

**УДК 582.548.25: 57.085.23**

## **ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЗАРОДЫШЕЙ И СЕМЯН КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

***Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В.***

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта*  
*E-mail: in\_vitro@ukr.net*

Получена асептическая культура семян четырех сортов канны садовой (*Canna* × *hybrida hort.*). Изучены особенности прорастания семян и формирования сеянцев в условиях *in vitro*. Показано возможность образования каллуса и эмбриоподобных структур. С помощью метода эмбриокультуры *in vitro* получены жизнеспособные растения канны садовой сорта Дар Востока.

**Ключевые слова:** канна, эмбриокультура, *in vitro*.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В оформлении садов и парков Южного берега Крыма заслуженное место занимает канна садовая (*Canna* × *hybrida hort.*). Эта культура имеет продолжительное цветение, яркие цветки и соцветия разнообразных форм и окрасок. Канна садовая хорошо переносит пониженную влажность воздуха и практически не повреждается вредителями. Однако имеются литературные данные о поражаемости растений грибными, бактериальными и особенно вирусными болезнями [1].

Изучение некоторыми учеными биологии прорастания семян канны садовой показало, что в обычных условиях этот процесс занимает от одного до двух лет [1, 2]. Применение культуры *in vitro* позволяет значительно сократить сроки получения оздоровленного посадочного материала ценных сортов *Canna* × *hybrida*, а также ускорить создание новых форм.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы выявить морфогенетический потенциал зародышей и семян перспективных сортов канны садовой в условиях *in vitro*.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектами настоящего исследования служили перспективные сорта канны из коллекционных насаждений НБС – ННЦ: 2 сорта селекции НБС (Дар Востока, Ливадия) и 2 сорта зарубежной селекции (Президент, Суевия).

Исследования проводили в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ. В работе использовали методы культуры органов

и тканей, общепринятые [3] и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС-ННЦ [4].

Коробочки канны садовой, отобранные в сентябре, обрабатывали 96% этанолом, обжигали в пламени спиртовки, после чего извлекали семена. Изолированные зародыши помещали на агаризованную среду Монье [5] без регуляторов роста. Недоразвитые семена помещали на питательную среду Мурасиге Скуга [6] с добавлением различных концентраций регуляторов роста: RG1 – MS + 1,5 мг/ л БАП +1,5 мг/ л ИУК; RG2 – MS + 2 мг/ л БАП +1,75 мг/ л ИУК; RG3 – MS + 2 мг/ л БАП +2 мг/ л ИУК; RG4 – MS + 1,3 мг/л ТДЗ. Пробирки с семенами переносили в культуральную комнату с температурой  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000-3000 лк. Изолированные зародыши стратифицировали в условиях пониженной температуры (без освещения при температуре  $5\pm 1^\circ\text{C}$ ). Проростки и растения мы культивировали при стандартных условиях выращивания *in vitro*.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа [7].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований было выявлено, что используемый нами способ стерилизации позволил получить у сортов Ливадия и Суевия экспланты, свободные от контаминации. При этом, у сортов канны садовой Дар Востока и Президент частота контаминации составила 5 и 14% соответственно.

Для индукции различных путей морфогенеза нами использованы в качестве первичных эксплантов недозрелые семена. В наших опытах жизнеспособность культивируемых эксплантов зависела от состава питательной среды и от продолжительности культивирования (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Жизнеспособность недозрелых семян в зависимости от содержания регуляторов роста в питательной среде (%)**

Сорт	RG1 (MS + 1,5 мг/ л БАП +1,5 мг/ л ИУК)		RG2 (MS + 2 мг/ л БАП +1,75 мг/ л ИУК)		RG3 (MS + 2 мг/ л БАП +2 мг/ л ИУК)		RG4 (MS + 1,3 мг/л ТДЗ)	
	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут
Дар Востока	60	17	57	43	73	43	100	64
Ливадия	100	42	75	53	75	64	67	27
Президент	73	17	100	0	63	20	43	7
Суевия	30,8	14,3	56	25	50	0	40	0

Для поддержания жизнеспособности эксплантов сорта Дар Востока на 21-е сутки культивирования оптимальной оказалась питательная среда RG4. При этом, на данной среде отмечали появление набухших семян у 63,6% жизнеспособных незрелых семян.

У сорта канны садовой Ливадия (рис. 1а) спустя 3 недели культивирования *in vitro* больше всего жизнеспособных эксплантов (53-64%) было получено на питательной среде MS + 1,5 мг/л БАП + 1,5-1,75 мг/л ИУК. Вместе с тем, количество набухших семян достигало 81,8% и 64,7% на средах RG2 и RG3, соответственно.

