

На правах рукописи

ТЕВФИК АРЗЫ ШЕВКИЕВНА

**ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ ПОЧЕК И ЗАРОДЫШЕЙ КАННЫ
САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT. EX BACKER*)**

**Специальности: 03.02.01 – ботаника
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Ялта – 2016

Работа выполнена в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений Государственного бюджетного учреждения республики Крым «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр»

- Научный руководитель:** доктор биологических наук, старший научный сотрудник, **Митрофанова Ирина Вячеславовна**, ГБУ РК «НБС-ННЦ», заведующая отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности
- Официальные оппоненты:** **Новикова Татьяна Ивановна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение науки «Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН» заведующая лабораторией биотехнологии
- Молканова Ольга Ивановна**, кандидат сельскохозяйственных наук, Федеральное государственное учреждение науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН» заведующая лабораторией биотехнологии растений
- Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита диссертации состоится «___» июня 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 900.004.01 при ГБУ РК «НБС – ННЦ» по адресу: 298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, Никитский спуск, 52

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБУ РК «НБС – ННЦ» по адресу: 298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, Никитский спуск, 52 и на сайте <http://www.nbgnsr.com>

Автореферат разослан «___» мая 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета к.б.н.

Садогурская Светлана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из важнейших проблем современности является сохранение и увеличение биоразнообразия, в том числе фиторазнообразия, для чего используются различные направления биологической науки: ботаника, генетика, селекция, интродукция, биотехнология и т.д. Приоритетное направление при этом приобретает биотехнология благодаря ряду существенных преимуществ: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чистые, исследования проводятся круглый год, культивируемые растения занимают при этом незначительные площади. Среди биотехнологий использование метода культуры клеток, органов и тканей растений имеет как фундаментальное так и прикладное значение, и в последние годы активно применяется в разных областях хозяйственной деятельности человека для получения веществ вторичного синтеза, ускоренного размножения культур, трудноразмножаемых традиционными методами, оздоровления растительного посадочного материала, использования в генетико-селекционной работе и создания генобанков *in vitro* (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1992; Кунах, 2005; Митрофанова, 2011; Игнатова, 2011; Lombardi, 2001; Basal, 2007; Cruzz-Cruzz et al., 2013; Protocols ..., 2014).

Канна садовая (*Canna × hybrida hort. ex Backer*) – одна из красиво и длительно цветущих, декоративно-лиственных культур. При оформлении садов и парков канны создают крупные красочные массивы благодаря ярким цветкам и соцветиям разнообразных форм и окрасок, сизо-зеленым или фиолетово-красным, бананоподобным листьям, напоминающим растения флоры тропической зоны (Дашкеев, 1975; Шолохова, 2006).

Ценность генофонда Никитского ботанического сада определяется не только количеством сортообразцов, но и гибридным материалом, созданным сотрудниками Сада (Феофилова, 1972, 1997; Шолохова, 2001). Сорта канны садовой получены в результате межвидовых и межсортовых скрещиваний, однако часть гибридов не дает полноценных семян. Канна хорошо переносит пониженную влажность воздуха, и практически не повреждается вредителями (Феофилова, 1973, 1977, 1997; Дашкеев, 1975; Садыхов, 1985; Шолохова, 2006), при этом у растений отмечены значительные поражения листьев и соцветий грибной, бактериальной и вирусной инфекцией (Митрофанова, 2012; Lockhart, 1990; Reichel et al., 1996; Soares, 2005; Monger et al., 2007, 2010; Marino et al., 2008).

Степень разработанности темы. На протяжении последних двадцати лет зарубежные учёные занимались разработкой и совершенствованием отдельных этапов клонального микроразмножения *Canna indica* L. и *Canna edulis* Ker. Наиболее весомый вклад в изучение данного вопроса внесли биотехнологи Польши (Kromer, 1979; Kromer, Kukulczanka, 1985) и Китая (Hosoki, Sasaki, 1991; Wang, 2008). Тем не менее для *C. hybrida* в основном исследованы вопросы традиционной селекции и размножения (Феофилова, 1987; Khoshoo, Mukherjee, 1970), и различные аспекты репродуктивной биологии (Никифоров, 1982; Кузьмина, 2013; 2014). Однако для *C. hybrida* не были изучены вопросы морфогенеза *in vitro*, что может быть основой для разработки биотехнологических приемов клонального микроразмножения, позволяющих получать

высококачественный материал в более сжатые сроки, а также ускорять селекционный процесс и поддерживать коллекции *in vitro* и *in situ*.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – выявить пути морфогенеза, особенности регенерации различных эксплантов в культуре *in vitro* и разработать биотехнологические приёмы микроразмножения и сохранения перспективных сортов канны садовой.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить такие задачи:

- подобрать оптимальные типы эксплантов, режим стерилизации и получить асептическую культуру первичных эксплантов канны садовой;
- изучить особенности роста и развития различных эксплантов канны садовой в культуре *in vitro*;
- изучить влияние биотических и абиотических факторов на разных этапах морфогенеза *in vitro* канны садовой;
- определить возможности и пути дифференциации в условиях *in vitro* различных органов и тканей канны садовой;
- подобрать условия адаптации *in vivo* регенерантов канны садовой;
- провести сравнительный анализ морфологических и физиологических особенностей регенерантов *in vitro* и *in vivo* канны садовой;
- изучить особенности депонирования эксплантов канны садовой для создания медленнорастущей коллекции *in vitro*;
- разработать схемы микроразмножения растений 3 сортов канны садовой.

Научная новизна полученных результатов. Впервые для 4 перспективных сортов канны отечественной и зарубежной селекции определены морфогенетические потенции органов и тканей *in vitro* и показаны возможные пути морфогенеза *in vitro*: формирование меристематических, адвентивных почек и развития проростков из зиготических зародышей. Установлено влияние физических и гормональных факторов на отдельные этапы регенерации растений из вегетативных почек и зиготических зародышей. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста (БАП, ТДЗ, НУК, ИУК), индуцирующие процесс прямого и непрямого органогенеза *in vitro*. В результате сравнительного изучения показаны структурные и функциональные изменения растений канны садовой *in vitro* и *in vivo*. Выявлен сорт канны садовой (Ливадия), который обладает лабильным водным режимом и наибольшей адаптационной способностью к изменяющимся условиям культивирования. Определены оптимальный тип и концентрации ретардантов для депонирования двух сортов канны садовой.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показаны пути реализации морфогенеза различных эксплантов в условиях *in vitro*. Подобранные составы питательных сред для получения и размножения растений канны *in vitro*. Использование метода эмбриокультуры позволило получить жизнеспособные проростки канны садовой сортов Дар Востока и Ливадия, что является основой создания новых селекционных форм. Показана возможность адаптации регенерантов канны садовой. Разработана и представлена биотехнологическая схема клонального микроразмножения канны садовой. Заложены в генобанк *in*

vitro 3 сорта канны садовой. Результаты проведенных исследований используются при чтении курса биотехнологии растений в Крымском аграрном университете.

Методология и методы исследования. Применены методы культуры органов и тканей растений, эмбриокультура, методы световой и поляризационной микроскопии, методы морфо-анатомического и физиологического анализа растительного материала, методы депонирования. Достоверность результатов исследования получена с использованием метода статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности получения растений канны садовой (*Canna × hybrida hort. ex Backer*) в культуре зародышей и вегетативных почек.
2. Пути морфогенеза канны садовой в условиях *in vitro*.
3. Морфологическая и физиологическая характеристика регенерантов канны при культивировании *in vitro* и *in vivo*.
4. Депонирование *in vitro* эксплантов канны садовой для создания банка генетической плазмы.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях: научно-практическом семинаре молодых ученых и студентов Крыма «Биологические науки: современное состояние, проблемы и перспективы исследований в Крыму» (Ялта, 2012); международной научной конференции «Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство» (Ялта, 2012); международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры» (Минск, 2012); международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 2013); научно-практическом семинаре молодых ученых и студентов Крыма «Биологические науки: современное состояние, проблемы и перспективы исследований в Крыму» (Ялта, 2013); VI Международной научной конференции «Цветоводство: традиции и современность» (Волгоград, 2013); II Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2013), международной научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 2014), the VI International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an instrument for plant biodiversity conservation physiological, biochemical, genetic and legal aspects» (Yalta, 2014), VIII Съезде ОФР России и Всероссийской научной конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), 6th International ISHS Symposium «Production and Establishment of Micropropagated plants» (Sanremo. Italy, 2015).

