

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 582.548.25: 57.085.23

**ІНДУКЦІЯ МОРФОГЕНЕЗУ КАННИ САДОВОЇ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*)
ЗА УМОВИ *IN VITRO***

А. Тевфік, І. Митрофанова

*Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр НААН України
м. Ялта, смт Нікіта 98648, АР Крим, Україна
e-mail: in_vitro@ukr.net*

Індуковано регенерацію *in vitro* мікропагонів з вегетативних бруньок канни садової (*Canna* × *hybrida hort.*) сорту Suevia. Показано особливості розвитку мікропагонів, а також вивчено життєздатність листових експлантів на різних поживних середовищах.

Ключові слова: канна, морфогенез, вегетативна брунька, листок, культура *in vitro*.

На сьогоднішній день прискорене розмноження цінних сортів декоративних рослин становить великий інтерес для зеленого будівництва. Застосування біотехнологічних методів дає змогу отримати оздоровлений посадковий матеріал, депонувати найбільш цінні сорти і підтримувати їх у вигляді повільно зростаючих колекцій *in vitro*.

Канна садова (*Canna* × *hybrida hort.*) широко використовується у декоративному садівництві та привертає увагу, завдяки великим малиновим, червоним, помаранчевим, лососевим і жовтим квітам, зібраним у суцвіття, а також листкам від сизо-зеленого до фіолетово-червоного забарвлення. Види роду *Canna* L. походять із тропічних і субтропічних районів Америки та Південно-Східної Азії. У 1815 р. рослини канни вперше були інтродуковані до Нікітського ботанічного саду (НБС) [2, 6]. На теперішній час колекція канни садової налічує 26 сортів селекції НБС і 23 сорти зарубіжної селекції. Достатньо вивчені питання селекції та розмноження *C. hybrida* [6, 7]. Поряд із цим, опубліковано лише поодинокі повідомлення про результати біотехнологічних досліджень *Canna indica* L. і *Canna edulis* Ker.: методи стерилізації; абіотичні фактори, які впливають на культивування первинних експлантів; власне мікророзмноження та ризогенез *in vitro* [8–11].

Метою нашої роботи було виявити морфогенетичний потенціал різних органів і тканин цінних сортів канни садової в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи

Як об'єкти дослідження використано перспективні сорти канни садової з колекційних насаджень Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру (НБС–ННЦ): 2 сорти селекції НБС–ННЦ (Дарунок Сходу, Лівадія) та 2 сорти зарубіжної селекції (President, Suevia).

Дослідження проводили у лабораторії біохімії, біотехнології та вірусології рослин Нікітського ботанічного саду. У роботі використано методи культури органів і тканин: загальноприйняті [1] та розроблені у відділі біотехнології рослин НБС–ННЦ [4, 5].

Як вихідні експланти взято сегменти кореневищ канни садової, відібрані у листопаді 2011 р. Для введення у культуру *in vitro* виділено вегетативні бруньки. Рослинний матеріал стерилізували у декілька етапів: промивали у проточній водопровідній воді з мильним розчином, ополіскували проточною водопровідною водою, протирали марлевою серветкою,

змоченою у 70%-ному етанолі. Потім відділяли забруднені тканини від вегетативної бруньки, експлантати розміщували у стерильні склянки та послідовно обробляли розчинами стерилізуючих агентів (табл. 1).

Таблиця 1

Схема ступінчастої стерилізації первинних експлантів канти садової

Етап стерилізації	Стерилізуючий розчин	Виробник	Експозиція
1	70% C ₂ H ₅ OH	Септол, Україна	1 хв
2	3% NaClO	Доместос, Україна	17 хв
3	5-разове промивання у стерильній дистильованій воді		

Експлантати після стерилізації, в асептичних умовах розміщали у пробірки на агаризоване поживне середовище. Як базове середовище використовували поживне середовище Murashige, Skoog (МС) [12] із додаванням різних концентрацій цитокінінів і ауксинів.

Вичленяли висічки листка розміром 0,7–1,2 см² від культивованих за умов *in vitro* рослин. Потім їх також розміщували на поживне середовище, доповнене БАП (6-бензиламінопурин), НОК (α-нафтилоцтова кислота), ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота), ТДЗ (тидіазурон).