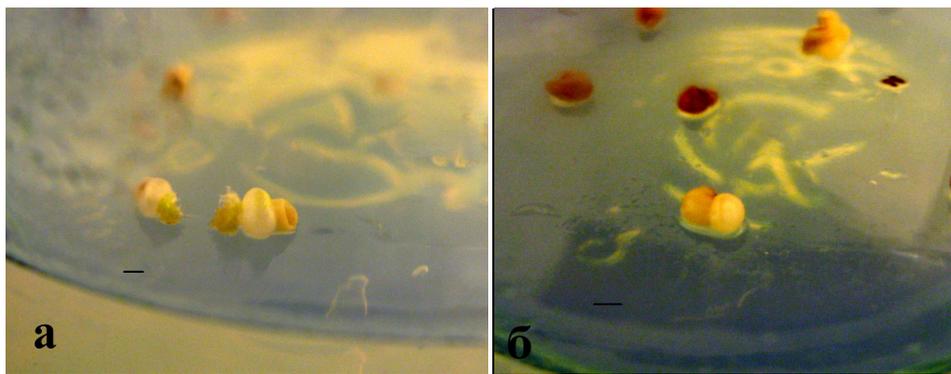


Рис. 1. Недозрелые семена на 15 сут культивирования на питательной среде RG3: а) сорта Ливадия; б) сорта Президент (масштаб 1мм)

Наряду с этим, у сортов Президент и Суевия на 21-е сутки культивирования отмечена низкая жизнеспособность эксплантов на всех использованных питательных средах. На среде RG3 у сорта Президент (рис. 1б) удалось получить 60% набухших семян.

Вместе с тем для индукции прорастания семян нами в качестве эксплантов были использованы зрелые семена. Выявлено, что на 60 сут культивирования после стратификации жизнеспособность эксплантов составила 100%. Однако в дальнейшем наблюдали потемнение и постепенную их гибель. Возможно это связано с тем, что семена канны садовой имеют склерифицированную семенную кожуру, препятствующую прорастанию зиготического зародыша [1, 2]. В связи с трудностью прорастания семян, нами был использован метод эмбриокультуры.

Большинство сортов канны садовой формируют недоразвитые зародыши. Культивирование *in vitro* изолированных зародышей позволяет получить полноценные растения. Для индукции прорастания зародышей их стратифицировали в условиях *in vitro* при пониженной температуре ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) и отсутствии освещения на питательной среде Монье.

Отмечено, что у изолированных из семени зародышей сорта Дар Востока на 8-е сутки культивирования происходило разрастание тканей. На 14-е сутки культивирования длина и толщина зародыша увеличились на 0,5 и 0,36 см,

соответственно (табл. 2). Однако, при последующем культивировании ткани зародыша разрастались менее интенсивно (0,16 и 0,08 см).

**Таблица 2**  
**Разрастание тканей изолированных зародышей сорта Дар Востока**  
**в зависимости от продолжительности культивирования**

Характеристика зародыша	Исходный размер	Увеличение размера, см		
		на 14-е сутки культивирования	на 25-е сутки культивирования	на 35-е сутки культивирования
Длина, см	0,58±0,08	0,5±0,03	0,16±0,05	0,16±0,04
Ширина, см	0,22±0,04	0,36±0,08	0,08±0,04	0,1±0,05

В процессе исследования на поверхности отдельных зародышей формировался каллус двух типов: плотный и рыхлый (рис. 2а). Наряду с этим, у некоторых изолированных зародышей на 21-е сут культивирования развивались корни (1-4 шт./эксплант). Частота корнеобразования достигала 25%. На 50-е сутки культивирования средняя длина корней составила 0,73±0,06 см (рис. 2б).