Личный вклад автора. Разработка схем и постановка экспериментов, анализ литературных источников, сбор и интерпретация основных результатов исследований (включая статистическую обработку данных), представленных в диссертационной работе, выполнены и получены лично автором на базе лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада за период 2010-2014 гг. Гистологический анализ был проведен совместно с

кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений Кузьминой Татьяной Николаевной. Морфо-анатомические и физиологические исследования регенерантов канны садовой выполнены совместно с младшим научным сотрудником лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений Браилко Валентиной Анатольевной.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 177 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 разделов, выводов, практических рекомендаций, приложения, списка использованной литературы (350 наименований, в том числе – 255 иностранных авторов) и включает 29 таблиц и 48 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Митрофановой Ирине Вячеславовне за оказанную помощь и руководство в процессе выполнения и написания диссертации. Выражаю признательность научному сотруднику лаборатории цветоводства Зубковой Наталье Васильевне за любезно предоставленные исходные растения канны садовой, а также выражаю свою благодарность всем сотрудникам лаборатории биотехнологии и вирусологии за неоценимую помощь при выполнении и обсуждении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

В обзоре литературы на примере некоторых декоративных культур порядка Zingiberales рассмотрены особенности микроразмножения растений в условиях *in vitro*. Значительное внимание уделено влиянию трофических, гормональных и физических факторов культивирования на прохождение отдельных этапов морфогенеза растений *in vitro* (Paiva et al., 2004; Gubbuka et al., 2006; Mohanty et al., 2011; и др.). Отражено современное состояние исследований, касающихся депонирования видов и сортов ценных многолетних культур. Показана недостаточная изученность некоторых вопросов и обоснована необходимость проведения данных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали перспективные сорта канны садовой из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ): группы Крози – 2 сорта селекции НБС-ННЦ (Дар Востока, Ливадия), 1 сорт зарубежной селекции (Президент) и группы орхидеевидных: 1 сорт зарубежной селекции (Суевия).

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ, ГБУ РК «НБС-ННЦ». В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые (Калинин и др., 1992; Батыгина, Васильева, 2002; Бутенко, 1999) и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС (Митрофанова и др., 1997; 2014). В качестве

первичных эксплантов были взяты вегетативные почки, высечки листа, изолированные зародыши, сегменты бутонов и завязи, зрелые и недозрелые семена.

Для получения асептической культуры использовали две схемы ступенчатой стерилизации с применением таких антисептиков как этанол (Септол, Украина), коммерческий препарат Domestos (Великобритания), коммерческий препарат ДезТаб, содержащий активный хлор (КНР), Thimerosal (Merk, Германия) с разной экспозицией.

Вегетативные почки помещали на модифицированную питательную среду МС (Murashige, Skoog, 1962), Пирика (Pierik, 1976) и WPM (Lloyd, McCown, 1980) с 30 г/л сахарозы, 1,0 % агар-агара (агар-агар «D19, Hispanagar S.A.», Испания). Для инициации развития эксплантов в среду добавляли БАП и ГК₃ (Sigma, США). Хемотерапию проводили с помощью виразола (рибовирин, Sigma, США) в концентрации 3-5 мг/л и амиксина (Одесса) в концентрации 2-4 мг/л. На этапах индукции адвентивного побегообразования и собственно микроразмножения использовали вещества цитокининового (БАП, ТДЗ) и ауксинового (ИУК) типов действия. Экспланты помещали в культуральную комнату с температурой 24±1 °С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк.

Коробочки канны садовой, обрабатывали 96% этанолом, обжигали в пламени спиртовки, после чего извлекали семена. Зародыши вводили на агаризованную питательную среду Монье (Monnier, 1973) без регуляторов роста. Зародыши стратифицировали в условиях низкой положительной температуры 5±1 °С без освещения. Проростки и растения культивировали при стандартных условиях выращивания *in vitro*.

Для проведения гистологических исследований в качестве фиксатора использовали смесь Карнуа. После фиксации объекты хранили в 70% этаноле. Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике (Паушева, 1970). Парафиновые срезы (12-15 мкм) делали на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим (Жинкина и др., 2000). Анализировали материал с помощью микроскопов “Jenaval” (Carl Zeiss, Германия) и AxioScopeA.1 (Zeiss, Германия) методом светлого поля. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s и цифровой фотокамеры Olympus SP-350 с применением программы AxioVisionRel. 4.8.2.

Для адаптации регенерантов к условиям *in vivo* их высаживали в перлит, смесь перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1), и смесь перлита и верхового торфа (1:1), и помещали на стеллаж ускоренного вегетативного размножения (СУВР).

Для оценки адаптационной способности и выявления путей адаптации проводили анализ анатомической структуры, содержания воды и фотосинтетической активности в условиях *in vitro* и *in vivo*. Для этого отбирали регенеранты и меристемойды канны садовой сортов Суевия и Ливадия. Анатомические микропрепараты для анализа структуры листовых пластин (временные водные и глицериновые) изготавливали по общепринятой методике (Лотова, 2001).

В качестве физиологических критериев, характеризующих отношение к недостаточному водообеспечению и высоким температурам, были взяты общая оводненность листьев, определяемая методом термической сушки при 105°C (Генкель, 1968), фракционный состав воды по методу Маринчика-Гусева (Лищук, 1991). Параметры фотосинтетической активности (ФА) измеряли при помощи портативного флуориметра «Флоротест» (Институт кибернетики им. В.М. Глушкова НАН Украины). Рассчитывали переменную флуоресценцию, индекс жизнеспособности и фотосинтетическую активность (Байрон и др., 2000; Лысенко и др., 2013; Stirbet A., Govindjee 2011).

Депонирование меристемоидов и адвентивных почек осуществляли на модифицированной питательной среде ½ МС с 60 г/л сахарозы, 0,2-0,4 г/л ССС (BASF, Германия). Экспланты с пробирками переносили в холодильные камеры с регулируемой температурой 5±1°C, интенсивностью освещения 0,5 клк и 12 часовым фотопериодом (Митрофанова и др., 2010).

Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа (Лакин, 1990) с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003.

ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ИНДУКЦИЮ РАЗВИТИЯ ЭКСПЛАНТОВ *CANNA* × *HYBRIDA HORT*. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Разработка протокола получения асептической культуры вегетативных почек и семян. Стерилизация является одним из самых сложных этапов при разработке биотехнологических приёмов размножения растений. Проведение ступенчатой стерилизации показало, что среди испытанных антисептиков раствор препарата ДезТаб позволил снизить количество инфицированных эксплантов (вегетативных почек) у сортов Президент и Дар Востока до 20 и 33,4% соответственно. При этом частота контаминации данных сортов при стерилизации 3% гипохлоритом натрия составила 50 и 61,9% соответственно. Для сортов Ливадия и Суевия использование схем стерилизации с гипохлоритом натрия снижало частоту контаминации до 20 и 28,6% соответственно.

В результате исследований по получению асептической культуры зародышей канн садовой было отмечено, что использование способа стерилизации коробочек канн садовой обжигом у сортов Ливадия и Суевия позволяет получать экспланты, свободные от контаминации. Низкая частота контаминации 5 и 14% отмечена у сортов канн Дар Востока и Президент.

Выявление оптимальных сроков отбора эксплантов и особенности их введения в условия *in vitro*. В процессе изучения влияния различных сроков введения в условия *in vitro* на жизнеспособность эксплантов канн было установлено, что среди изучаемых сортов в период с августа по ноябрь высоким показателем отличался сорт Суевия. Так, в зависимости от сроков отбора количество жизнеспособных эксплантов у данного сорта варьировало от 50 до 100%. Наряду с этим, у сорта Дар Востока 67% жизнеспособных эксплантов были получены в сентябре и ноябре. Вместе с тем было показано, что октябрь является неблагоприятным сроком отбора и введения в условия *in vitro* для эксплантов всех изучаемых сортов канн.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ КАННЫ САДОВОЙ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Влияние регуляторов роста на процесс регенерации микропобегов из вегетативных почек на этапах индукции их развития и собственно микроразмножения. Одним из важных факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro* является состав питательной среды (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Митрофанова, 2011; Basal, 2007). Добавление регуляторов роста цитокининного и ауксинного типов действия в питательные среды зависит от поставленных задач исследований и этапов клонального микроразмножения (Митрофанова, 1997; Сельскохозяйственная биотехнология, 1998; Kyte, 1987; George et al., 2008).

Как показали наши исследования, появление адвентивных побегов у отдельных эксплантов 'Суевия' на питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ отмечали на 65 сут культивирования. Спустя 6 месяцев в условиях *in vitro* количество образовавшихся адвентивных побегов составило 1,6 шт. на эксплант. Однако при последующем культивировании этот показатель оставался неизменным.

