

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ / PHYSICAL-CHEMICAL AND GENERAL BIOLOGY

Оригинальная статья / Original article

УДК 582.548.25: 57.085.23

DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ CANNA × HYBRIDA HORT. EX BACKER В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

© А.Ш. Тевфик^{*,**}, И.В. Митрофанова^{**}

*Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
Российская Федерация, 295493, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150.

**Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН,
Российская Федерация, 298648, Республика Крым, г. Ялта, ул. Никитский спуск, 52.

Целью исследования было изучение путей морфогенеза, особенностей регенерации различных эксплантов в культуре *in vitro* и разработка биотехнологических приёмов микроразмножения и сохранения перспективных сортов канны садовой. Эксперименты проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского Ботанического Сада – Национального Научного Центра. Для индукции адвентивного побегообразования эксплантов использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 10 г/л агар-агара с регуляторами роста БАП и ТДЗ. Для депонирования *in vitro* экспланты (вегетативные почки и меристемойды) помещали на модифицированную нами среду МС с 60 г/л сахарозы и 0,2–0,4 г/л ССС. Культуральные сосуды с эксплантами переносили в холодильные камеры с низкой позитивной температурой (2 - 6°C) и освещённостью 0,1–0,5 клк. Установлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Дар Востока и Суевия необходимо добавление в питательную среду МС 1,27 мг/л ТДЗ, для сорта Ливадия – 1,91 мг/л ТДЗ. Показано, что для депонирования меристемойдов сортов Дар Востока, Ливадия и Суевия оптимальной является питательная среда ½ МС с 0,15–0,25 г/л ССС; для адвентивных побегов сорта Суевия — ½ МС с 0,2 г/л ССС.

Ключевые слова: канна садовая, микроразмножение, *in vitro*, меристемойд, депонирование.

Формат цитирования: Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Особенности получения и сохранения *Canna × hybrida hort ex Backer* в условиях *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, N 3. С. 99–109. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109

IN VITRO DERIVATION AND STORAGE CHARACTERISTICS OF CANNA × HYBRIDA HORT. EX BACKER

© A.Sh.Tevfik^{*,**}, I.V. Mitrofanova^{**}

*Research Institute of Agriculture of Crimea,
150 Kievskaya str., Simferopol, 295493, Crimea Republic, Russian Federation,

**Order of the Red Banner Nikita Botanical Gardens - National Scientific Center RAS
52, Nikitsky Spusk St., Nikita, Yalta, Crimea Republic, 298648, Russian Federation

The aim of the study was to investigate means of morphogenesis and explant regeneration characteristics in *in vitro* culture and to develop biotechnological methods for micropropagation and conservation of promising garden varieties of *Canna*. The experiments were conducted in the plant biotechnology and virology laboratory of the Nikitsky Botanical Garden, National Centre of Science. For the induction of adventitious shoot development of explants, a Murashige and Skoog (MS) nutrient medium was used having 30 g / l of sucrose, 10 g / l of agar-agar with BAP and TDZ growth regulators. For the *in vitro* deposition, explants (vegetative buds and meristemoids) were placed on a modified MS medium having 60 g / l of sucrose and 0.2-0.4 g / l of CCC. The culture vessels with explants were transferred to cooling chambers with a low positive temperature (2-6 ° C) and an illumination of 0.1-0.5 klx. It was found that for active adventitious shoot formation during

cultivation of *Dar Vostoka* and *Suevia* explant varieties, it is necessary to add 1.27 mg / l of TDZ to the MS nutrient medium, and 1.91 mg / l of TDZ for the *Livadia* variety. It is shown that for the deposition of meristems of *Dar Vostoka*, *Livadia* and *Suevia* varieties, the nutrient medium of ½ MS with 0.15-0.25 g / l of CCC is optimal; for adventitious shoots of the *Suevia* variety, the optimal nutrient was ½ MS with 0.2 g / l of CCC.
Key words: garden canna, micropropagation, in vitro, meristemoid, conservation

For citation: Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V. In vitro derivation and storage characteristics of *Canna* × *Hybrida* hort. ex backer. *Izvestia Vuzov. Prikladnaya Chimia I Biotechnologia* [Proceedings of Universitets. Applied chemistry and biotechnology]. 2017, vol. 7, no. 3, pp. 99–109. (in Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109

