

organogenesis // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2012. – Vol. 108. – P. 55-62. doi: 10.1007/s11240-011-0011-y

16. Soliman H.I.A. *In Vitro* Regeneration and Genetic Transformation of Peach (*Prunus persica* L.) Plants // Life Science Journal. – 2013. – Vol. 10 (2). – P. 487-496.

17. Zhou H., Ming L., Zhao X., Fan X., Guo A. Plant regeneration from *in vitro* leaves of the peach rootstock 'Nemaguard' (*Prunus persica* x *P. davidiana*) // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. – 2010. – Vol. 101. – P. 79-87.

Статья поступила в редакцию 03.09.2016 г.

Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Dolgov S.V. Feature of some peach cultivars microshoots regeneration *in vitro* // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2016. – № 121. – P. 48-56.

Morphogenetic capacity of organs and tissues of 5 peach cultivars were studied for the development of peach regeneration system *in vitro*. It was demonstrated that aseptic culture is possible to obtain using 1% Thimerosal solution, 0.5% solution "Des TAB" and 0.4% cefotaxime solution. Techniques of microshoots regeneration from meristems and apexes of intensively growing shoots were developed. Explants regeneration frequency was increased in case of cultivation on nutrient medium with 0.5 – 1.5 mg/l BAP and 0.1 – 0.2 mg/l IBA.

Key words: *Prunus persica* (L.) Batsch; explant; culture medium; organ and tissue culture; growth regulators; morphogenesis.

УДК 582.548.25: 57.085.23

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO* СЕМЯН И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ *CANNA* × *HYBRIDA HORT. EX BACKER*

Арзы Шевкиевна Тевфик, Ирина Вячеславовна Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
tevfik.arzy@yandex.ru

Изучены особенности прорастания семян и формирования сеянцев *Canna* × *hybrida hort ex Backer* в условиях *in vivo* и *in vitro*. Показана эффективность метода эмбриокультуры. В условиях *in vitro* из зародышей, изолированных из семян канна садовой сортов Дар Востока и Ливадия от свободного опыления получены жизнеспособные растения.

Ключевые слова: канна садовая; эмбриокультура; прорастание *in vitro*

Введение

В настоящее время культура клеток, органов и тканей растений нередко используется в генетико-селекционной работе, что позволяет значительно ускорить получение новых форм и проводить исследования круглый год, при этом культивируемые растения занимают незначительные площади. Вместе с тем, семена некоторых видов растений имеют очень низкую частоту прорастания и недоразвитый зиготический зародыш. Одной из таких культур является канна садовая (*Canna* × *hybrida hort ex Backer*), для которой характерно длительное цветение, наличие больших декоративных листьев и высоких соцветий с крупными, оригинальными цветками [2].

Канна редко формирует полноценные семена. Зрелые семена канна имеют черную окраску и длительный период прорастания, отличаются очень твердой оболочкой. Для ускорения появления всходов нередко прибегают к предпосевной

обработке семян. Для этой культуры характерно подземное прорастание семян, которое начинается с удлинения узкой части зародыша, так называемой «шейки». Базальный конец зародыша вместе с корешком выталкивается через «зародышевую щель» из семенной кожуры. По данным М.А. Плиско главный корень рано останавливается в росте, образующиеся придаточные корни по структуре не отличаются от главного [8].

Целью данной работы было выявить пути морфогенеза, особенности прорастания семян и развития изолированных зародышей в культуре *in vitro* перспективных сортов канны садовой.

Объекты и методы исследования

В исследовании использовали 2 перспективных сорта канны садовой из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада (НБС): Дар Востока, Ливадия.

Исследования проводили на тепличном комплексе и в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС. В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые [1, 4] и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС [6].

В наших опытах по проращиванию *in vivo* были использованы следующие виды воздействия на семена канны: 1) погружение в раствор серной кислоты на 60, 120 мин; 2) холодовая обработка при 5°C в течение 1 суток и последующее выдерживание в горячей воде (100°C) в течение 10 сек (термическая обработка); 3) надрез семенной кожуры скальпелем (скарификация). После проведенной скарификации и стратификации семена канны высевали в перлит или стерильный почвенный субстрат.