Для индукции адвентивного побегообразования были использованы следующие вещества цитокининного типа действия – БАП и ТДЗ. У сортов канны садовой Дар Востока и Суевия на среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ на 12-е сутки культивирования отмечали появление микропобегов (рис. 1А, В). На 60 и 90

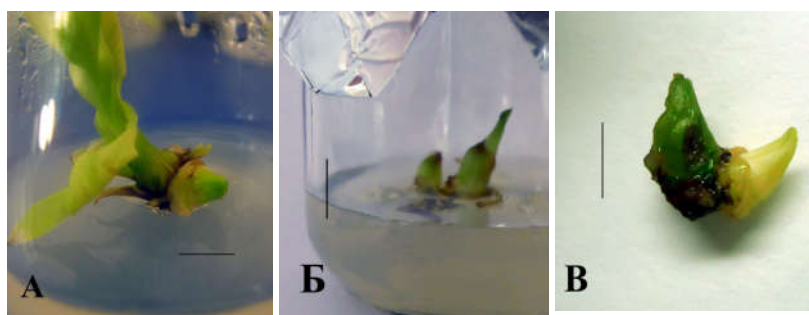


Рис. 1. Адвентивное побегообразование канны садовой на 21 сут культивирования: А) у 'Суевия' на питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ; Б) у 'Ливадия' на среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ; В) у 'Дар Востока' на среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ (масштаб 1 см)

сут культивирования у сорта Суевия образовалось в среднем $2,75 \pm 0,29$ и $4,25 \pm 0,29$ дополнительных побегов/эксплант соответственно (табл. 1). Вместе с тем, у сорта Дар Востока коэффициент размножения снижался в 1,5 раза. При длительном культивировании (150 сут) канны садовой сорта Суевия

отмечали образование до 7 адвентивных побегов на эксплант.

Вместе с тем, при добавлении в питательную среду МС 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК длина адвентивного микропобега на 18-е сут культивирования у сорта Суевия достигала 3 см. Однако при дальнейшем культивировании на данной среде наблюдали меньше сформировавшихся адвентивных микропобегов на эксплант, чем при использовании 1,27 мг/л ТДЗ. Как видно из данных таблицы 1, помещение микропобегов сорта Дар Востока на питательную среду МС, содержащую 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК при культивировании не индуцировало образования дополнительных побегов.

Таблица 1

**Влияние регуляторов роста на образование адвентивных побегов
канн садовой (шт.)**

Сорт	Регуляторы роста, мг/л	Продолжительность культивирования, сут		
		30 (контроль)	60	90
Суевия	1,27 ТДЗ	1,25±0,29	2,75±0,29	4,25±0,29*
	1,5 БАП+1,5 ИУК	0,75±0,29	2,00±0,47	2,00±0,47
Дар Востока	1,27 ТДЗ	0,75±0,29	1,75±0,29	2,75±0,29
	1,5 БАП+1,5 ИУК	0	0	0

Примечание: * – установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

В процессе исследований было отмечено, что при культивировании эксплантов у сорта Ливадия на питательной среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ развивались адвентивные микропобеги (рис. 1, Б). Наряду с этим продолжительное культивирование эксплантов канн сорта Суевия на среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ способствовало образованию меристемоидов в основании микропобегов. Количество меристемоидов и их окраска зависела от продолжительности культивирования. Так, на 120 сут культивирования сформировались меристемоиды зеленой окраски (5,67 шт./эксплант). При дальнейшем культивировании часть меристемоидов имели белую окраску (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние продолжительности культивирования эксплантов на
питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ на образование меристемоидов
канн садовой сорта Суевия**

Продолжительность культивирования, сут	Количество меристемоидов, шт./эксплант	Количество меристемоидов зеленой окраски, %	Количество меристемоидов бежевой окраски, %
120(контроль)	5,67±0,41	100	0
150	8,50±0,33*	76,5	23,5
165	13,50±0,33*	43,5	56,5
180	20,25±0,55*	33,3	66,7

Увеличение концентрации ТДЗ до 1,91 мг/л способствовало образованию каллуса ярко-зеленой окраски у сорта Суевия. Однако длительное культивирование приводило к потемнению некоторых участков каллуса.

В основании микропобегов сорта Дар Востока на питательных средах, содержащих ТДЗ, через 50 сут отмечали активное формирование меристемоидов. Так, отделение образовавшихся адвентивных микропобегов и их дальнейшее культивирование на среде с 1,27 мг/л и 1,91 мг/л ТДЗ на 90 сут способствовало появлению 4 меристемоидов на эксплант. Наряду с этим, последующее снижение концентрации ТДЗ в питательной повышало частоту образования меристемоидов (15 шт. на эксплант). Сформировавшиеся меристемоиды были крупнее и более выраженными по сравнению с полученными на среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ (12 шт.).

У сорта Ливадия на среде МС с 2,55 мг/л ТДЗ, на 10-е сутки культивирования наблюдали появление адвентивных микропобегов. В дальнейшем такие экспланты постепенно темнели и отмирали. Вместе с тем, отделяя адвентивный побег от основного микропобега и последующее его культивирование, индуцировало формирование меристемоидов и образование новых адвентивных почек. Через 90 сут культивирования на этой же питательной среде коэффициент размножения составил $6,5 \pm 0,75$ (табл. 3). Продолжительное культивирование эксплантов сорта Ливадия на питательной среде с 1,91 мг/л ТДЗ индуцировало образование меристемоидов. Так, на 120 сут культивирования было получено 11,0 меристемоидов/эксплант, через 6-7 месяцев – 40 шт. размером от 0,1 до 0,7 см.

Таблица 3

Формирование меристемоидов канны садовой сорта Ливадия в зависимости от концентрации ТДЗ в питательной среде МС и продолжительности культивирования

Продолжительность культивирования, сутки	1,91 мг/л ТДЗ (контроль)		2,55 мг/л ТДЗ	
	Количество меристемоидов на эксплант, шт.	Средняя длина меристемоидов, см	Количество меристемоидов на эксплант, шт.	Средняя длина меристемоидов, см
30	$2,00 \pm 0,47$	$0,90 \pm 0,19$	$1,75 \pm 0,29$	$0,53 \pm 0,13$
60	$2,25 \pm 0,29$	$0,63 \pm 0,03$	$4,00 \pm 0,71^*$	$0,49 \pm 0,08$
90	$3,75 \pm 0,29$	$0,55 \pm 0,07$	$6,50 \pm 0,75^*$	$0,50 \pm 0,05$
120	$11,00 \pm 0,47$	$0,45 \pm 0,08$	—	—

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

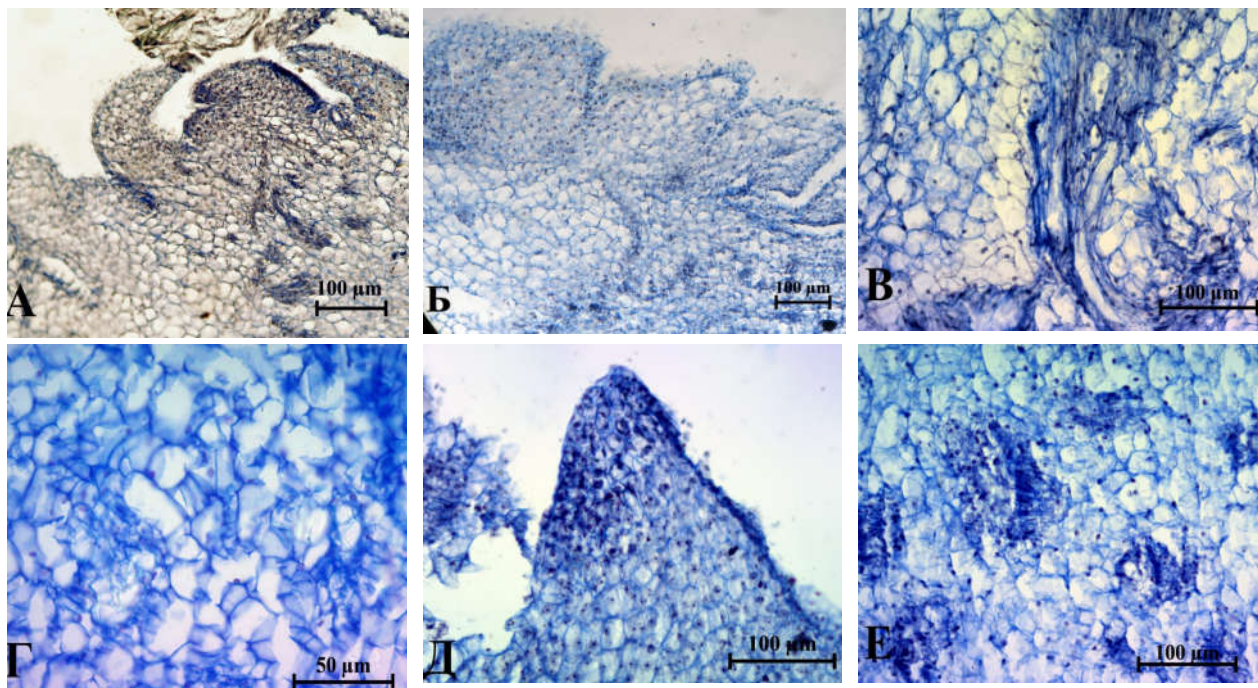


Рис. 2. Гистологические исследования органогенеза *in vitro* канны садовой: А) образование множественных меристемоидов 'Ливадия'; Б) раскрытие примордиальных листьев меристемы побега 'Ливадия'; В) гистогенез у 'Ливадия'; Г) неморфогенный каллус 'Суевия'; Д) образование меристемоида 'Суевия'; Е) гистогенез у 'Суевия'

Таким образом, нам действительно удалось индуцировать образование меристемоидов у сорта Ливадия, в результате чего можно наблюдать скопление меристематических очагов в основании микропобега. Отмечено развитие этих структур в виде меристемы побега и примордиальных листьев (рис. 2, А), и дальнейшее формирование из них множественных адвентивных почек (рис. 2, Б). Наряду с этим образуются трахеоподобные структуры и отмечено скопление паренхимных клеток (рис. 2, В). У сорта Суевия нами выявлены отдельные зоны, обладающие меристематической активностью и формирующие меристемоиды (рис. 2, Д). У сортов Суевия и Ливадия наблюдали также другой тип дифференциации тканей – гистогенез (рис. 2, Е). Клетки неморфогенного каллуса, образующегося в основании микропобегов ‘Суевия’ (рис. 2, Г), не были способны к дедифференциации. Среди каллусных клеток, формировались клетки паренхимного типа – крупные, вакуолизованные, с пристенным слоем цитоплазмы. Ядра в таких клетках отсутствовали. Кроме того, в таком каллусе не наблюдали сосудистые пучки и плазмодесмы.