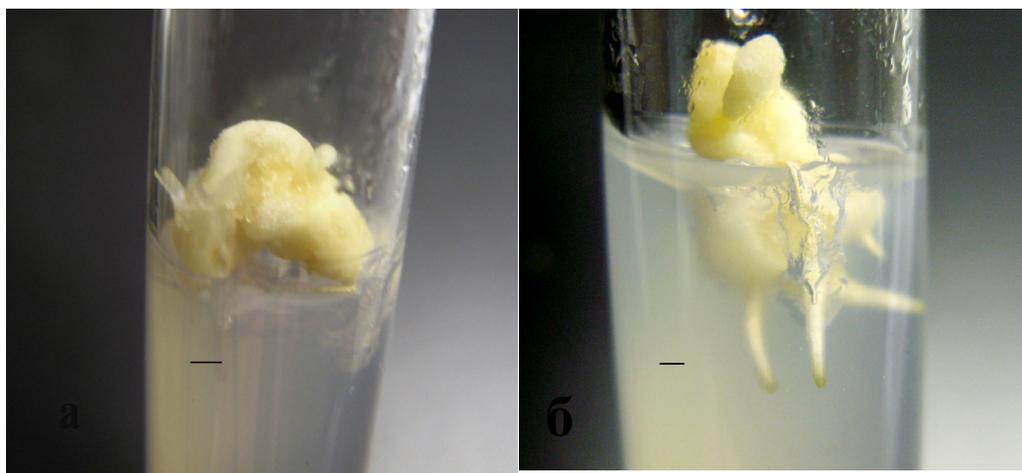


Рис. 2. Зародыши канны садовой сорта Дар Востока на 30-е сутки культивирования: а) формирование плотного и рыхлого каллуса на поверхности экспланта; б) развитие корней у зародыша (масштаб 1мм)

Через 60 суток культивирования при  $5\pm 1^\circ\text{C}$ , в темноте изолированные зародыши с развившимися корнями переносили в стандартные условия с температурой  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000-3000 лк. В условиях освещения на 2-е сутки культивирования экспланты изменили свою окраску с светло-бежевой на зеленую. При этом, на 6-8 сутки культивирования в культуральной комнате у зародышей наблюдали появление

первого листа (рис. 3). На 10-е сутки культивирования длина листа составила  $2,5 \pm 0,61$  см.

Наряду с этим, у развившихся из зародышей проростков и растений в стандартных условиях культивирования наблюдали увеличение количества и длины корней. Так, у некоторых эксплантов на 10-е сутки культивирования количество корней на эксплант увеличилось до  $8,2 \pm 1,78$  шт. Длина корней на данный срок культивирования составила  $2,04 \pm 0,23$  см (табл. 3).

Таблица 3

**Морфологические признаки проростков, полученных из изолированных зародышей сорта Дар Востока при культивировании *in vitro***

Морфологические признаки	Культивирование в условиях стратификации (60 сут)	Срок культивирования в стандартных условиях	
		10-е сут	35-е сут
Среднее количество корней, шт.	$2,57 \pm 0,52$	$8,2 \pm 1,78$	$11,33 \pm 0,41$
Средняя длина корней, см	$0,45 \pm 0,09$	$2,04 \pm 0,23$	$3,8 \pm 0,14$
Среднее количество листьев, шт.	–	$1,2 \pm 0,22$	$2,5 \pm 0,33$
Средняя длина листьев, см	–	$2,5 \pm 0,61$	$8,75 \pm 0,37$

Проведенные исследования показали, что после стратификации на 35-е сут культивирования в стандартных условиях развились полноценные проростки сорта Дар Востока [8, 9]. При этом, они имели хорошо развитые корни (11 шт./эксплант) и 2-3 развернувшихся листа.

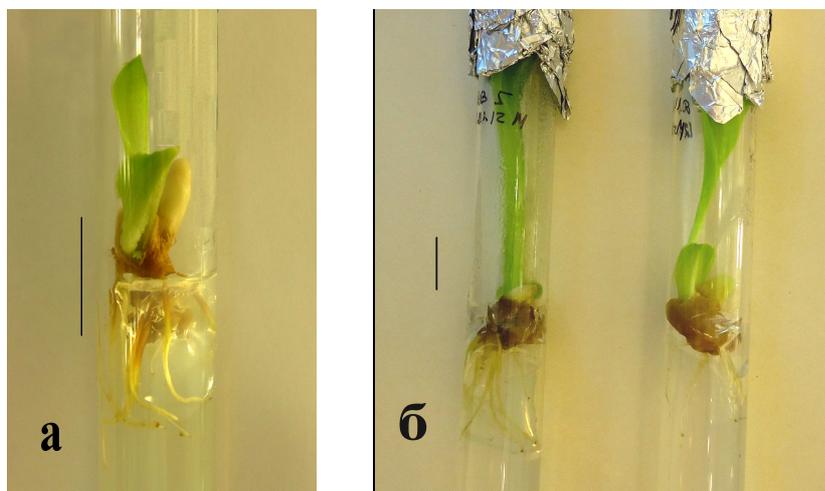


Рис. 3. Появление первого листа у зародышей канны садовой сорта Дар Востока при культивировании в стандартных условиях: а) 6-8 сутки; б) 15-е сутки (масштаб 1 см)

При культивировании зародыша сорта Ливадия на 30-е сутки культивирования отмечали формирование глобулярных структур. При последующем культивировании отметили увеличение их количества и размеров (рис. 4).