Для введения в условия *in vitro* в качестве первичных эксплантов использовали изолированные зародыши, зрелые и недозрелые семена. Коробочки канны садовой обрабатывали 96% этанолом, обжигали в пламени спиртовки и извлекали семена. Зародыши помещали на питательную среду Монье [11] без регуляторов роста. Изолированные зародыши стратифицировали при температуре 5±1°C без освещения. Недоразвитые семена помещали на среду Мурасиге и Скуга [12]. Пробирки с семенами, проростки и растения культивировали климатической камере (Panasonic MLR-352-PE) при 24±1°C, 16 часовом фотопериоде при освещении холодным белым светом флуоресцентных ламп (Philips TL, 40 W) интенсивностью 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике [7]. Парафиновые срезы делали толщиной 12-15 мкм на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим [3]. Анализировали материал с помощью микроскопов “Jenaval” (Carl Zeiss, Германия) и AxioScopeA.1 (Zeiss, Германия) методом поляризационной и световой микроскопии. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s с применением программы AxioVisionRel. 4.8.2.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа [5].

Результаты и обсуждение

В процессе изучения всхожести семян *in vivo* было выявлено, что семена канны садовой сорта Ливадия (от свободного опыления) не прорастали как при применении предпосевной обработки семян, так и без нее. В таблице 1 представлены результаты по прорастанию семян канны садовой сорта Дар Востока после стратификации и скарификации.

Таблица 1

Частота прорастания (%) *in vivo* семян канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления в зависимости от применяемой предпосевной обработки и вида субстрата

Виды обработки семян	Вид субстрата	Продолжительность культивирования, сут					
		7	14	21	28	35	42
Без обработки	перлит	—*	15,4	23,1	38,5	38,5	38,5
	стерильный почвенный субстрат	—	7,7	15,4	23,1	38,5	38,5
Скарификация скальпелем	перлит	7,7	23,1	30,7	46,2	46,2	46,2
	стерильный почвенный субстрат	—	—	15,4	23,1	30,7	30,7
Обработка серной кислотой (60 мин)	перлит	—	15,4	23,1	23,1	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Обработка серной кислотой (120 мин)	перлит	—	7,7	15,4	15,4	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Термическая обработка	перлит	—	—	—	—	—	—
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—

* - прорастание не отмечали

При посеве в перлит семян канны сорта Дар Востока, которые предварительно подвергали скарификации скальпелем, первые всходы начинали появляться на 7 сут культивирования (рис. 1). Спустя 28 сут культивирования частота прорастания семян составила 46,2%. Наряду с этим, на данный срок культивирования при высевании этих же семян в стерильный почвенный субстрат количество проросших семян было в 2 раза меньше (23,1%).

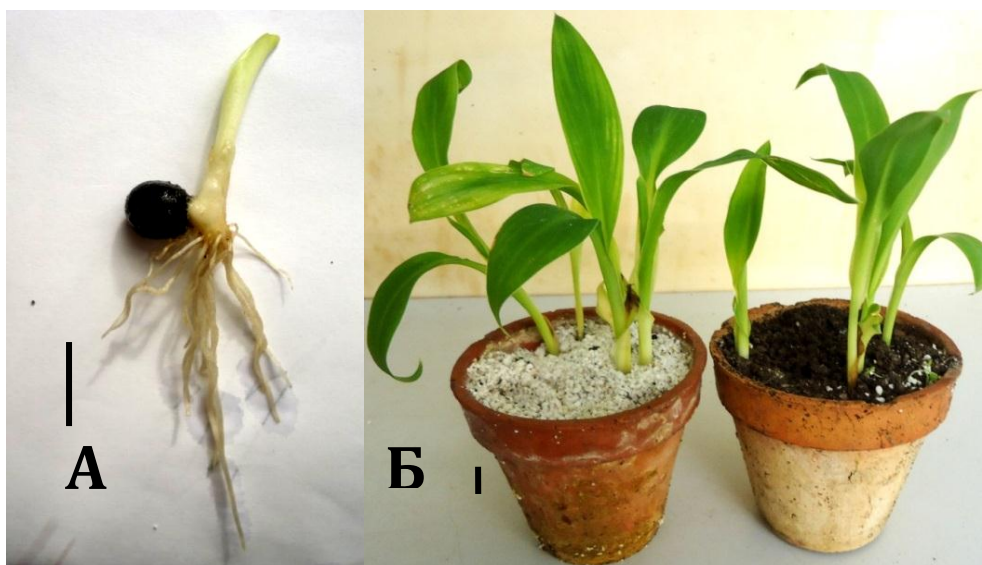


Рис. 1 Проросшие семена канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления после скарификации: А) на 7 сут культивирования *in vivo*; Б) на 35 сут культивирования *in vivo* в разных субстратах