Для индукции регенерации меристемоидов их помещали на ряд питательных сред: МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃; WPM с 0,75 мг/л БАП. Выявлено, что частота формирования вегетативных почек из меристемоидов канны увеличивалась с количеством субкультивирований. При переносе на свежеприготовленную питательную среду через 7 сут происходил процесс адвентивного побегообразования (рис. 3). Следует

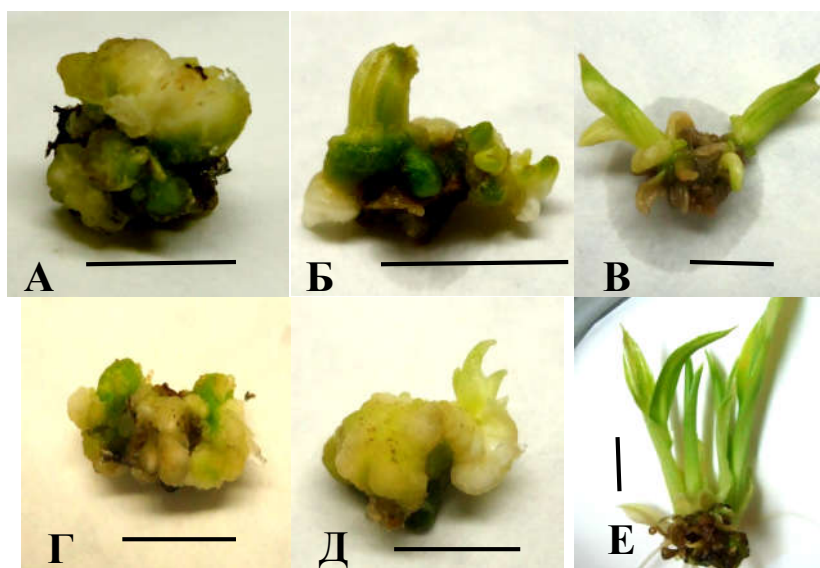


Рис. 3. Регенерация *in vitro* канны: А) меристемоиды ‘Ливадия’; Б) вегетативные почки из меристемоидов ‘Ливадия’; В) адвентивное побегообразование у сорта Ливадия; Г) меристемоиды ‘Суевия’; Д) вегетативные почки из меристемоидов ‘Суевия’; Е) адвентивное побегообразование у сорта Суевия (масштаб 1 см)

отметить, что при использовании в качестве первичных эксплантов вегетативных почек интактного растения количество образовавшихся адвентивных микропобегов не превышало 2 шт./эксплант. Исследования показали, что в основании микропобегов из меристемоидов сорта Ливадия и Суевия на 40 сут культивирования образовалось до 4,0 и 4,8 адвентивных микропобегов на эксплант соответственно. Вместе с тем, сразу после этапа введения вегетативных почек в условия *in*

vitro максимальное количество образовавшихся дополнительных побегов на эксплант достигало 2 шт. Используя, полученные нами, меристемоиды удалось значительно повысить коэффициент размножения сорта Ливадия, который составил в среднем на 40 сут культивирования от 3,2 до 4,8 шт./эксплант (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние генотипа и состава питательной среды на количество
образовавшихся микропобегов на эксплант, шт.**

Генотип	Питательная среда	Продолжительность культивирования,			
		10 сут	20 сут	30 сут	40 сут
Суевия	МС с 4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК ₃	1,4±0,27	2,2±0,22	2,6±0,27	4,8±0,22
	МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК	0,8±0,22	1,6±0,27	2,2±0,22	4,4±0,27
Ливадия	WPM с 0,75 мг/л БАП	0,6±0,27	1,2±0,22	1,8±0,22	4,0±0,35
	МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК	—	0,8±0,22	1,4±0,27	3,2±0,22

Индукция прорастания зрелых семян *in vivo*, незрелых и зрелых семян, изолированных зародышей в асептических условиях культивирования. В процессе изучения всхожести семян *in vivo* было выявлено, что семена канны садовой сорта Ливадия (от свободного опыления) не проросли как при применении предпосевной обработки семян (скарификации и стратификации), так и без нее. При высевании в перлит проросло 46,2% семян канны 'Дар Востока' (от свободного опыления), которые предварительно подвергали скарификации скальпелем. Культивирование незрелых и зрелых семян *in vitro* позволило сохранить жизнеспособность эксплантов до 30-60 сут. В дальнейшем наблюдали постепенное отмирание эксплантов, что возможно связано с склерифицированной семенной кожурой, препятствующей прорастанию зиготического зародыша.

Большинство сортов канны садовой формируют недоразвитые зародыши, при этом эмбриокультура позволяет получить полноценные растения. Среди используемых нами сортов только 'Дар Востока' и 'Ливадия' формировали семена. У изолированных из семени зародышей сорта Дар Востока на 8-е сут культивирования на среде Монье при пониженной температуре и отсутствии освещения наблюдали разрастание тканей. На 14-е сут культивирования размеры зародыша увеличились (табл. 5). Последующее культивирование экспланта способствовало менее интенсивному разрастанию тканей зародыша.

Таблица 5

Разрастание тканей изолированных зародышей сорта Дар Востока в зависимости от продолжительности культивирования в условиях стратификации

Характеристика зародыша	Исходный размер	Размер, см		
		на 14-е сут	на 25-е сут	на 35-е сут
Длина, см	0,58±0,08	1,08±0,03*	1,24±0,05	1,08±0,03
Ширина, см	0,22±0,04	0,58±0,08*	0,66±0,04	0,58±0,08

Примечание: * – установлено достоверное различие с уровнем значимости $P < 0,095$

В процессе исследования на поверхности зародыша формировался каллус двух типов: плотный и рыхлый (рис. 4, А). Наряду с этим, у некоторых изолированных зародышей на 21-е сут культивирования развивались корни (1-4 шт./эксплант). Частота ризогенеза достигала 25%. На 50 сут длина корней составила $0,73 \pm 0,06$ см (рис. 4, Б).

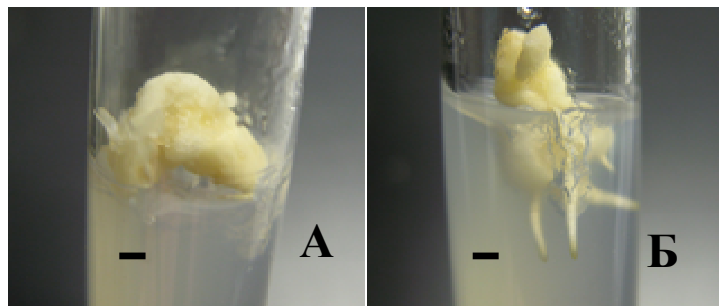


Рис. 4. Зародыши канн садовой сорта Дар Востока (от свободного опыления) на 30 сут: А) формирование плотного и рыхлого каллуса на поверхности экспланта; Б) образование корней у зародыша (масштаб 1мм)

Результаты гистологических исследований зародышей сорта Дар Востока показали, что на 30-е сут культивирования в условиях стратификации происходит закладка 3 корней (рис. 5, А). На 60-е сут культивирования происходит раскрытие первого настоящего листа (рис. 5, Б). Наряду с нормальным развитием зародыша в условиях *in vitro* в тканях семядоли недоразвитого

зиготического зародыша отмечали формирование соматического эмбриоида (Тевфик и др., 2014). Массового образования соматических зародышей нами не было отмечено. Вместе с тем ткани семядоли зародышей сортов Дар Востока и Ливадия содержали большое количество крахмальных зерен.