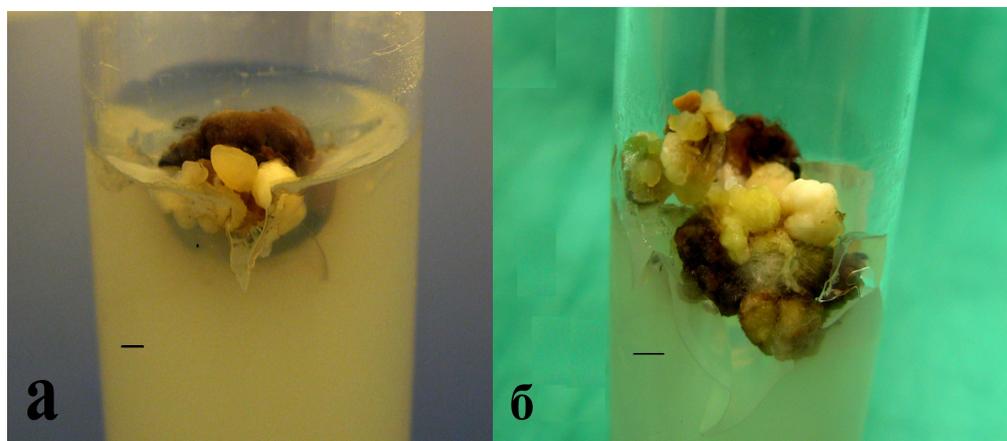


Рис. 4. Глобулярные и эмбриоподобные структуры у сорта Ливадия:  
а) на 36-е сутки культивирования;  
б) на 50-е сутки культивирования (масштаб 1мм)

Наряду с этим, жизнеспособные разросшиеся части каллуса и глобулярные структуры, сформировавшиеся из изолированного зародыша сорта канны Ливадия, изменили окраску с белой на светло-зеленую. Однако, при более длительном культивировании наблюдали потемнение и постепенное отмирание глобулярных структур.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после стратификации и культивирования в стандартных условиях происходило развитие полноценных проростков у сорта Дар Востока от свободного опыления. Полученные проростки могут представлять интерес для селекционной работы. Показаны возможности каллусообразования у зародышей сорта Ливадия.

#### Список литературы

1. Дашкеев Е.А. Канны в Молдавии. / Дашкеев Е.А. – Кишинев: «Штица». – 1975. – 65 с.
2. Ерушкевич С.В. Культура канн в Чуйской долине./ Ерушкевич С.В. – Фрунзе: Илим, 1983. – 49 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. / Бутенко Р.Г. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / Митрофанова И.В. – К.: «Аграрна наука», 2011. – 344 с.
5. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastories* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale / M. Monnier // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179-194.
6. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog //Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-497.

7. Лакин Г.В. Биометрия. / Лакин Г.В. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
8. Тевфик А.Ш. Пути реализации морфогенетического потенциала различных эксплантов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Цветоводство: традиции и современность: материалы VI Международной научной конференции, 15 – 18 мая 2013 г., Волгоград. – Белгород: НИУ «БелГУ», 2013. – С. 414-416.
9. Тевфик А.Ш. Введение в культуру *in vitro* изолированных зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Лесникова-Н.П. Седошенко // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. Международной научно-практической конференции. 13-15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь. – Минск : Изд. Центр БГУ, 2013. – С. 198.

**Тевфік А.Ш. Вивчення регенераційної здатності зародків та насінин канни садивної (*Canna × hybrida hort.*) в умовах *in vitro* / А.Ш. Тевфік, І.В. Митрофанова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 157-164.**

Отримана асептична культура насіння чотирьох сортів канни садивної (*Canna × hybrida hort.*). Вивчені особливості проростання насінин та формування сіянців в умовах *in vitro*. Показана можливість утворення калуса та ембріоподібних структур. За допомогою метода ембріокультури *in vitro* отримані життєздатні рослини канни садивної сорту Дар Востока.