Исследования показали, что семена, высаженные без предпосевной обработки, и семена, обработанные серной кислотой, начали всходить на 14 сут культивирования. Однако, при дальнейшем культивировании *in vivo* у семян после обработки серной кислотой в течение 60 мин отмечали низкую частоту прорастания семян (23,1%). Вместе с тем, высаженные аналогичные семена в почвенный субстрат не прорастали и инфицировались. Наряду с этим, семена без обработки имели высокую частоту прорастания как при посеве в перлит, так и в почвенный субстрат (38,5%). Также было выявлено, что семена канны садовой сорта Дар Востока после термической обработки не всходили.

В условиях *in vitro* при использовании в качестве эксплантов недозрелые и зрелые семена, в случае с незрелыми семенами размером 0,1-0,2 см на 14 сут культивирования они теряли жизнеспособность. При этом, на питательной среде Монье было получено большее количество жизнеспособных эксплантов. Так, у сорта Дар Востока в условиях низкой положительной температуры отмечена жизнеспособность недозрелых семян на питательной среде Монье на уровне 80%, а на среде Мурасиге и Скуга – 34%.

Наши исследования показали, что жизнеспособность эксплантов (семян) канны садовой зависит от их степени зрелости, размера, условий культивирования и состава питательной среды. Так, все крупные семена у сорта Дар Востока на 14-е сут культивирования оказались жизнеспособными (рис. 2). При этом у сортов Дар Востока и Ливадия количество жизнеспособных семян на среде Монье не превышало 50 и 17% соответственно (табл. 2) После перенесения на свет на 7 сут культивирования на питательной среде Монье семена изменили окраску от бежевой до зеленой.

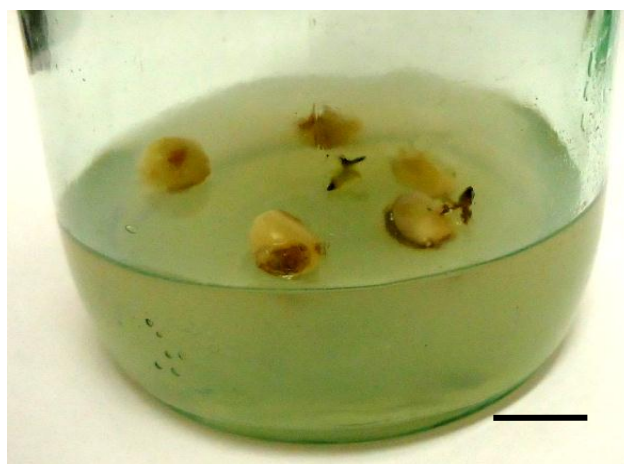


Рис. 2 Культивирование недозрелых семян канны садовой сорта Дар Востока от свободного опыления в условиях *in vitro* (масштаб 1 мм)

Таблица 2

Влияние условий культивирования (состава питательной среды, продолжительности культивирования, стратификации) на жизнеспособность (%) недозрелых семян 2-х сортов канны садовой

Генотип	Питательная среда			
	Монье		Мурасиге Скуга	
	на 7-е сут	на 14-е сут	на 7-е сут	на 14-е сут
Дар Востока	80±7,8	50±4,3	34±4,1	11±0,9
Ливадия	75±6,2	17±2,1	50±4,3	33±4,1

Недозрелые семена, помещенные на питательную среду МС и перенесенные на свет на 7-е сут культивирования не поменяли окраску. Наряду с этим, изменение окраски от бежевой до зеленой на 23 сут культивирования. В дальнейшем происходило потемнение и постепенное отмирание эксплантов.

