

УДК 582.548.25: 57.085.23

## ОСОБЕННОСТИ ВОДНОГО РЕЖИМА *CANNA* × *HYBRIDA HORT. EX* VASKER В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Тевфик А. Ш.<sup>1,2</sup>, Браилко В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Республика Крым, Россия, tevfik.arzyu@yandex.ru

Представлены основные этапы клонального микроразмножения канны садовой: введение в культуру *in vitro* вегетативных почек, адвентивное побегообразование, образование меристемоеидов, регенерация микропобегов и растений из меристемоеидов и последующая адаптация *in vivo*. Показаны изменения параметров водного режима трех сортов канны, таких как Суевия, Дар Востока и Ливадия в зависимости от условий культивирования *in vitro*, *in vivo* и *ex situ*.

*Ключевые слова:* канна садовая, меристемоеид, регенерация, водный режим, *in vitro*, *in vivo*, *ex situ*.

### ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее отзывчивых сторон метаболизма растений при изменяющихся условиях культивирования являются характеристики водного режима. Вода – основной компонент растительных клеток и тканей, ее содержание варьирует в зависимости от особенностей конкретной культуры и от способности адаптироваться к экзогенным абиотическим факторам (Кушнеренко, Печерская, 1991). Ряд исследователей считает, что особенность регулирования водообмена – один из основных факторов, ограничивающих рост и развитие растений *ex situ* (Chaves et al., 2009). В работе Flexas et al. (2006) показано, что водный стресс и изменения в водном балансе в первую очередь влияют на ассимиляцию CO<sub>2</sub>, ограничивая процессы роста. Так как клональное микроразмножение направлено на получение большего количества растительного материала в нормальном функциональном состоянии, способного достаточно быстро развиваться и расти, актуальным является вопрос регуляции водного режима растений в условиях *in vitro*, *in vivo* и *ex situ*.

Известно, что морфогенез канны садовой при культивировании в асептических условиях может проходить через образование меристемоеидных кластеров, а затем через регенерацию микропобегов из меристемоеидов. В связи с этим, целью наших исследований было изучение оводненности тканей меристемоеидов *in vitro*, микропобегов и растений *Canna* × *hybrida hort. ex* Vasker в условиях абсолютной влажности *in vitro*, в защищенном грунте (*in vivo*) при контролируемых значениях относительной влажности воздуха и при выращивании растений в открытом грунте на коллекционных участках (*ex situ*), для составления прогноза их адаптационных способностей к водному стрессу и выделению среди изучаемых сортов наиболее устойчивых генотипов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали перспективные сорта канны садовой (*C. × hybrida hort.*) из коллекции ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (ФГБУН «НБС-ННЦ»): 2 сорта селекции ФГБУН «НБС-ННЦ» (Дар Востока и Ливадия) и 1 сорт зарубежной селекции (Суевия).

Эксперименты проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ». В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые (Бутенко, 1999; Kute et al. 2013) и разработанные в отделе биотехнологии растений (Митрофанова, 2011; Митрофанова и др., 2014).

Для стерилизации вегетативных почек использовали 2 схемы ступенчатой стерилизации с применением таких антисептиков как этанол (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), коммерческий препарат Domestos

(Великобритания), коммерческий препарат ДезТаб (КНР), фунгицид Thimerosal (Merk, Германия) с разной экспозицией (Тевфик, 2012).

Экспланты помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга [МС] (Murashige, Skoog, 1962) с 3,0 % сахарозы, 1,0 % агар-агара (Panreac, Испания) с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП, Sigma, США) и гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>, Sigma, США). Пробирки с эксплантами культивировали при температуре  $24 \pm 1$  °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2–3 клк. Для адвентивного побегообразования канны в питательную среду МС добавляли цитокинины тидиазурон (ТДЗ, Sigma, США) и БАП. Для адаптации регенерантов к условиям *in vivo* использовали перлит, смесь перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1), и смесь перлита и торфа (1:1). Адаптацию проводили на СУВРе. Для поддержания 100 % влажности в качестве изоляторов применяли стеклянные и полиэтиленовые стаканы. Опыты проводили трижды в десятикратной повторности, определяли среднее, отклонение от среднего, подсчитывая количество образовавшихся меристемоеидов и микропобегов. Обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc., 2013).