ВВЕДЕНИЕ

Канна садовая (*Canna* × *hybrida* hort ex Backer) – декоративно-лиственная культура, имеющая высокие соцветия с крупными, оригинальными цветками и очередные крупные широкоовальные листья. Эта культура имеет длительное цветение и хорошо переносит низкую влажность воздуха, что является особенно актуальным для Южного берега Крыма [2]. В последние годы на канне обнаружены целый ряд фитопатогенов, среди которых патогены вирусной природы занимают особое место [4]. В связи с этим необходимо отбирать здоровый материал для вегетативного размножения данной культуры.

Биотехнологические методы в комплексе с хемо- и термотерапией позволяют оздоровить декоративные, плодовые и лекарственные растения, затем размножить их в достаточном количестве [3, 8, 21, 22]. Вместе с тем одной из важнейших проблем современности является сохранение биоразнообразия. Наряду с сохранением *ex situ* и *in situ*, активно применяются методы депонирования растений в условиях *in vitro* и криосохранение. Биотехнологические подходы для сохранения *in vitro* растений активно разрабатываются как для дикорастущих, так и для культурных растений [6, 9–11, 15, 17, 18, 23, 26]. Однако каждый вид, сорт и форма требуют разработки конкретного для него подходящего способа депонирования, который включает целый ряд этапов [6].

В лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада исследовались различные вопросы, касающиеся реализации морфогенетического потенциала органов и тканей канны садовой: особенности введения в культуру *in vitro*; влияние стерилизации на дальнейшее развитие эксплантов; изучение регенерационного потенциала вегетативных почек [13, 14], разработка метода эмбриокультуры [12].

Цель данного исследования – выявить пути морфогенеза, особенности регенерации различных эксплантов в культуре *in vitro* и разработать биотехнологические приёмы микро-

размножения и сохранения перспективных сортов канны садовой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании 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* и *Ливадия*) и группы орхидеевидных: 1 сорт зарубежной селекции (*Суевия*).

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ. В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые [1, 5] и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС [6]. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки.

Для стерилизации растительного материала использовали 2 схемы ступенчатой стерилизации с применением таких антисептиков как этанол (Септол, Украина), коммерческий препарат Domestos (Великобритания), коммерческий препарат ДезТаб (КНР), Thimerosal (Merk, Германия) с разной экспозицией.

Вегетативные почки помещали на модифицированную питательную среду Murashige, Skoog (МС) [24] с 3,0 % сахарозы, 1,0 % агар-агара (агар-агар «D19» (E406), «Hispanagar S.A.», Испания). Для инициации развития эксплантов в питательную среду МС добавляли 6-бензиламинопуридин (БАП, Sigma, США) и гибберелловую кислоту (ГК₃, Sigma, США). Экспланты предварительно оздоравливали с помощью хемотерапии *in vitro*, используя вирозал (рибавирин, Sigma, США) в концентрации 5 мг/л и амиксин (Украина) – 4 мг/л. На этапах индукции адвентивного побегообразования и собственно микроразмножения использовали вещества цитокининового (БАП, тидиазурон (ТДЗ)) и ауксинового (индолилуксусную кислоту (ИУК)) типов действия. В качестве базовых сред использовали МС и Woody Plant Medium (WPM) [20]. Все манипуляции с эксплантами осуществляли в ламинарных боксах. Экспланты помещали в культуральную комнату с температурой 24±1 °С, 16-часовым фотопериодом

Таблица 1

Бонитировка растений по внешним признакам после длительного хранения по 4-бальной шкале

Table 1

Bonitation of plants in outward sign after long-term storage by four-point scale

Балл	Характеристика
1	Материал уже погиб или инфицирован
2	Материал очень поврежденный, много листьев потемнело
3	Материал частично поврежденный, 2/3 листьев зеленых
4	Материал неповрежденный, допускается 1 бурый лист

и освещенностью 2–3 клк. Опыты проводили трижды в десятикратной повторности, определяли среднее, отклонение от среднего, подсчитывая количество образовавшихся меристематидов и микропобегов.