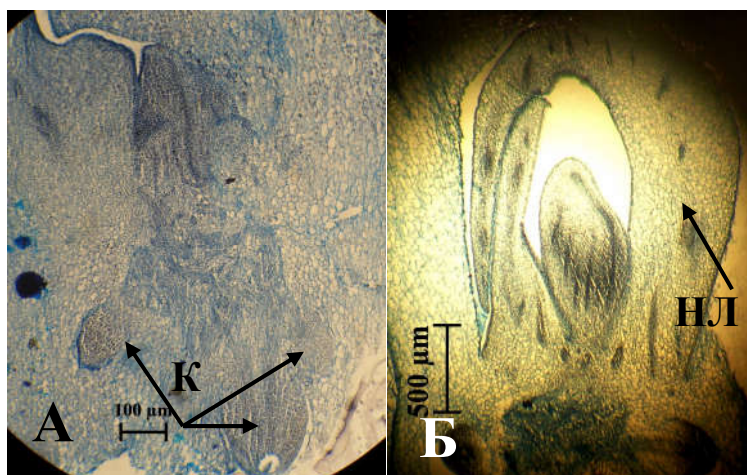


Рис. 5. Гистологические исследования развития изолированного зародыша сорта Дар Востока (от свободного опыления) в условиях стратификации: А) на 30 сут; Б) на 60 (К – корень, НЛ – настоящий лист)

Изолированные зародыши с образовавшимися корнями через 60 сут культивирования при 5° С, в темноте переносили в стандартные условия (температура 24±1°С, 16-часовой фотопериод и интенсивность освещения 2-3 клк). При освещении на 2 сут экспланты изменили свою окраску с белой на зеленую. Вместе с тем, на 6-8 сутки в культуральной комнате у зародышей канн сорта Дар Востока наблюдали выдвижение первого листа (рис. 6).

В ходе экспериментов было выявлено, что изолированные зародыши сорта Ливадия (от свободного опыления) обладали низкой частотой прорастания (50%) по сравнению с сортом Дар Востока (100%).

На 30-36 сут культивирования в стандартных условиях у зародыша 'Ливадия' происходило формирование глобулярных структур. При последующем культивировании отметили увеличение их количества и размеров. Однако, при более длительном культивировании наблюдали потемнение и постепенное отмирание глобулярных структур (Тевфик, Митрофанова, 2014).

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

Таблица 6

Морфологические признаки изолированных зародышей сорта Дар Востока (от свободного опыления) при культивировании *in vitro*

Морфологические признаки	В условиях стратификации (60 сут)	В стандартных условиях	
		10-е сут (контроль)	35-е сут
Среднее количество корней, шт.	2,57±0,52	8,20±1,78	11,33±0,41
Средняя длина корней, см	0,45±0,09	2,04±0,23	3,80±0,14*
Среднее количество листьев, шт.	—	1,20±0,22	2,50±0,33*
Средняя длина листьев, см	—	2,50±0,61	8,75±0,37*

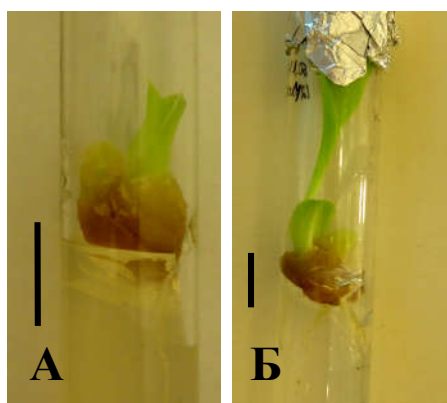


Рис. 6. Появление первого листа у зародышей канн 'Дар Востока' при культивировании в стандартных условиях: А) на 6-8 сут; Б) на 15-е сут (масштаб 1 см)

Выявление морфогенетического потенциала высечек листа, бутонов и завязей канн садовой. Установлено, что высечки листа, сегменты завязи и бутона имели низкую способность к морфогенезу *in vitro* и теряли свою жизнеспособность в течение 60 сут культивирования.

УКОРЕНЕНИЕ МИКРОПОБЕГОВ *IN VITRO* И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ КАННЫ САДОВОЙ К УСЛОВИЯМ *IN VIVO*

Завершающим этапом клонального микроразмножения является укоренение, полученных *in vitro* микропобегов. Как показали наши исследования некоторые экспланты канн садовой сорта Суевия способны к спонтанному корнеобразованию. Так, на 37-е сут культивирования микропобегов данного сорта на питательной среде, содержащей 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃, отмечали формирование спонтаннообразующихся корней. Вместе с тем было выявлено, что на 94-е сут культивирования средняя длина таких корней у регенерантов в асептических условиях составила 1,17 см (рис. 7). На 145 сутки культивирования в условиях *in vitro* их длина достигла 3,7 см (рис. 8).

В ходе экспериментов было выявлено, что на среде, используемой нами для адвентивного побегообразования, происходит процесс ризогенеза и поэтому в последующем появилась возможность исключить специальный этап укоренения микропобегов, объединив этап собственно регенерации с этапом корнеобразования. Так, у сортов канн Суевия и Дар Востока на 15-е сут культивирования на модифицированных питательных средах МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК и Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК отмечали корнеобразование. На 60-90 сут культивирования были получены регенеранты, пригодные к высадке на адаптацию *in vivo*.

Одним из наиболее сложных этапов клонального микроразмножения является последующая адаптация регенерантов к условиям *in vivo*. Показано,

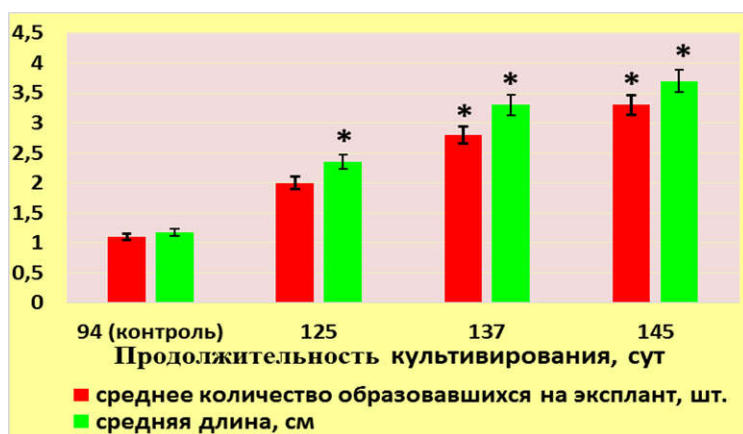


Рис. 7. Изменение количества и длины спонтанно-бразующихся корней эксплантов сорта Суевия при культивировании *in vitro*; * – установлены достоверные различия по сравнению с контролем при уровне значимости $P \leq 0,05$

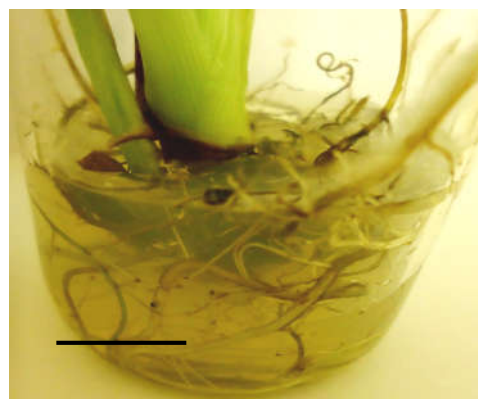


Рис. 8. Спонтанное корнеобразование канн 'Суевия' на 120 сут культивирования на питательной среде МС, содержащей 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ (масштаб 1 см)

что количество успешно адаптированных *in vivo* регенератов (рис. 9) зависело от применяемого нами субстрата (табл. 8). При использовании в качестве субстрата смеси перлита и земли приживаемость высаженных растений сорта Суевия была высокая и составила 75%. Используемый состав смеси в виде торфа и перлита снижал частоту адаптации до 50%.



Рис. 9. Регенеранты канн сорта Суевия (масштаб 1 см): А) до высадки в субстрат; Б) через 1-4 месяцев культивирования *in vivo*

Таблица 8

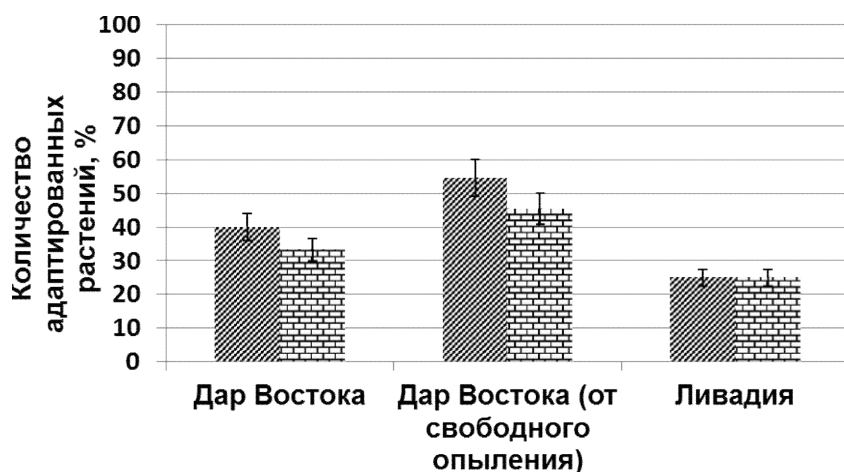
Приживаемость растений канн садовой сорта Суевия в зависимости от состава почвенной смеси на 6 месяц культивирования *in vivo*

Субстрат	К-во прижившихся регенерантов, %	Высота надземной части, см	Кол-во развернувшихся листьев/регенерант, шт.	Размеры листьев, см	
				длина	ширина
перлит	50	18±1,4	4,5±0,7	17,0±2,5	3,6±0,3
перлит: земля 1:1	75	25±5,7	5,5±0,7	23,4±1,9	4,7±0,3
перлит: торф 1:1	60	26±5,7	5,0±1,4	23,5±2,4	4,9±0,2

Вместе с тем было выявлено, что при адаптации *in vivo* проростков Дар Востока (от свободного опыления) частота адаптации составила 45,5-54,5% в зависимости от применяемого субстрата (рис. 10).