**Ключові слова:** канна, ембріокультура, *in vitro*.

## THE INVESTIGATION OF REGENERATION ABILITY OF CANNA (*CANNA × HYBRIDA HORT.*) EMBRYOS AND SEEDS *IN VITRO*

*Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V.*

*Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre, Yalta*  
*E.mail: in\_vitro@ukr.net*

Peculiarities of immature, mature seeds and isolated embryos development in four cultivars (Suevia, Livadia, Dar Vostoka and President) of *Canna (Canna × hybrida hort.)* have been studied. The seed vessels of canna were worked up by 96% ethanol, burned by the flame of spiritlamp and then seeds were recovered. The results of our research have been demonstrated, that using sterilization method was allowed to obtain of explants of cvs. Livadia and Suevia without any contamination. By the way, the rate of contamination of explants Dar Vostoka and President make up 5 and 14%, respectively. Isolated embryos were inoculated into Monnier basal medium. Immature seeds were placed on modified Murashige and Skoog medium, supplemented with different concentration of growth regulators: 1.75-2 mg/l IAA + 2 mg/l BAP; 1.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l BAP; 1.3 mg/l TDZ. The stratification of isolated embryos was doing under low positive temperature (without light, 5°C). Our research was showed that the culture *in vitro* of immature seeds after 15-60 days was led its darkening and gradual death. For maintenance of viability of cv. Dar Vostoka explants (immature seeds) after 21 day of culture the optimal culture medium was MS with 1.3 mg/l TDZ. After 3 weeks of culture in cv. Livadia more viable explants (53-64%) have been obtained on the medium MS with 1.5 mg/l BAP and 1.5-1.75 mg/l IAA. Immature seeds of cvs. President and Suevia after 21 days of culture the low viability have been showed. On 60 days of culture under standard conditions after stratification 100%

viability of explants (mature seeds) has been identified. Later, however, observed its darkening and gradual death. Perhaps it was depending on the fact that seeds of *Canna* have very hard rind, which prevent germination of zygotic embryo. Due to the difficulty of seed germination, the method of embryoculture has been used. It was noted that isolated from the seed embryos cv. Dar Vostoka on the 8th day of culture characterized by tissue growth. During investigation two type of callus (dense and loose callus) on the embryo has been formed. Along with this, some isolated embryos at the 21th day of culture developed roots (1-4 pcs. / explant). After 60 days of stratification isolated embryos were incubated in the growth room at  $24\pm 1^\circ\text{C}$  under a 16 hour photoperiod and at light intensity of 2000-3000 lux. Under light conditions within 2 days of culture at standard condition the explants were changed color from light beige to green. Within 6-8 days in the growth room the cultured embryos first leaf have been occurred. Alongside with, on the developed seedlings and plants from zygotic embryos the increasing of number and length of roots has been fixed. Within 30 days of culture of isolated embryos in cv. Livadia formed globular-like structures. However, if longtime culture was used the progressive darkening and dieback of globular structures have been observed. The investigation was shown, that after stratification on the 35 days of culture in the standard conditions the normal *Canna* seedlings in cv. Dar Vostoka have been developed. Thus, this seedlings had well-developed 11 roots per explants and 2-3 leaves. Obtained seedlings could be interested to use for breeding.

**Keywords:** canna, embryoculture, *in vitro*.

#### References

1. Dashkeev E.A., *Canna in Moldova*, 65 p. (Kishinev: Shtiitsa, 1975).
2. Erushkevich S.V., *Culture Cannes in the Chu Valley*, 49 p. (Frunze: Ilim 1983).
3. Butenko R.G., *Culture of isolated tissues and physiology of plants morphogenesis*, 272 p. (M.: Nauka., 1964).
4. Mitrofanova I.V., *Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnology of obtaining and conservation perennial horticultural plants*, 344 p. (K.: Agrarna nauka, 2011).
5. Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 3, 473 (1962).
6. Monnier M., Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastories* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale, *Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie*, 179 (1973).
7. Lakin G.F., *Biometrics: a textbook for universities biological specialties*, 352 p. (M, Vysshaya shkola, 1990).
8. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V. The morphogenetic potential realization ways of different explants Of *Canna* garden *in vitro* (*Canna* × *hybrida hort.*), *Abstract of VI International Scientific Conference "Floriculture: tradition and modernity"* (Belgrade, NIU "BSU", Volgograd, 2013), p. 414.
9. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V., The introduction in culture *in vitro* of izolated emryos and seeds of *Canna* garden (*Canna* × *hybrida hort.*), Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., *Abstracts of International scientific and practical conference "Cell Biology and Biotechnology"* (Izd. BSU Center, Minsk, 2013), p. 198.

Поступила в редакцию 05.05.2014 г.