Увеличение продолжительности беспересадочного хранения эксплантов канны (адвентивные побеги и меристематиды, образовавшиеся в основании микропобегов в стандартных условиях *in vitro*) достигали при помощи культивирования в условиях низких положительной температуры (2–6 °С) и освещенности 0,1–0,5 клк. В качестве питательной среды нами была использована среда ½ МС, дополненная осмотиком (60 г/л сахарозы) и ингибитором роста (ретардант - хлорхолинхлорид (ССС) в концентрации 0,15–0,4 г/л). Контролем служила питательная среда, на которой экспланты культивировали до закладки на депонирование. После переноса эксплантов на среду для депонирования в генобанке *in vitro* их помещали в холодильные камеры (Liebherr FKv 4143, Германия). Состояние растительного материала оценивали через каждые 30 сут культивирования с помощью бонитировочной шкалы (табл. 1) [7, 23].

Кроме бонитировки оценивали материал по таким показателям:

- длина микропобега, длина меристематиды;
- количество образовавшихся меристематидов;
- жизнеспособность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

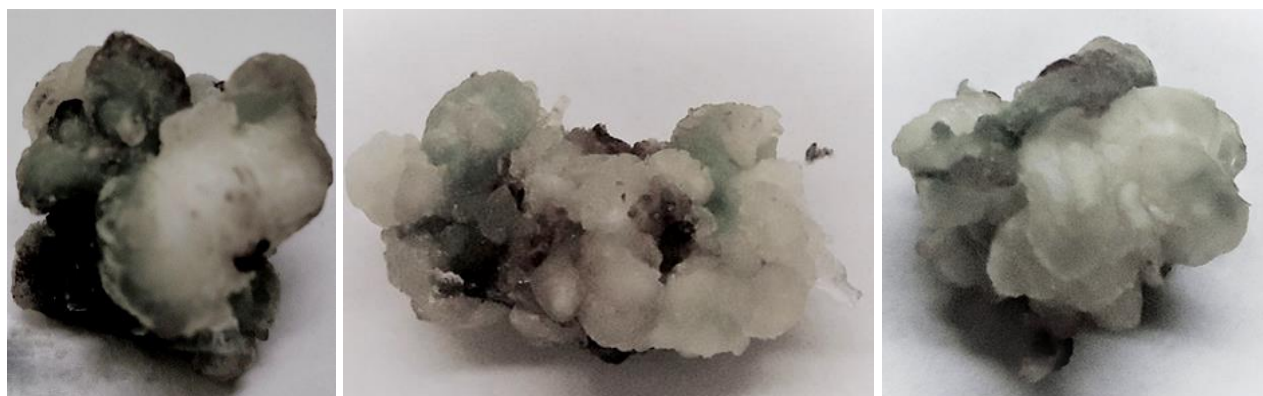
В результате ранее проводившихся нами исследований установлено влияние типа и концентрации регуляторов роста на регенерационный потенциал эксплантов канны садовой. Так, применение питательной среды МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК индуцировало появление до 2 дополнительных побегов на эксплант в основании микропобегов сорта Суевия [13, 14]. Однако у остальных изучаемых сортов адвентивного побегооб-

разования не отмечали. Низкая концентрация тидиазурона (0,64 мг/л) не способствовала образованию адвентивных структур в культуре вегетативных почек исследуемых сортов. Выявлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Дар Востока и Суевия необходимо добавление в питательную среду МС 1,27 мг/л ТДЗ, для сорта Ливадия – 1,91 мг/л ТДЗ.

Особое внимание заслуживает тот факт, что продолжительное культивирование эксплантов сортов Суевия (рис. 1, а), и Ливадия (рис. 1, б) и Дар Востока (рис. 1, в) приводило к образованию в основании микропобегов меристематидов. В зарубежных публикациях, касающихся вида канны *Canna edulis* Ker Gawl. наряду с меристематидами встречается и другое название – протокормоподобные структуры [25].

Исследуя влияние различных концентраций ТДЗ, сроков культивирования у изучаемых сортов удалось выявить максимальный эффект регенерации при адвентивном побегообразовании, что обеспечивало формирование наибольшего количества меристематидов на эксплант (рис. 2).