Оценку оводненности проводили методом термической сушки при 105 °С до постоянного веса, фракционный состав воды изучали при помощи метода Маринчика-Гусева (Лищук, 1991). Анализ водного дефицита и водоудерживающая способность тканей листа был проведен для растений, произрастающих в условиях открытого грунта арборетума НБС (Кушнеренко, 1991).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из факторов, который имеет значительное влияние на эффективность клонального микроразмножения, является состав питательной среды. В зависимости от типа экспланта и поставленных задач, на каждом этапе микроразмножения подбирается определенная питательная среда, в частности концентрации и комбинации регуляторов роста растений (Бутенко, 1999; Митрофанова, 2011; Mitrofanova et al., 2016).

Для введения в культуру *in vitro* вегетативных почек была использована питательная среда МС с 4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК<sub>3</sub>. Среди изучаемых нами сортов у Дар Востока и Суевия удалось индуцировать образование дополнительных микропобегов. При этом коэффициент размножения не превышал 1,6 шт./эксплант, поэтому в дальнейшем для активизации адвентивного побегообразования использовали питательную среду МС с добавлением ТДЗ.

Как показали наши исследования, применение низкой концентрации ТДЗ не повышало частоту адвентивного побегообразования у сортов Дар Востока и Суевия, по сравнению с результатами, полученными на среде, используемой для введения эксплантов. Вместе с тем у 69 % и 95 % эксплантов сорта Ливадия удалось индуцировать образование дополнительных побегов при повышении концентрации ТДЗ до 1,27 и 1,91 мг/л соответственно (рис. 1). Однако высокое содержание ТДЗ (2,54 мг/л) снижало частоту адвентивного побегообразования, а при длительном культивировании вызывало активное образование каллуса темно-зеленой окраски у эксплантов двух сортов: Суевия и Дар Востока.

При добавлении в питательную среду ТДЗ в концентрации 1,27 и 1,91 мг/л у сорта Суевия (рис. 2) наблюдали активную регенерацию дополнительных эксплантов (более 4 шт./эксплант) по сравнению с другими сортами (до  $2,75 \pm 0,29$  шт.).

Наряду с этим длительное культивирование (более 60 суток при пассаже каждые 30 суток на аналогичную питательную среду) микропобегов изучаемых сортов на средах с ТДЗ индуцировало появление меристемоеидов в их основании. У сортов Суевия (рис. 3Б) и Дар Востока (рис. 3А) с каждым субкультивированием на свежеприготовленную среду с 1,27 мг/л ТДЗ повышался коэффициент размножения. На 180 суток отмечали в среднем образование  $20,25 \pm 0,55$  и  $25 \pm 1,9$  меристемоеидов на эксплант у сортов Суевия и Дар Востока соответственно. Вместе с тем, экспланты сорта Ливадия на 180 сутки культивирования образовывали в среднем  $40 \pm 5,62$  меристемоеидов на питательной среде, дополненной 1,91 мг/л ТДЗ (рис. 3В).

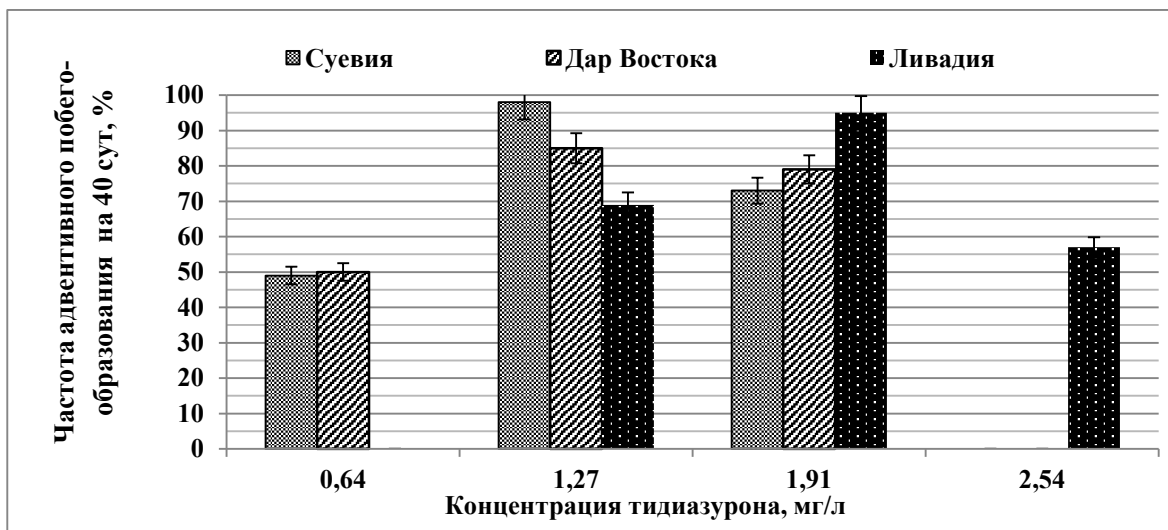


Рис. 1. Влияние сорта и концентрации ТДЗ в питательной среде на частоту адвентивного побегообразования канны садовой