Для індукції розвитку експлантати культивували при температурі 24±1°C, 16-годинному фотоперіоді й інтенсивності освітлення 2–3 клк. Частину висічок листка розміщували у термостаті й культивували без освітлення.

Опрацювання результатів експериментів проводили за допомогою методів статистичного аналізу [3].

Результати і їхнє обговорення

Одним із найважливіших факторів, які впливають на регенерацію мікропагонів на початковому етапі культивування є генотип рослинного матеріалу [4]. Так, у життєздатних експлантів канти садової сорту Дарунок Сходу не було відзначено збільшення довжини мікропагонів. Разом з тим, на 25 добу культивування відбувалося подовження життєздатних експлантів сортів Лівадія та Президент до 1 см, а також було відзначено формування 1–2 розгорнутих листків на мікропагін. Однак у більш пізні строки культивування краї листків потемніли (рис. 1), що призводило згодом до відмирання цілого мікропагона.

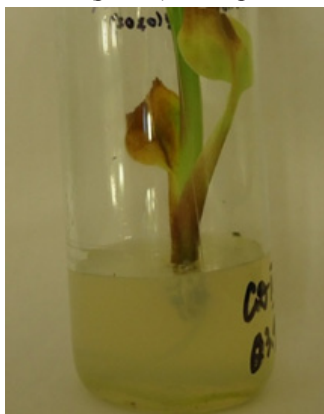


Рис. 1. Потемніння листків канти садової сорту Президент, культивованого в умовах *in vitro* (масштаб 1 см).

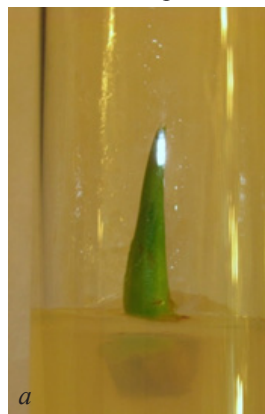


Рис. 2. Експлантати канти садової сорту Suevía (масштаб 1 см): а - на початковому етапі культивування; б - на 30-ту добу культивування.

У результаті проведених досліджень було відзначено подовження мікропагонів сорту *Suevia* на 10-ту добу культивування; на 30-ту добу культивування їхня довжина збільшилася на 2,5 см (рис. 2, а, б). Через три місяці культивування в умовах *in vitro* відзначено утворення $3,33 \pm 0,36$ розгорнутих листків на експлант (табл. 2). Разом з тим, довжина мікропагонів збільшилася на $5,5 \pm 0,74$ см.

Таблиця 2

Зміни морфологічних ознак експлантів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro*

Морфологічні ознаки	Тривалість культивування, міс		
	3	6	9
Збільшення довжини мікропагонів, см	$5,5 \pm 0,74$	$8,92 \pm 0,63$	$11,33 \pm 0,87$
Кількість розгорнутих листків на мікропагін, шт.	$3,33 \pm 0,36$	$4,67 \pm 0,46$	$5,33 \pm 0,46$

Залежно від тривалості культивування, у експлантів сорту *Suevia* спостерігали зміни їх морфологічних ознак. Так, на 180-ту добу культивування довжина мікропагонів зросла в 1,4 разу більше ніж на 270-ту добу. При цьому в експлантів після закінчення 2-го кварталу культивування (6 місяців) сформувалося удвічі більше розгорнутих листків, ніж за 3-й (9 місяців).

Як показали наші дослідження, появу адвентивних пагонів у окремих експлантів сорту *Suevia* спостерігали на 65-ту добу культивування. Мікропагони канти садової, які зберегли життєздатність на 90-ту добу культивування, сформували 1,25 додаткового пагона на експлант (табл. 3). Через 6 місяців культивування за умови *in vitro* кількість сформованих адвентивних пагонів на експлант збільшилася до 1,6. Але при подальшому культивуванні цей показник залишався незмінним.