Необходимо отметить, что после перенесения меристематидов канны садовой, культивируемых на питательной среде, содержащей ТДЗ, на безгормональную питательную среду МС индуцировался процесс образования новых меристематидов. Так, в основании меристематидов сорта Суевия на 40-е сут культивирования формировалось до 4 дополнительных меристематидов на эксплант. Вместе с тем, образовавшиеся меристематиды имели преимущественно бежевую окраску и были крупнее (длиной 0,5–0,6 см), по сравнению с полученными на питательной среде МС с ТДЗ (длиной 0,2–0,5 см). Однако, длительное культивирование не приводило к образованию новых меристематидов. Наряду с этим, культивирование меристематидов сорта Ливадия на безгормональной питательной среде МС способствовало образованию на 60-е сут культивирования



а (a)

б (b)

в (c)

Рис. 1. Меристемойды канны садовой: а – сорта Суевия; б – сорта Ливадия; в – сорта Дар Востока (масштаб 1 см)

Fig. 1. Meristemoids of canna: a – cvs. Suevia; b – cvs. Livadia; c – cvs. Dar Vostoka (scale 1 cm)

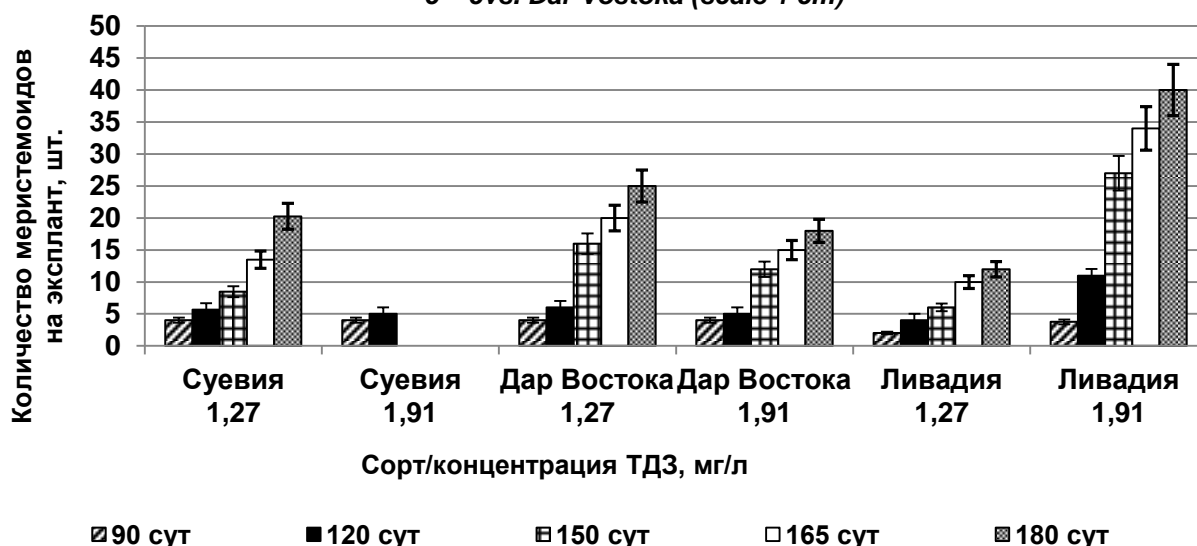


Рис. 2. Влияние концентрации тидиазурина на количество образовавшихся меристемойдов на эксплант у 3 сортов канны садовой при разных сроках культивирования

Fig. 2. Influence of 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea concentration on canna meristemoids formation at different time of cultivation

до 12 меристемойдов на эксплант. Дальнейшее их культивирование на данной среде индуцировало образование новых меристемойдов.

Для активизации регенерационных процессов меристемойды помещали на ряд питательных сред: МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; МС с 2,0–4,0 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃; WPM с 0,75 мг/л БАП. Исследования показали, что увеличение регенерационной способности меристемойдов и количества образовавшихся из них вегетативных почек зависело от длитель-

ности культивирования и частоты пассажей.

В ходе экспериментов наблюдали увеличение длины меристемойдов канны сортов Суевия и Ливадия, из которых развивались вегетативные почки. При переносе на свежеприготовленную питательную среду через 7 сут культивирования отмечали индукцию адвентивного побегообразования (рис. 3). Вместе с тем, для сорта Ливадия было характерным формирование адвентивных побегов с последующим корнеобразованием.