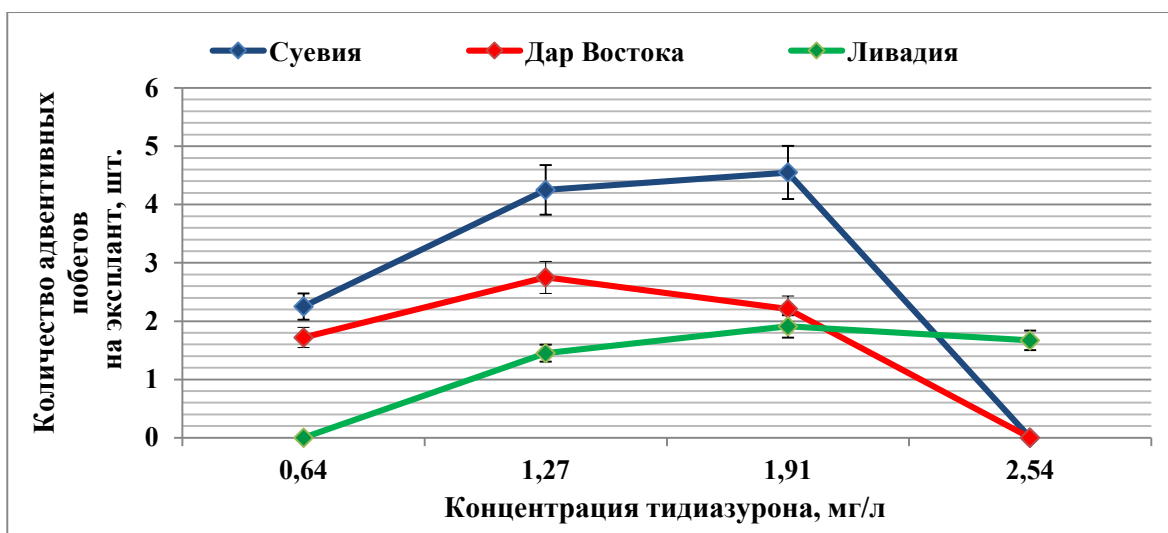


Рис. 2. Зависимость образования адвентивных микропобегов канны садовой от культивируемого сорта и концентрации ТДЗ в питательной среде

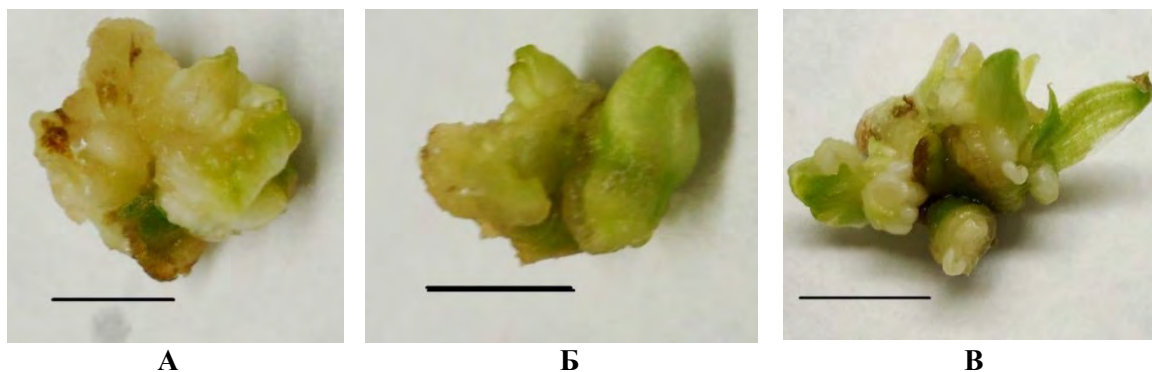


Рис. 3. Сформовавшиеся меристемоиды канны садовой у сортов Дар Востока (А), Суевия (Б), Ливадия (В); масштабный отрезок 1 см

