).
10. Zhinkina N. A., Voronova O. N. The coloring method of embryological preparations. *Botanicheskii zh.* 2000, 85(6), 168–171. (In Russian).
11. Tevfik A. Sh. Horticultural Canna (*Canna × hybrida hort.*) plants regeneration in culture of vegetative buds *in vitro*. *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada*. 2012, V. 134, P. 426–435. (In Russian).

**ОСОБЛИВОСТІ КЛОНАЛЬНОГО
МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ КАННИ САДОВОЇ
(CANNA × HYBRIDA HORT.)**

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

Нікітський ботанічний сад — Національний науковий центр НААН України, АР Крим

E-mail: in_vitro@ukr.net

Одержано регенеранти канни садової (*Canna × hybrida hort.*) сортів Suevia, Дарунок Сходу, Ливадія. Встановлено, що життєздатність та регенераційний потенціал мікропагонів канни залежать від генотипу. Визначено оптимальні регулятори росту, які впливають на процес морфогенезу рослин *in vitro*. На етапі мікроспроможження різних сортів канни садової слід додавати в живильне середовище 1,24–1,91 мг/л тидіазурону. Виявлено, що активне коренеутворення мікропагонів сортів Дарунок Сходу та Suevia індукує присутність в живильному середовищі ауксинів: β-індоліл-3-оцтової та α-нафтилоцтової кислот. Відзначено, що мікропагони сорту Suevia здатні утворювати спонтанні корені. Результати гістологічних досліджень підтвердили формування меристемOIDів за культивування експлантів канни *in vitro*.

Ключові слова: канна, регенерація, меристемOID.

**THE PECULIARITIES OF CLONAL MICRO-
PROPAGATION OF CANNA GARDEN
(CANNA × HYBRIDA HORT.)**

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

Nikitsky Botanical Garden —
National Scientific Centre of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine,
Crimea Autonomic Republic, Ukraine

E-mail: in_vitro@ukr.net

Regenerants of Canna (*Canna × hybrida hort.*) cvs. Suevia, Dar Vostoka and Livadia have been obtained. Dependence of viability and regenerative capacity of Canna microshoots on genotype has been found. The optimal concentrations of growth regulators that influence on morphogenesis *in vitro* have been determined. At the micropropagation stage of different cultivars of Canna it needs the addition of 1.24–1.91 mg/l thidiazuron to culture medium. The active rooting of Canna microshoots cvs. Dar Vostoka and Suevia on the culture medium Murashige & Skoog and Pierik with auxins β-indol-3-acetic acid and α-naphthylacetic acid have been observed. The ability of Canna cv. Suevia microshoots to spontaneous root formation has been shown. The formation of meristemoids in culture *in vitro* of Canna explants have been confirmed by the results of histological investigations.

Key words: canna, regeneration, meristemoid.