Полученные из меристемойдов микропо-

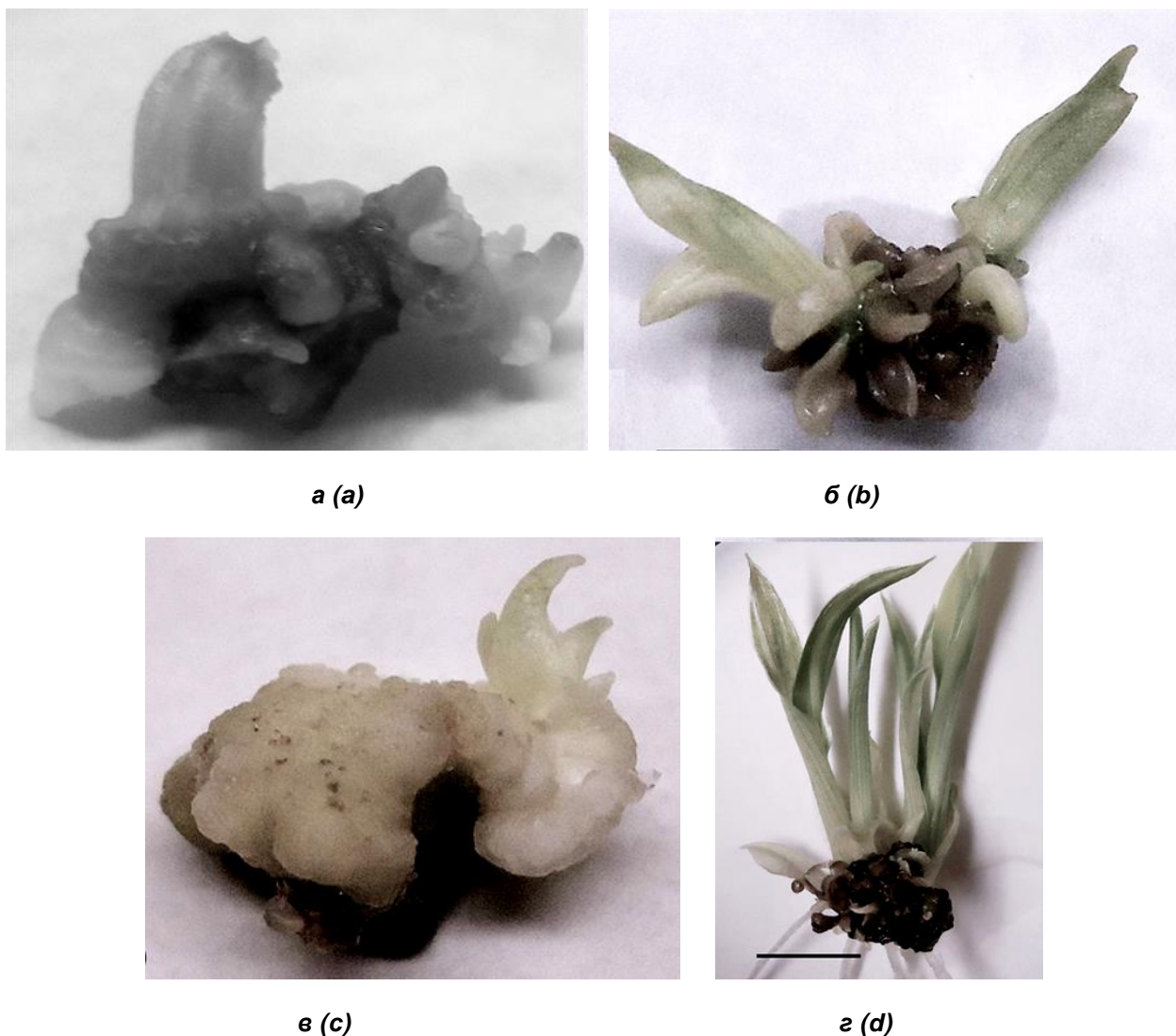


Рис. 3. Регенерация *in vitro* канны: а – вегетативные почки, развивающиеся из меристемоеидов ‘Ливадия’; б – адвентивное побегообразование у сорта Ливадия; в – вегетативные почки, развивающиеся из меристемоеидов ‘Суевия’; г – адвентивное побегообразование у сорта Суевия (масштаб 1 см)