Гистологические исследования позволили нам зафиксировать и подтвердить образование меристемоидов в основании микропобегов двух сортов канны садовой: Суевия и Ливадия (Тевфик и др., 2014а, 2014б). Анализ литературных источников показал, что подобные гистологические исследования немногочисленны. Так, имеются ряд публикаций, касающихся гистологического изучения образовавшихся меристемоидов у таких культур: *Anthurium andraeanum* Linden (Bhattacharya et al., 2015), *Abies fraseri* (Pursh) Poir. (Saravitz et al., 1993), *Tacitus bellus* (Spasić et al., 2015), *Passiflora edulis* Sims (Gloria et al., 1999) и *Paulownia tomentosa* Steud. (José et al., 2014).

Необходимо отметить, что после перенесения меристемоидов канны садовой, культивируемых на питательной среде, содержащей ТДЗ, на безгормональную питательную среду МС нам удалось индуцировать и пролонгировать процесс образования новых меристемоидов. Так, в основании меристемоидов сорта Суевия и Ливадия на 40-е сутки культивирования на безгормональной среде формировалось до 4 и 10 меристемоидов на эксплант соответственно. Однако, длительное культивирование не приводило к образованию новых меристемоидов. Это может свидетельствовать о том, что ТДЗ обладает пролонгирующим действием, которое при более продолжительном культивировании (более 50 суток) на среде без регуляторов роста угасает.

Для регенерации микропобегов из меристемоидов использовали питательную среду МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, на которой в первые 50 суток культивирования отметили образование новых меристемоидов. При более длительном культивировании (при субкультивировании каждые 30 суток на аналогичную питательную среду) из меристемоидов формировались вегетативные почки, а затем микропобеги (рис. 4А) и полноценные растеньица, пригодные к высадке в условия *in vivo* (рис. 4Б). Нам также удалось исключить специальный этап ризогенеза при разработке схемы клонального микроразмножения канны садовой.



А  
Б  
Рис. 4. Регенеранты *in vitro* (А) и высаженные растения канны садовой сорта Суевия в условия *in vivo* (Б)

Среди используемых нами видов субстрата для высадки на адаптацию *in vivo*, наиболее эффективным оказалось применение смеси перлита и стерильного почвенного субстрата. Однако приживаемость высаженных регенерантов была невысокой, поэтому необходимо было выяснить, как быстро происходит восстановление метаболизма за счет изменения водного режима растений канны от условий *in vitro* к условиям *in vivo*.

Меристемоиды *Canna × hybrida* были в значительной степени обводненными: 90–96 % от их сырого веса составляла вода, из которой фракция свободной – 67–83 %. Меристемоиды сорта Суевия содержали больше связанной воды, чем сорта Ливадия и Дар Востока (табл. 1).

Таблица 1

Оводненность меристематических тканей и листьев *Canna × hybrida* при различных условиях культивирования

Условия культивирования		Сорт		
		Суевия	Ливадия	Дар Востока
		Доля содержания воды / доля связанной воды, % M±m		
<i>in vitro</i>	ткани меристематических	92±4 / 15 ±2	88±2 / 28 ±5	90±5 / 16 ±3
	листья микропобегов	95±2 / 8 ±2	96±2 / 30 ±2	94±3 / 42 ±5
<i>in vivo</i>	листья регенерантов	92±4 / 36 ±2	84±6 / 45 ±1	90±4 / 47 ±3
<i>ex situ</i> , листья	июль	87±3 / 46 ±5	85±4 / 63 ±7	88±5 / 58 ±4
	август	84±4 / 56 ±2	81±6 / 76 ±6	86±4 / 60 ±3

Общее содержание воды в тканях листьев микропобегов канны садовой *in vitro* также очень высокое, оно составило 91–98 %, при этом на долю связанной фракции пришлось 10–47 % ее содержания (максимальный показатель у регенерантов сорта Ливадия). Исследования фракционного состава воды регенерантов *in vivo* продемонстрировали увеличение связанной воды до 31–50 %, при сходном уровне оводненности листьев (91–93 %).