Применяемый состав смеси в виде перлита и листовой земли (40%) способствовал получению большего количества прижившихся в условиях *in vivo* растений Дар Востока по сравнению с их выращиванием на перлите (33,3%). При этом частота адаптации *in vivo* растений сорта Ливадия составила 25%.

Как показали наши исследования, на 10-15 сут в условиях *in vivo* отмечали потемнение краев листьев, что приводило в дальнейшем к отмиранию всего листа.



▨ перлит : стерильный почвенный субстрат (1:1) ▤ перлит

Рис. 10. Влияние состава субстрата на количество адаптированных растений канны

Возможно, смена условий культивирования вызывала у регенерантов стресс. Наряду с этим, было выявлено, что адаптация может быть успешной при поддержании 100% влажности воздуха на начальном этапе культивирования (2-3 недели) *in vivo*. При дальнейшем культивировании необходимо постепенное снижение влажности до 50-60%.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОДНОГО РЕЖИМА И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *CANNA×HYBRIDA HORT.* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Результаты исследования морфологических и структурных характеристик некоторых сортов *Canna×hybrida hort. ex Backer*. При проведении исследования анатомического строения листовых пластин выявлено, что для листьев указанных сортов Ливадия и Суевия на этапе культивирования *in vitro* характерна гидроморфная структура: тонкие покровные ткани, развитая аэренхима и воздухоносные каналы, узкий мезофилл. Наиболее крупные листья отмечены у регенерантов сорта Суевия (113×15 мм). Индекс формы у всех сортов низкий от 0,14 до 0,16. Устьичный аппарат парацитного типа. Листовые пластинки бифациальные, амфистоматические, дифференциация мезофилла на палисадную и губчатую ткань не выражена (рис. 11). Нами выявлено, что гомогенный мезофилл состоит из паренхимных хлорофиллоносных клеток изодиаметрической формы, расположенных в 3-4 слоя. Устьица у канны 'Суевия' мельче, чем у сорта Ливадия. Установлены достоверные различия в их распределении. Так, сорт Суевия имеет устьичных аппаратов больше на абаксиальной стороне. У сорта Ливадия – наоборот: на верхней стороне листа больше устьиц, чем на нижней. Клетки покровных тканей однородные, адаксальной эпидермы округло-продолговатые, абаксиальной – удлинено-продолговатые.

Регенеранты были пересажены в почвенную смесь, произрастали в контролируемых условиях оранжереи на протяжении 110 суток. По форме листа наблюдали различия: ланцетная форма (172×19 мм) у сорта Суевия и удлинено-яйцевидная (103×18 мм) у сорта Ливадия, индекс формы составил соответственно 0,11 и 0,17. Листовые пластинки *in vivo* по сравнению с условиями *in vitro* толще и мезофилл уже дифференцирован (рис.12; табл. 9).

Палисадная хлоренхима состоит из 1-2 слоев клеток, губчатая ткань представлена 2-3 рядами, коэффициент палисадности не высокий (0,11 и 0,13).

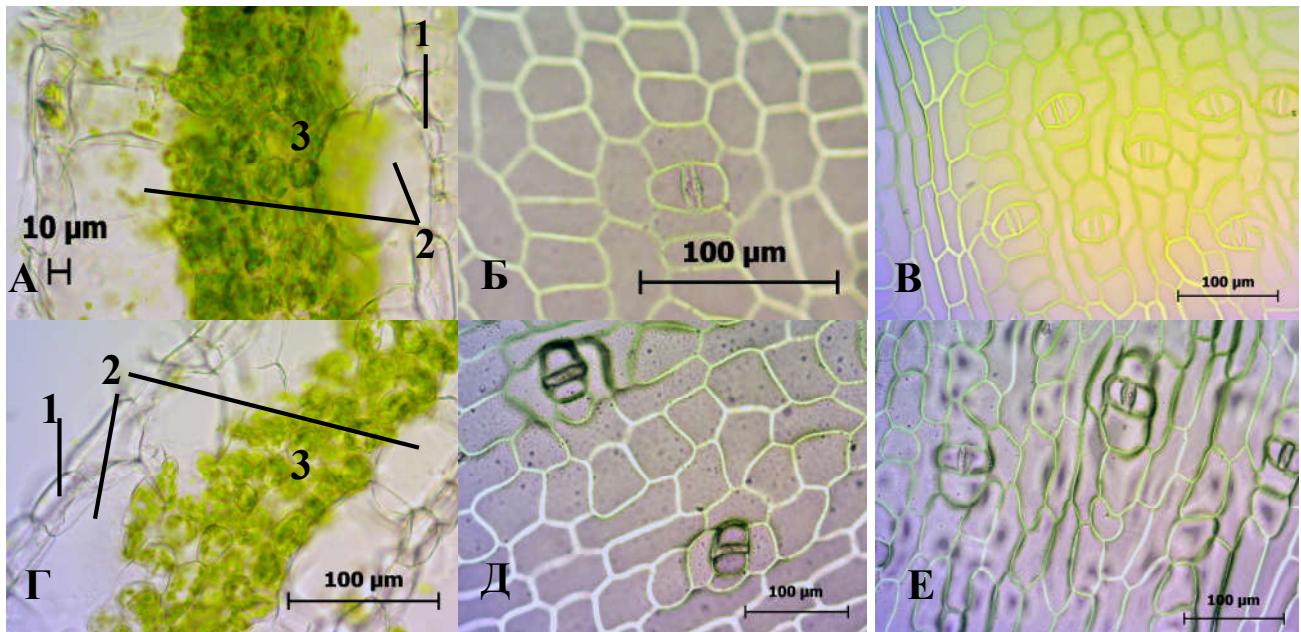


Рис. 11. Структура листа канны 'Суевия' (А, Б, В) и Ливадия (Г, Д, Е) в условиях *in vitro*: А, Г – поперечные срезы, 1 – эпидерма, 2 – аэренхима, 3 – мезофилл; Б, Д – слепки адаксиальной эпидермы; В – слепки абаксиальной эпидермы

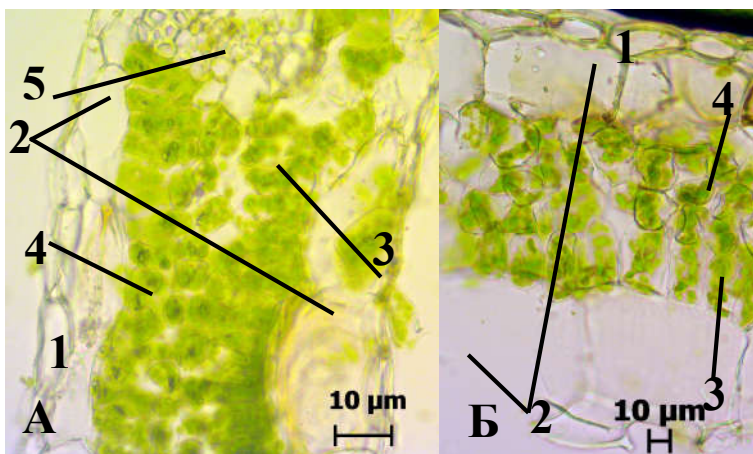


Рис. 12. Поперечные срезы листовых пластин канны садовой сортов Ливадия (А) и Суевия (Б), культивируемых *in vivo*: 1 – эпидерма, 2 – аэренхима, 3 – палисадный мезофилл, 4 – губчатый мезофилл, 5 – проводящий пучок

Адаксиальная аэренхима больше абаксиальной. Клетки эпидермы становятся мельче, особенно на абаксиальной стороне, количество устьиц на этой стороне в 4-6 раз выше, чем на адаксиальной. Такие структурные изменения способствуют снижению транспирации, поддержанию тургисцентного состояния листьев и нормализации водного режима в целом.

Анализ параметров водного режима и фотосинтетической активности канны садовой. Меристемоиды *Canna × hybrida hort.* были в значительной степени обводненными: 90,1-96,4% от сырого их веса составляла вода, из которой 66,5-83,2% составляла фракция свободной. Меристемоиды 'Суевия' содержали в 2 раза больше связанной воды, чем 'Ливадия'. При анализе индукции флуоресценции выявлено, что для тканей меристемоидов характерна низкая фотосинтетическая активность $(F_m - F_{st})/F_m = 0,29 - 0,35$ отн.ед, что свидетельствует, что на данном этапе культивирования происходят процессы формирования вегетативных органов.