Предварительная стратификация в течение 30 сут изолированных зародышей сорта Дар Востока обеспечила увеличение их длины и ширины в 2-3 раза. Вместе с тем, отмечали активное корнеобразование (в среднем $11,33 \pm 0,41$ корней/эксплант) и появление листьев (в среднем $2,5 \pm 0,33$ шт./эксплант). Через 60 сут культивирования в условиях стратификации пробирки с изолированными зародышами переносили в стандартные условия культивирования, где на 35-е сут на свету формировались полноценные проростки, пригодные к высадке в условия *in vivo*.

При культивировании при 5°C изолированных зародышей сорта Ливадия на поверхности этого зародыша отмечали формирование глобулярных структур. При переносе в стандартные условия культивирования их количество увеличивалось. Однако, при более длительном культивировании (более 60 сут) наблюдали потемнение и постепенное отмирание глобулярных структур [9]. Возможно, для регенерации микропобегов из полученных структур необходим более тщательный подбор регуляторов роста и физических факторов культивирования. При этом результаты экспериментов показали, что из изолированного зародыша сорта Ливадия при перенесении в стандартные условия культивирования, наряду с формированием глобулярных структур происходило развитие полноценных проростков (рис. 3). В ходе опытов было выявлено, что изолированные зародыши сорта Ливадия обладали низкой частотой прорастания (50%) по сравнению с сортом Дар Востока (100%).

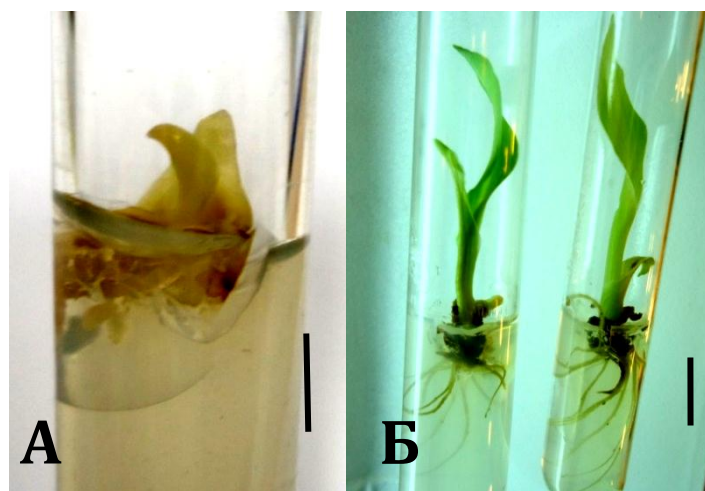


Рис. 3 Развитие зародышей сорта Ливадия при культивировании в стандартных условиях: А) на 5 сут; Б) на 20 сут

Проведенные гистологические исследования методом поляризационной микроскопии тканей семядоли зародышей сортов Дар Востока и Ливадия (культивируемых в условиях стратификации) показали, что они содержали большое количество крахмальных зерен (рис. 4).

Наряду с этим методом световой микроскопии удалось впервые выявить месторасположение и сам факт формирования соматического зародыша в тканях семядоли изолированного зародыша сорта Дар Востока, о чем сообщалось в ранее опубликованной нами работе [10].

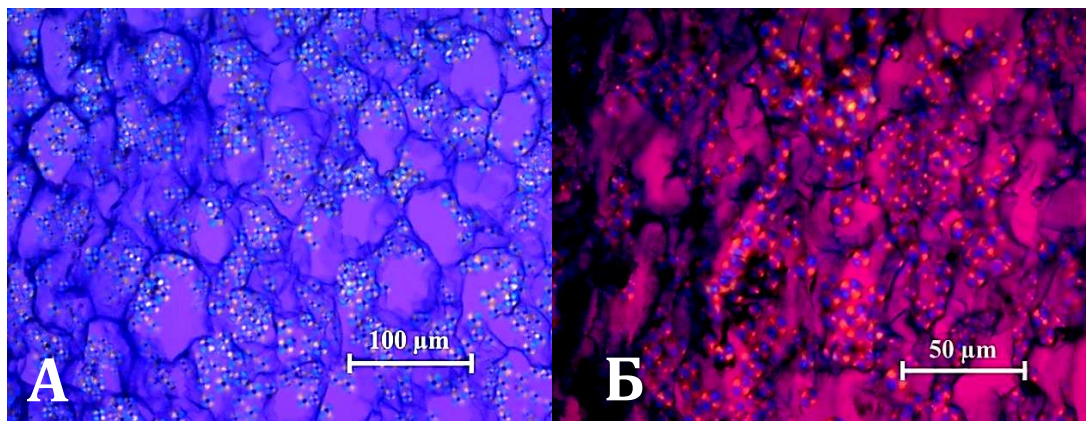


Рис. 4 Фрагменты паренхимных клеток семядолей, содержащих крахмальные зерна у изолированных зародышей канны садовой сортов Ливадия (А) и Дар Востока (Б)