Fig. 3. *In vitro* regeneration of canna: a – vegetative buds forming for Livadia meristemoids; b – adventitious strand formation for Livadia variety; c – vegetative buds forming for Suevia meristemoids; d – adventitious strand formation for Suevia variety (scale 1 cm)

беги обладали высоким морфогенетическим ответом и были способны формировать адвентивные микропобеги (100%) по сравнению с введенными в условия *in vitro* вегетативными почками. Необходимо отметить, что, при использовании первичных эксплантов вегетативных почек интактного растения, количество образовавшихся адвентивных микропобегов не превышало 2 шт./эксплант. Используя, полученные нами, меристемоеиды удалось значительно повысить коэффициент размножения. Эти данные представлены в табл. 2.

Исследования показали, что в основании микропобегов, полученных из меристемоеидов сорта Ливадия и Суевия на 40 сут культивирования образовалось до 4,0 и 4,8 адвентивных побегов на эксплант соответственно.

При хранении растительных коллекций *in vitro* в стандартных условиях выращивания растений (при температуре 24 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2–3 клк), существует необходимость частого субкультивирования эксплантов на свежеприготовленную питательную среду, что кроме повышения час-

Таблица 2

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

Table 2

Influence of genotype and medium composition on the number of formed adventitious microstrands to explant, piece

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

Таблица 3

Состояние эксплантов канны садовой в зависимости от концентрации CCC в питательной среде ½ МС (бонитировка по внешнему признаку по 4-бальной шкале, представленной в экспериментальной части)

Table 3

Condition of canna explants according to CCC concentration in nutrient medium ½ MS (Bonitation of plants in outward sign by four-point scale given in Table 1)

Генотип	Тип экспланта	Концентрация CCC, г/л	Продолжительность культивирования, месяц						
			1	2	3	4	5	6	7
Дар Востока	адвентивный побег	0,2	4	3	2	2	1	–*	–
		0,4	4	3	2	2	1	–	–
	меристемоид	Контроль (МС+1,5 мг/л БАП+1,5 мг/л ИУК)	4	4	4	3	2	1	–
		0,15	4	4	4	3	3	2	1
		0,2	4	4	4	3	3	3	3
		0,25	4	4	4	3	3	2	1
0,3	4	4	3	2	1	–	–		
Ливадия	меристемоид	контроль (МС+1,27 мг/л ТДЗ)	4	4	4	2	1	–	–
		0,15	4	4	4	4	3	–	–
		0,2	4	4	4	4	3	3	3
		0,25	4	4	4	4	3	3	2
		0,3	4	4	4	2	1	–	–
		0,4	3	2	2	2	1	–	–
Суевия	адвентивный побег	0,2	4	4	4	4	4	3	3
		0,4	4	3	2	1	–	–	–
	меристемоид	контроль (МС б/г)	4	4	4	3	2	1	–
		0,15	4	4	4	4	3	3	3
		0,2	4	4	4	3	3	3	3
		0,25	4	4	4	4	3	2	2
0,3	4	4	4	3	1	–	–		

*– отсутствие жизнеспособных эксплантов.

тоты контаминации, может вызвать активное деление клеток и способствовать возникновению соматональной изменчивости. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений [16–19]. Преимуществами медленно-растущей коллекции растений *in vitro* являются: возможность значительно сократить занимаемую площадь; асептическое сохранение и облегчение дальнейшего размножения безвирусного материала; значительное сокращение затрат [5, 11, 14].

На депонирование в условия *in vitro* (1–7 мес культивирования) были помещены адвентивные побеги и меристематиды сортов Дар Востока, Ливадия и Суевия. Результаты, представленные в табл. 3, демонстрируют предварительную оценку жизнеспособности эксплантов (бонитировку по 4-балльной шкале).

Так, в процессе исследований было показано, что при длительном культивировании всех изучаемых сортов канны садовой при низких положительных температурах ясно прослеживается тенденция снижения жизнеспособности при увеличении срока депонирования, а также снижение жизнеспособности при повышении концентрации ССС в питательной среде. Установлено, что для поддержания жизнеспособности меристематидов в условиях

генобанка *in vitro* оптимальной концентрацией ССС является 0,15–0,25 г/л. Вместе с тем, при культивировании меристематидов канны садовой на контрольной среде без осмотика и ретарданта в условиях пониженной температуры отмечали снижение жизнеспособности на 4-ый месяц культивирования у всех изучаемых сортов.