**Морфологические и анатомические показатели регенерантов канны
садовой во время культивирования *in vitro***

Показатели анатомической структуры листовой пластинки в поперечном разрезе, мк (M±m)		in vitro		in vivo	
		‘Суевия’	‘Ливадия’	‘Суевия’	‘Ливадия’
Толщина листовой пластины		171,15±8,37	199,08±3,98	235,10±13,31	205,70±17,28
Толщина адаксиальной эпидермы		11,03±1,40	10,21±1,14	17,07±1,17	11,81±2,25
Толщина адаксиальной аэренхимы		30,84±2,30	33,47±1,29	59,60±4,59	44,32±3,31
Толщина палисадного мезофилла		85,89±7,03	110,80±4,35	26,10±4,84	25,74±12,69
Толщина губчатого мезофилла				80,72±5,52	74,35±12,69
Толщина абаксиальной аэренхимы		37,95±5,33	30,22±2,31	30,77±2,98	30,40±3,71
Толщина абаксиальной эпидермы		9,84±1,01	9,34±1,18	11,63±1,66	13,70±1,35
Коэффициент палисадности				0,11	0,13
Характеристика покровных тканей					
Адак- сиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина x ширина, мк)	42,52×5,67	47,75×33,64	45,35×24,05	51,60×37,86
	Длина устьичной щели, мкм (M±m)	29,70 ± 3,34	31,23 ± 1,02	27,84 ± 1,02	38,14 ± 2,43
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)	14 ± 1	48 ± 5	8 ± 1	7 ± 1
	Устьичный индекс	6	12	9	6
Абак- сиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина x ширина, мк)	82,45×17,02	49,50×20,02	52,58 × 29,49	84,20 × 28,24
	Длина устьичной щели, мкм (M±m)	25,81 ± 0,78	33,01 ± 2,26	31,52 ± 1,57	29,14 ± 0,60
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)	76 ± 2	29 ± 3	39 ± 2	26 ± 3
	Устьичный индекс	12	8	4	8

Исследования фракционного состава воды регенерантов *in vivo* показывают увеличение связанной воды к уровню 33,0 % и 46,7 %, при оводненности листьев 90,6–92,7%. С целью определения характера зависимости изменения морфометрических и структурных показателей листьев с фракционным составом воды в условиях культивирования *in vitro* и адаптации *in vivo* был проведен корреляционный анализ, который установил наличие тесной обратной корреляции между количеством устьиц на адаксиальной и абаксиальной эпидерме с долей связанной воды ($r = -0,91$ и $-0,96$). Также установлена положительная корреляция между толщиной листа и фракцией упорядоченной воды ($r = 0,80$), положительная корреляция характерна для толщины мезофилла и содержанием связанной воды ($r = 0,73$) (Tevfik et al., 2015). Рост флуоресцентного сигнала от F_0 к F_m был наиболее высоким у вариантов сорта Суевия *in vitro* – 2200 отн.ед. и сорта Ливадия *in vivo* – 2048 отн.ед. Рассчитанный показатель ФА планомерно возрастал у сорта Суевия при переносе регенерантов из условий *in vitro* в *in vivo* от 0,52 до 0,63, у сорта Ливадия показатель ФА также достигал более высокого значения – 0,69 в условиях *in vivo*. Минимальный индекс жизнеспособности отмечен у регенерантов сорта Ливадия *in vitro* (1,57), а самый высокий – у того же сорта в варианте адаптации *in vivo* (3,19). Во всех вариантах у сорта Суевия данный индекс варьировал в пределах

2 ед. (2,01 – *in vitro*, 2,67 – *in vivo*). Для тканей листа в условиях *in vitro* характерна низкая интенсивность фотосинтеза, а после переноса в *in vivo* с развитием хлоренхимы фотосинтетическая активность увеличивается.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о более высокой адаптационной способности регенерантов *Canna* × *hybrida* сорта Ливадия в условиях *ex vitro* благодаря нормальному функционированию фотосинтетического аппарата листьев и быстрому восстановлению метаболизма (Браилко и др., 2015).

ОСОБЕННОСТИ ДЕПОНИРОВАНИЯ КАННЫ САДОВОЙ

В процессе исследований было показано, что у всех изучаемых сортов канны ясно прослеживается тенденция снижения жизнеспособности при увеличении срока депонирования, а также при повышении концентрации ССС в питательной среде. Установлено, что для поддержания жизнеспособности меристемоидов в условиях генобанка *in vitro* оптимальной концентрацией ССС в среде является 0,15-0,25 г/л. В ходе опытов было выявлено, что адвентивные побеги канны исследуемых сортов имели разные показатели жизнеспособности. Так, экспланты сорта Дар Востока начинали темнеть уже через 2 месяца культивирования на среде с 0,2 и 0,4 г/л ССС. У сорта Суевия экспланты сохраняли жизнеспособность на питательной среде с 0,2 г/л ССС до 6 месяцев депонирования. Однако повышение концентрации ретарданта до 0,4 г/л снижало жизнеспособность уже после 2 месяцев депонирования.

В результате проведения исследований было выявлено, что при добавлении веществ, ингибирующих развитие эксплантов (повышенной концентрации сахарозы и ССС), в основании меристемоидов канны формировались новые меристемоиды (табл. 10). Так, депонирование меристемоидов 'Суевия' на средах с низкими концентрациями ССС (0,15-0,25 г/л) способствовало активному образованию меристемоидов (2-2,75 шт./эксплант) по сравнению с контролем (1,75 шт.). Сравнительное изучение влияния концентрации ССС на развитие эксплантов в условиях депонирования показало, что повышение концентрации ретарданта в питательной среде приводило к уменьшению образования меристемоидов сорта Ливадия. Вместе с тем, при культивировании эксплантов 'Дар Востока' образование меристематических структур отметили только на среде с 0,25 г/л ССС.

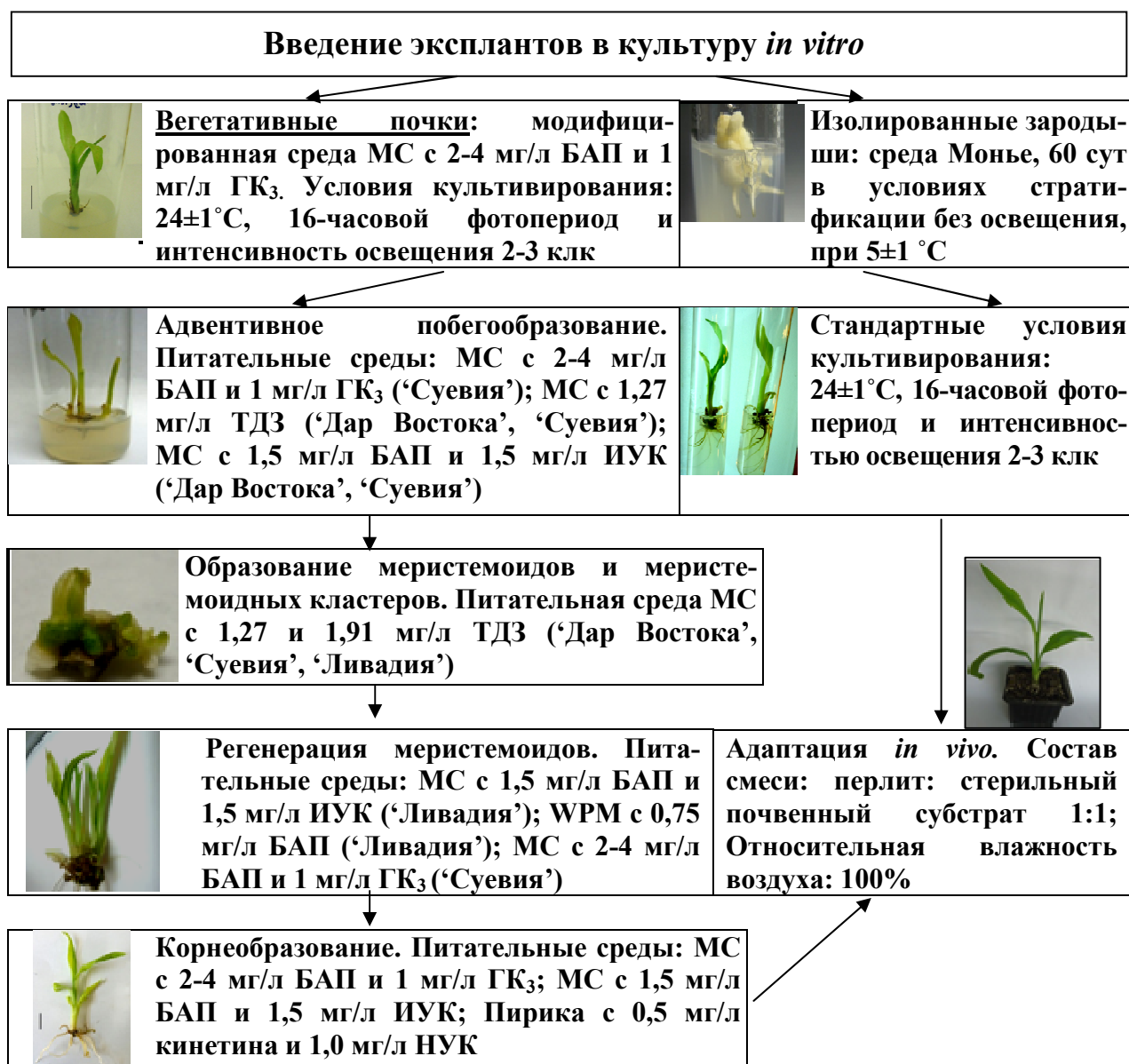
Таблица 10

Влияние концентрации ССС на образование меристемоидов через 3 месяца депонирования