Ранее нами были изучены анатомо-морфологические особенности регенерантов канны садовой (Tevfik et al., 2015; Mitrofanova et al., 2017a, Mitrofanova et al., 2017b), что позволило выявить наличие гидроморфной структуры вегетативных органов с множественными очагами гистогенеза в меристематических и недифференцированным мезофиллом листьев у микропобегов *in vitro*. И только на этапе корнеобразования и выращивания в теплице формируются кутикулярный покров, палисадный и губчатый мезофилл; клетки эпидермы становятся мельче и приобретают правильную форму. Для 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 ( $r=0,73$ ). Стоит отметить, что вегетативные органы регенерантов сортов Суевия и Дар Востока обладают наиболее изогидратными характеристиками: при изменяющихся условиях культивирования оводненность их тканей *in vitro* и *in vivo* более стабильна. При этом у сорта Ливадия установлена анизогидратная тенденция в регуляции параметров водного режима: при стабильно высокой оводненности доля связанной воды в процессе культивирования становится больше, что указывает на более высокий адаптационный потенциал водообмена регенерантов данного сорта.

На коллекционном участке НБС растения канны садовой находятся при соответствующем агротехническом уходе и постоянном поливе. Таким образом, во время вегетации возможно воздействие только атмосферной, а не почвенной засухи. В связи с этим листья отбирали во время максимального напряжения гидротермического стресса: в третьей декаде июля (среднесуточная температура воздуха только составила 23,5 °С, максимальная достигала 28,4 °С, минимальная относительная влажность воздуха – 46 %) и третьей декаде августа (23,8 и 27,4 °С, минимальная относительная влажность – 27 %). Общее содержание

воды в листьях канны садовой в период вегетации находилось в среднем в пределах от 82 до 93 %. Отмечено варьирование водного режима в зависимости от сорта. Максимальная оводненность тканей в течение периода вегетации отмечена у сорта Дар Востока, минимальная – у сорта Ливадия. Определение форм воды в динамике показало, что у всех сортов при нарастании стресса увеличивается доля связанной воды (до уровня 55–76 %, максимальные значения у сорта Ливадия). Водный дефицит в тканях листа был незначительный. Его величина составляла 3–8 % (максимальные значения характерны для сорта Суевия: 7–8 %).

Это также может быть связано с наличием у листьев канны *ex situ* мощной кутикулы, развитой аэренхимы, плотного мезофилла с мелкими межклетниками (Палий и др., 2016).

Водоудерживающая способность тканей листьев изученных сортов высокая, – за 24 часа завядания водоотдача составила 36–41 % у сорта Суевия, у остальных сортов достигла 14–29 % от состояния полного насыщения. Существенная разница среди сортов была отмечена через 48 часов завядания, когда листья у сортов Суевия и Ливадия потеряли 38–54 %. Для сорта Дар Востока характерна водоотдача 29–38 %. Несмотря на низкую водоудерживающую способность при 48-часовом завядании листья сорта Ливадия проявляют значительную репарационную способность, на 72 % восстанавливая тургор при повторном насыщении.

Таким образом, благодаря исследованиям параметров водного режима листьев канны садовой во время культивирования в открытом грунте можно выделить сорта, обладающие более высокими способностями переносить атмосферную засуху: Дар Востока и Ливадия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов продемонстрировали особенности клонального микроразмножения канны садовой, на этапе собственно микроразмножения которого, кроме образования дополнительных микропобегов, также проходит множественное образование меристематидов.

Определены оптимальные концентрации регуляторов роста: для адвентивного побегообразования – 1,27 мг/л ТДЗ (сорта Дар Востока и Суевия) и 1,91 мг/л (сорт Ливадия); для регенерации меристематидов и корнеобразования – 1,5 мг/л БАП и 1,5 ИУК.

Изучение показателей водного режима 3 сортов канны садовой позволили выявить, что минимальная устойчивость к гидротермическому стрессу характерна для сорта Суевия.

*Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00079.*

## Список литературы

- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. – М.: ФРК – Пресс, 1999. – 160 с.
- Кушниренко М.Д., Печерская С.Н. Физиология водообмена и засухоустойчивости растений. – Кишинёв: Штиинца, 1991. – 306 с.
- Лишук А. И. Методика определения водоудерживающей способности к обезвоживанию листьев плодовых культур. Физиологические и биофизические методы в селекции плодовых культур: методические рекомендации. М.: ГНБС. – 1991. – С. 33–36.
- Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука. – 2011. – 344 с.
- Митрофанова О. В., Митрофанова И. В., Лесникова-Седошенко Н. П., Иванова Н. Н. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. – Т. 138. – С. 5–56.
- Палий А. Е., Митрофанова И. В., Браилко В. А., Гребенникова О. А., Зубкова Н. В., Челомбит С. В. Морфологические изменения и метаболические процессы, происходящие в вегетативных органах *Canna × hybrida hort. ex Backer* при поражении вирусными патогенами // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 120. – С. 62–68.
- Тевфик А. Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в культуре вегетативных почек *in vitro* // Труды Никитского ботанического сада. – 2012. – Т. 134. – С. 426–435.