Наряду с этим было выявлено, что адвентивные побеги канны исследуемых сортов при депонировании, имели разные показатели жизнеспособности. Так, экспланты сорта Дар Востока начинали темнеть уже через 2 мес культивирования на питательной среде с 0,2 и 0,4 г/л ССС. Вместе с тем, при культивировании в условиях замедления развития адвентивные побеги сорта Суевия сохраняли жизнеспособность на питательной среде с 0,2 г/л ССС до 6 мес депонирования. Однако при повышении концентрации ретарданта до 0,4 г/л отмечали снижение жизнеспособности уже после 2 мес культивирования.

Вместе с тем было выявлено, что при добавлении веществ, замедляющих развитие эксплантов (повышенной концентрации сахаразы и ССС), через 3 мес депонирования в основании меристематидов изучаемых сортов канны садовой формировались новые меристематиды (табл. 4).

Сравнительное изучение влияния концен-

Таблица 4

**Влияние концентрации ССС на образование меристематидов
через 3 мес депонирования**

Table 4

Influence of CCC concentration on meristemoids formation after 3 months of deposition

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

*установлено достоверное различие с уровнем значимости $P < 0,095$.

трации ССС на развитие эксплантов в условиях депонирования показало, что повышение концентрации ретарданта в питательной среде приводило к снижению частоты образования меристематических сортов Ливадия. Так, на контрольной среде сформировалось в среднем 1,75 меристематических сортов на эксплант, при добавлении 0,2–0,25 г/л ССС этот показатель снизился до 0,75 шт./эксплант.

Вместе с тем, при культивировании эксплантов сорта Дар Востока образование дополнительных меристематических структур отмечали только на среде с 0,25 г/л ССС. В ходе экспериментов было отмечено, что депонирование меристематических сортов Суевия на средах с низкими концентрациями ССС (0,15–0,25 г/л) способствовало активизации образования меристематических сортов на эксплант (2–2,75 шт.) по сравнению с контролем (1,75 шт.). Наряду с этим, с повышением концентрации ССС от 0,15 до 0,25 г/л в среде увеличивалась длина меристематических сортов от 0,45 до 0,6 см.

Показано, что использование питательной среды с 0,3–0,4 г/л ССС ингибировало развитие новых меристематических сортов и рост имеющихся эксплантов у всех изучаемых нами сортов канн. Более длительный срок депонирования снижал регенерационную способность мери-

стематических канн у всех исследуемых сортов. Возможно, необходимо повышать значение температуры при продолжительном сохранении растительных объектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, определены оптимальные концентрации ТДЗ на этапе собственно микро-размножения канн сортов Дар Востока и Суевия (1,27 мг/л), и для сорта Ливадия (1,91 мг/л).

Результаты наших исследований продемонстрировали возможность депонирования меристематических сортов и адвентивных побегов 3 сортов канн садовой: Суевия, Ливадия и Дар Востока на протяжении 7 месяцев в беспересадочной культуре, тем самым полностью исключив субкультивирование. Проведенные эксперименты выявили способность меристематических сортов сохранять жизнеспособность и образовывать новые меристематические сорты в условиях низкой положительной температуры на среде 1/2 МС с добавлением 0,15–0,25 г/л ССС и 60 г/л сахарозы. Однако для успешного депонирования адвентивных побегов сорта Суевия необходимо добавление в питательную среду 0,2 г/л ССС.