Таблиця 3

Зміни морфологічних ознак адвентивних пагонів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro*

Морфологічні ознаки	Тривалість культивування, міс		
	3	6	9
Кількість утворених адвентивних пагонів на експлант, шт.	$1,25 \pm 0,22$	$1,6 \pm 0,27$	$1,6 \pm 0,27$
Збільшення довжини адвентивних пагонів, см	$1,1 \pm 0,22$	$5,38 \pm 0,71$	$7,2 \pm 0,97$
Кількість розгорнутих листків на адвентивний пагін, шт.	–	$1,2 \pm 0,22$	$2,4 \pm 0,27$

Разом із цим, у експлантів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro* збільшилася довжина адвентивних пагонів (рис. 3). При цьому подовження мікропагонів у другому кварталі культивування (4,28 см) було значно більшим, ніж у третьому (1,82 см).

Поряд із цим, спостерігали поступове розгортання листків адвентивних пагонів. Так, на 180-ту добу культивування на 1 адвентивний пагін утворилося 1,2 листка. При подальшому тримісячному культивуванні їх кількість збільшилася у 2 рази.

Наші дослідження показали, що життєздатність експлантів (висічок листків) сорту *Suevia* залежить від режиму освітлення та складу поживного середовища. Так, оптимальним для культивування експлантів як у темряві, так і при освітленні виявилось поживне середовище RG6. Високу життєздатність експлантів відзначали також при культивуванні без освітлення на середовищі RG8 (86%).

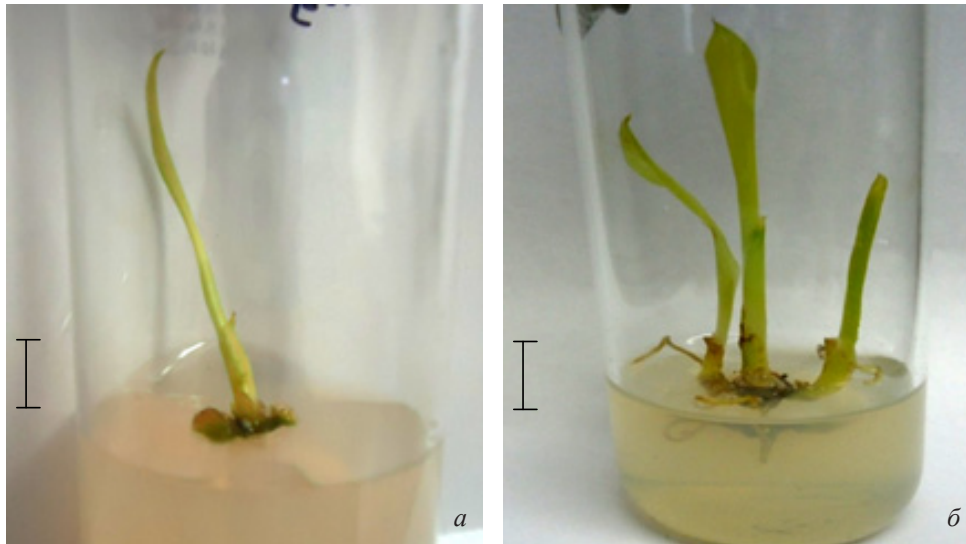


Рис. 3. Адвентивне пагоноутворення канни садової сорту Suevia (масштаб 1 см): а - на 85-ту добу культивування; б - на 210-ту добу культивування.