Тевфик А. Ш., Митрофанова И. В., Кузьмина Т. Н. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2014а. – N 3(3). – С. 124–127.

Тевфик А. Ш., Митрофанова И. В., Кузьмина Т. Н. Особенности клонального микроразмножения канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) // Biotechnologia Acta. – 2014б. – Vol. 7, N 5. – С. 71–76.

Bhattacharya M., Sen A. Rapid *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. Indian Journal of Plant Physiology. – 2006. – Vol. 11, N 4. – P. 379–384.

Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Ann. Bot. – 2009. – Vol. 103. – P. 551–560. doi: 10.1093/aob/mcn125.

Flexas J., Bota J., Galmes J., Medrano H., Ribas-Carbó M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. Physiol Plant. – 2006 – Vol. 127. – P. 343–352. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00621.

Gloria B. A., Vieira M. L. C., Dornelas M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit // Pesq. agropec. bras., Brasília. – 1999. – Vol. 34, N 11. – P. 2007–2013.

José M.C.S., Cernadas M.J., Corredoira E. Histology of the regeneration of *Paulownia tomentosa* (Paulowniaceae) by organogenesis // Rev. Biol. Trop. – 2014. – Vol. 62 (2). – P. 809–818.

Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from Test Tubes: An introduction of Micropropagation, 4th edn Portland, OR, US: Timber Press, 2013. – 274 p.

Mitrofanova I. V., Brailko V. A., Kuzmina T. N. Some histological and physiological features of meristemoid formation in *Canna lily* (*Canna × hybrida hort.*) // Acta Hort. – 2017а. – N 1167. – P. 63–68 doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1167.9

Mitrofanova I., Brailko V., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O. Clonal micropropagation and some physiology aspects of essential oil roses valuable cultivars regeneration *in vitro* // Agriculture and Forestry (Poljoprivreda i sumarstvo). – 2016. – Vol. 62, N 4. – P. 73–81 doi: 10.17707/Agricult Forest.62.4.09

Mitrofanova I. V., Tefvik A.Sh., Mitrofanova O. V., Brailko V. A., Lesnikova-Sedoshenko N. P. Features of *Canna* regeneration *in vitro* and plantlets adaptation *in vivo* // Acta Hort. – 2017b. – N 1155. – P. 447–454 doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.66

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.

Saravitz C. H., Blazich F. A., Amerson H. V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of fraser fir // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1993. – Vol. 118 (1). – P. 163–167.

Spasić S. Z., Mitrović A. L. J., Janošević D., Budimir S. Estimation of meristemoid complexity during *Tacitus bellus in vitro* shoot organogenesis by 2D fractal analysis // Botanica Serbica. – 2015. – Vol. 39 (2). – P. 137–142.

StatSoft, Inc. (2013). Электронное статистическое пособие. Талса, ОК: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/>

Tefvik A. Sh., Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Brailko V. A. The biotechnology approaches of *Canna* (*Canna × hybrida hort.*) regenerants obtaining and its adaptation *in vivo* // Book of Abstracts 6<sup>th</sup> International ISHS symposium. Production and Establishment of Micropropagated Plants. (Sanremo, Italy, 19–24 April, 2015). – Sanremo: IRF, 2015. – P. 201.

**Tefvik A. Sh., Brailko V. A. The peculiarities of *Canna × hybrid hort. ex Backer* water regime at different culture conditions // Ekosystemy. 2017. Iss. 11 (41). P. 53–59.**

The main stages of garden canna clonal micropropagation: introduction in culture *in vitro* of vegetative buds, adventive shoot formation, meristemoids formation, microshoots and plantlets regeneration from meristemoids and following acclimatization *in vivo* are presented. Changes of the three canna cultivars (Suevia, Dar Vostoka and Livadia) water regime parameters depending on culture conditions (*in vitro*, *in vivo*, *ex situ*).

*Key words:* *Canna lily*, meristemoid, regeneration, water regime, *in vitro*, *in vivo*, *ex situ*.

Поступила в редакцию 30.10.2017