Выводы

Таким образом установлено, что скарификация и высев семян канны садовой сорта Дар Востока в перлит способствуют их прорастанию в условиях *in vivo*. При этом через 28 сут культивирования частота прорастания семян составила 46,2%.

Отмечено, что после стратификации зародышей, изолированных из семян сорта Дар Востока от свободного опыления, в условиях *in vitro* на 35-е сут культивирования формировались полноценные проростки. При этом проростки имели хорошо развитые корни (в среднем до 11 шт./эксплант) и 2-3 развернувшихся листа. Частота прорастания у таких зародышей составила 100%. В отличие от сорта Дар Востока у сорта Ливадия эти показатели оказались значительно ниже.

Разработанный нами способ получения проростков из семян в условиях *in vitro* представлять особый интерес для последующей селекционной работы с культурой канны садовой.

В результате гистологических исследований показано наличие большого количества крахмальных зерен в тканях зародыша. Подтверждена возможность реализации морфогенеза, через соматический эмбриогенез.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Дашкеев Е.А. Канны в Молдавии. – Кишинев: «Штиица». – 1975. – 65 с.
3. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 2000. – Т. 85, №6. – С. 168–171.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Кушнир Г.П. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
5. Лакин Г.В. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур – К.: «Аграрна наука», 2011. – 344 с.

7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. / З.П. Паушева – М.: Колос, 1970. – 255 с.
8. Плиско М.А. Семейство Cannaceae / Сравнительная анатомия семян. Том 1 / под ред. А.Л. Тахтаджяна. — Л.: «Наука», 1985. — С. 227-230.
9. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Изучение регенерационной способности зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. Серия «Биология, химия». — 2014. — Т. 27 (66), № 2. — С. 157-164.
10. Тевфик А.Ш., Митрофанова И. В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Введение в культуру *in vitro* изолированных зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. Международной научно-практической конференции. 13-15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь. — Минск: Изд. Центр БГУ, 2013. — С. 198.
11. Monnier M. Croissance et developement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. — 1973. — P. 179-194.
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.

Статья поступила в редакцию 03.09.2016 г.

Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V. Some special features of seeds and isolated embryos of *Canna × hybrida hort.* ex Backer cultivation *in vitro* and *in vivo* // Bull. Nikit. Botan. Gard. — 2016. — №. 121 — P. 56-62.

The special features of *in vitro* and *in vivo* seed germination and seedling formation of *Canna × hybrida hort.* ex Backer were studied in course of this research. At the same time efficiency of embryo culture method was demonstrated. The viable canna plants of Dar Vostoka and Livadia cultivars were obtained from isolated embryos during *in vitro* cultivation.

Key words: garden canna; embryo culture; germination *in vitro*.

УДК 581.527.4:57.085.2

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ РЕЛИКТОВЫХ ЭНДЕМИКОВ ФЛОРЫ ГОРНОГО КРЫМА

**Ирина Вячеславовна Митрофанова, Ольга Владимировна Митрофанова,
Александр Ростиславович Никифоров, Нина Павловна Лесникова-Седошенко,
Наталия Николаевна Иванова, Светлана Викторовна Челомбит,
Ирина Васильевна Жданова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, 52
invitro_plant@mail.ru

Впервые начаты биотехнологические исследования особенностей развития 8 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма в условиях *in vitro*. Приведены данные по изучению влияния воздействия стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и плодов и получению асептической культуры исследуемых видов. Показана возможность образования проростков на питательных средах Monnier (1973) и Murashige, Skoog (1962).

Ключевые слова: редкие виды, культура органов и тканей; питательные среды; регенерация микропобегов.