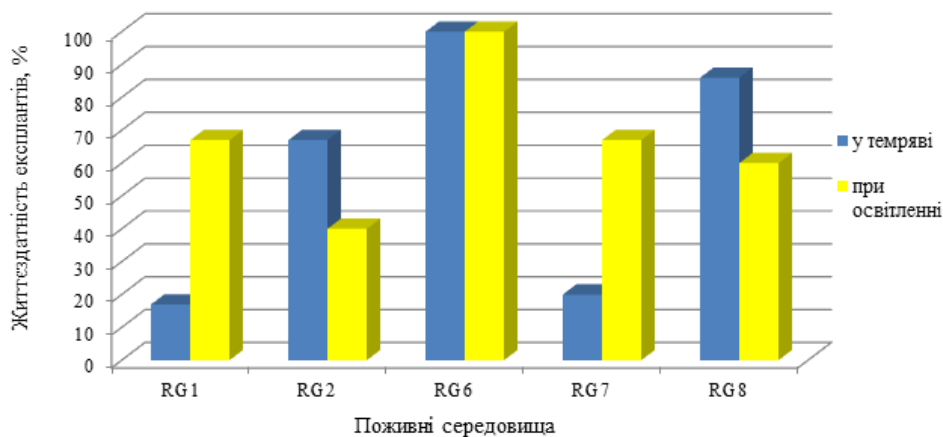


Рис. 4. Життєздатність експлантів (всічок листка) сорту канн Suevia на 14-ту добу культивування залежно від режиму освітлення та концентрацій регуляторів росту в поживному середовищі МС (RG1 – 1,5 БАП+1,5 НОК; RG2 – 1,5 БАП+1,5 ІОК; RG6 – 1,5 мг/л 2,4-Д; RG7 – 6 мкМ ТДЗ; RG8 – 9 мкМ ТДЗ).

Однак при культивуванні у термостаті на поживних середовищах RG1 і RG7, а також при освітленні на середовищі RG2 життєздатність експлантів була низькою (17–40%). При цьому значна частина експонатів потемніла та загинула.

Таким чином, вивчаючи особливості морфогенезу вегетативних бруньок і листових експлантів канни садової, нами відзначено різні шляхи регенерації рослин. На 180-ту добу культивування вегетативних бруньок за умови *in vitro* утворилося 1,6 адвентивного пагона на експлант. **Оптимальним поживним середовищем для підтримки життєздатності листових експлантів сорту Suevia на 14-ту добу культивування є середовище МС, доповнене 1,5 мг/л 2,4-Д.** Показано можливість отримання регенерантів сорту Suevia.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
2. Дашкеев Е. А. Канны в Молдавии. Кишинев: Штиинца, 1975. 65 с.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
4. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрна наука, 2011. 344 с.
5. Митрофанова О. В., Михайлов А. П., Чехов А. В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Сб. научн. трудов Никит. ботан. сада. Ялта, 1997. Т. 119. С. 5–12.
6. Феофилова Г. Ф. Ассортимент и технология выращивания перспективных сортов канны для южных районов страны // Сб. научн. трудов Никит. ботан. сада. Ялта, 1991. Т. 112. С. 41–50.
7. Шолохова Т. А. Изучение морфогенеза вегетативных органов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в онтогенезе // Вивчення онтогенезу рослин природних і культурних флор у ботанічних закладах і дендропарках Європи: Матеріали 12 Міжнар. конф. Полтава, 2000. С. 355–357.
8. Borroto-Fernandez E. G., Maghuly F., Fellner A., Laimer M. Determination of viral infections in an austrian collection of *Canna indica* // J. of Plant Diseases and Protection. 2008. Vol. 3. N 115. P. 102–103.
9. Hosoki T., Sasaki H. *In vitro* propagation of *Canna edulis* Ker. by longitudinal shoot-split method // Plant Tissue Culture Letters. 1991. Vol. 3. N 8. P. 175–178.
10. Kromer K. Biological activity of endogenous and influence of exogenous growth regulators on *Canna indica* regeneration *in vitro* // Acta Hort. 1979. N 91. P. 295–300.
11. Kromer K., Kukulczanka K. *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* // Acta Hort. 1985. N 167. P. 279–286.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

доопрацьована 18.10.12

прийнята до друку 22.10.12

**INDUCTION OF CANNA GARDEN (*CANNA × HYBRIDA HORT.*)
MORPHOGENESIS *IN VITRO***

A. Tefvik, I. Mitrofanova

*Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre NAAS of Ukraine
98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita
e-mail: in_vitro@ukr.net*

Regeneration *in vitro* of microshoots from vegetative buds of canna garden (*Canna × hybrida hort.*) cv. Suevia has been induced. Peculiarities of vegetative buds differentiation

and leaf explants viability on different culture medium have been shown.

Keywords: canna, morphogenesis, vegetative bud, leaf, culture *in vitro*.

ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А. Тевфик, И. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,

НААН Украины

г. Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина

e-mail: in_vitro@ukr.net

Индукцирована регенерация *in vitro* микропобегов из вегетативных почек канны садовой (*Canna* × *hybrida hort.*) сорта Suevia. Показаны особенности развития микропобегов, а также жизнеспособность листовых эксплантов на различных питательных средах.

Ключевые слова: канна, морфогенез, вегетативная почка, лист, культура *in vitro*.