Генотип	Показатели	Концентрация ССС, г/л					
		контроль	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
Ливадия	Количество/эксплант, шт.	1,75±0,29	1,2±0,65	0,75±0,29*	0,75±0,55*	0	0
	Длина, см	1,5±0,74	0,25±0,088	0,93±0,22	0,45±0,10	0	0
Дар Востока	Количество/эксплант, шт.	0	0	0	2,00±0,71	0	0
	Длина, см	0	0	0	0,44±0,02	0	0
Суевия	Количество/эксплант, шт.	1,67±0,82	2,50±0,75	2,00±0,71	2,75±0,99	0	0
	Длина, см	0,38±0,12	0,45±0,04	0,55±0,04	0,6±0,06	0	0

Установлено, что использование питательной среды с 0,3-0,4 г/л ССС ингибировало развитие новых меристемоидов у всех изучаемых нами сортов канны.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ



ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований процессов развития различных эксплантов 4 сортов канны садовой в условиях *in vitro* установлены особенности и пути морфогенеза *in vitro* (формирование меристемоидов, адвентивных почек и проростков), адаптации их *in vivo*, показаны морфологические и физиологические различия регенерантов *in vitro* и *in vivo*, особенности их депонирования, а также выявлена зависимость этих процессов от трофических, гормональных и физических факторов культивирования, что свидетельствует о высоких потенциальных возможностях роста и развития канны в созданных искусственных системах.

2. Для каждого генотипа определены оптимальные типы эксплантов для введения в культуру *in vitro*: 'Дар Востока' (вегетативные почки,

изолированные зародыши), 'Ливадия' (вегетативные почки, изолированные зародыши), 'Суевия' и 'Президент' (вегетативные почки).

3. Усовершенствован способ стерилизации вегетативных почек, позволяющий снизить частоту контаминации у сортов Президент и Дар Востока до 20-33,4% при применении раствора Дез ТАБ, у сортов Ливадия и Суевия – до 20-28,6%, используя раствор 3% гипохлорита натрия.

4. Выявлено влияние типа и концентрации регуляторов роста на регенерационный потенциал эксплантов канн садовой. Установлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Дар Востока и Суевия необходимо добавление в питательную среду 1,27 мг/л ТДЗ, для 'Ливадии' – 1,91 мг/л ТДЗ. Длительное культивирование эксплантов канн приводило к индукции процесса прямого органогенеза и массового образования меристемоеидов и меристемоеидных кластеров, что позволило значительно повысить коэффициент размножения исследуемых сортов.

5. На основании проведенного гистологического анализа установлено, что у сортов Суевия и Ливадия в условиях *in vitro* морфогенетический потенциал реализуется через этап формирования меристемоеидов в основании микропобегов.

6. Выявлены особенности ризогенеза *in vitro*, получены регенеранты 3 сортов канн садовой и показано влияние состава питательной среды на способность микропобегов к корнеобразованию, что дало возможность исключить специальный этап укоренения.

7. Установлено, что для получения полноценных растений в культуре зиготического зародыша сортов Дар Востока и Ливадия (от свободного опыления) необходима их предварительная стратификация в течение 60 сут на среде Монье.

8. Определены оптимальные субстраты и представлены условия, необходимые для адаптации пробирочных растений. Показано, что применение в качестве субстрата смеси перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1) позволяет получить 75% успешно адаптированных растений после 6 месяцев культивирования *in vivo* по сравнению с другими изучаемыми сортами.

9. На основе морфологических и физиологических исследований канн садовой, учитывая структурные изменения в тканях меристемоеидов и регенерантов в условиях *in vitro* и адаптации *in vivo* установлено, что сорт Ливадия обладает наибольшей адаптационной способностью к изменяющимся условиям культивирования, в частности лабильным водным режимом.

10. Подобраны условия депонирования эксплантов *in vitro* канн садовой (вегетативных почек и меристемоеидов), позволяющие замедлять их рост и развитие эксплантов, сохранять на протяжении 7 месяцев на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 0,2 г/л ССС, 60 г/л сахарозы, при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$, освещении 0,1-0,5 клк.

11. На примере сортов Суевия, Ливадия и Дар Востока разработаны и представлены схемы микроразмножения канн садовой для получения регенерантов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях из списка ВАК

1. Тевфик А.Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в культуре вегетативных почек *in vitro* / А.Ш. Тевфик // Труды Никит. ботан. сада. – 2012. – Т. 134. – С. 426-435.
2. Тевфик, А.Ш. Влияние сроков введения на жизнеспособность первичных эксплантов и индукцию морфогенеза канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2012. – Вып. 105. – С. 143-147.
3. Тевфік, А.Ш. Індукція морфогенезу канни садової (*Canna × hybrida hort.*) за умови *in vitro* / А.Ш. Тевфік, І.В. Митрофанова // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 60. – С. 58-63.
4. Тевфик, А.Ш. Современные методы размножения канны садовой / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.В. Зубкова // Цветоводство. – 2014. – №6. – С. 2-5.
5. Тевфик, А.Ш. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Т.Н. Кузьмина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2014. – № 3(3). – С. 124-127.
6. Тевфик, А.Ш. Изучение регенерационной способности зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 157-164.
7. Тевфик, А.Ш. Особенности клонального микроразмножения канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Т.Н. Кузьмина // Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7, № 5. – С. 71-76.
8. Тевфик, А.Ш. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза представителей семейств Ronunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Murtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae / И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.В. Корзина, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н.Н. Иванова, А.Ш. Тевфик, А.Ю. Заяц, Т.И. Пилипчук // Труды Никит. ботан. сада. – 2014. – Т. 138. – С. 102-136.

Статьи в прочих изданиях

9. Тевфик, А.Ш. Изучение параметров флуоресценции хлорофилла а хлоропластов листьев *Canna × hybrida hort.* в условиях *in vitro* и при адаптации *in vivo* / В.А. Браилко, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, А.Ш. Тевфик // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: матер. VIII Съезда ОФР России и Всероссийской научной конференции (21-26 сентября 2015 г.). – Петрозаводск. – 2015. – С. 80.
10. Тевфик, А.Ш. Жизнеспособность первичных эксплантов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в зависимости от генотипа и сроков введения в условия *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Н.В. Зубкова // Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство: матер. конф. международной научн. конф., посвященной 200-летию Никитского ботанического сада (5-8 июня 2012 г.). – Ялта, 2012 – Т.2. – С.160.

11. Тевфик, А.Ш. Индуцированный морфогенез *in vitro* из органов и тканей канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Біотехнологія: звершення та надії: матер. II всеукраїнської науково-практич. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, (16-17 травня 2013 р.). – Київ, 2013. – С. 49-50.
12. Тевфик, А.Ш. Индукция ризогенеза *in vitro* ценных сортов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Проблемы и перспективы исследований растительного мира: матер. междунар. научно-практич. конф. молодых ученых, (13-16 мая 2014 г.). – Ялта, 2014. – С. 69.
13. Тевфик, А.Ш. Особенности введения в культуру *in vitro* перспективных сортов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Беларуси, (19-22 июня 2012 г.). – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 467-471.
14. 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, Н.П. Лесникова-Седошенко // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. междунар. научно-практич. конф., 13-15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь. – Минск: Изд. Центр БГУ, 2013. – С. 198.
15. 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: матер. VI Междунар. научн. конф. (15–18 мая 2013 г.). – Белгород: НИУ «БелГУ», 2013. – С. 414-416.
16. Tevfik, A.Sh. Biotechnology approaches of Canna (*Canna × hybrida hort.*) clonal micropropagation / A.Sh. Tevfik, I.V. Mitrofanova, T.V. Kuzmina // Biotechnology as an instrument for plant biodiversity conservation physiological, biochemical, genetic and legal aspects: Book of Abstracts the VI International Scientific and Practical Conference (12-17 October 2014). – Yalta. – P. 111.
17. Tevfik, A.Sh. The biotechnology approaches of Canna (*Canna × hybrida hort.*) regenerants obtaining / A.Sh. Tevfik, I.V. Mitrofanova, O.V. Mitrofanova, N.P. Lesnicova-Sedoshenko, V.A. Brailko // Production and Establishment of Micropropagated plants: Book of Abstracts 6th International ISHS Symposium. (19-24 April 2015) Grand Hotel Londra. – Sanremo. Italy. – P. 201.