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Дашкеев Е.А. Канн в Молдавии. Кишинев: Штиинца, 1975. 65 с.
3. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние хемотерапии на морфогенетический потенциал эксплантов лаванды в культуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2016. N 1. С. 9-19.
4. Закубанский А.В., Чирков С.Н., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Вирусы некоторых ценных плодовых, эфиромасличных и декоративных культур (обзор) // Бюллетень ГНБС. 2016. Вып. 121. С. 7–18. [http://bult.nbgnsr.ru/download/121\(2\)/1-121-2016.pdf](http://bult.nbgnsr.ru/download/121(2)/1-121-2016.pdf)
5. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.
6. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
7. Митрофанова И.В., Иванова Н.М., Митрофанова О.В., Ежов В.М. Спосіб депонування в умовах *in vitro* плодівих і декоративних культур. Ялта: НБС-ННЦ, 2010. 36 с.
8. 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.
9. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и устойчивого воспроизводства генофонда растений в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. 2015. Т. 25, вып. 2. С. 95–100.
10. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12, N 4. С. 564–572.
11. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Карашолакова Л.Н., Аралбаева М.М., Рахимбаев И.Р., Кушнаренко С.В. Создание коллекции *in vitro* дикорастущих видов *Berberis* sp. // Бюллетень ГНБС. Вып. 121. С. 69–76.

12. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Некоторые особенности культивирования *in vitro* и *in vivo* семян и изолированных зародышей *Canna × hybrida hort. ex Backer* // Бюллетень ГНБС. 2016. N 121. С. 143–147.

13. 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. 2014. N 3 (3). С. 124–127.

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

15. Belokurova V.B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review) // Cytology and Genetics. 2010. V. 44, N 3. P. 174–185.

16. Brown D.C.W., Thorpe T.A. Crop improvement through tissue culture // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1995. V. 11. P. 409–415.

17. Cruz-Cruz C.A., González-Arno M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. 2013. V. 2. P. 73–95. DOI:10.3390/resources2020073

18. Engelmann F. *In vitro* conservation methods // Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use / Eds. Ford-Lloyd B.V., Newbury J.H., Carrow J.A. UK: Wallingford: CAB International, 1997. P. 119–162.

19. Malaurie B. Medium-and Long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops // Acta Horticulturae. 2001. V. 560. P. 69–77.

20. McCown B.H., Lloyd G. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // Hort Science. 1981. V. 16. P. 453–453.

21. Milošević S., Cingel A., Jevremović S., Stanković I., Bulajić A., Krstić B., Subotić A. Virus Elimination from Ornamental Plants Using *in vitro* Culture Techniques // Pestic. Phytomed. (Belgrade). 2012. V. 27, N 3. P. 203–211.

22. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina E.L., Chirkov S.N. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanical Gardens and biotechnology of fig plants regeneration // Acta Horticulturae. 2016. N 1139. P. 303–310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.53

23. Mitrofanova I.V., Movchan O.P., Shishkin V.A., Mitrofanov V.I. Gene-pool collection *in vitro* in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center // Bull. of the State Nikita Botanical Garden. 2002. N 85. P. 30–33.

24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15, N 3. P. 473–497.

25. Sakai T., Imai K. The influences of growth regulators and culture medium composition on shoot-tip cultures of edible canna // Environ. Control Biol. 2007. V. 45 (3). P. 155–163.

26. Thammasiri K. Conservation of Thai orchid species using cryobiotechnology // Bull. of the State Nikita Botanical Garden. 2016. N 120. P. 7–16.

27. Withers L.A., Engels J.M.M. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation // IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific. 1990. N 3. P. 1–2.

REFERENCES

1. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove. Uchebnoe posobie* [Cell biology of higher plants *in vitro* and biotechnology on their base. Training manual]. Moscow: FBK-PRESS Publ., 1999, 160 p.

2. Dashkeev E.A. *Kanny v Moldavii* [Canna in Moldova]. Kishinev: Shtiitsa Publ., 1975, 65 p. (in Russian)

3. Egorova N.A., Stavtseva I.V. Mitrofanova I.V. Effects of chemotherapy on the morphogenetic potential of lavender explants in culture *in vitro*. *Tavrisheskii vestnik agrarnoi nauki* [Taurida herald of the agrarian sciences]. 2016, no. 1, pp. 9–19. (in Russian)

4. Zakubanskii A.V., Chirkov S.N., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Viruses of some valuable fruits, essential-oil and ornamental plants. Review. *Byulleten' gosudarstvennogo*

Nikitskogo botanicheskogo sada [Bull. of the State Nikitskii Botanic Garden]. 2016, no. 121, pp. 7–18. (in Russian)

5. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. *Metody kul'tury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii* [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiev: Naukova dumka Publ., 1980, 488 p.

6. Mitrofanova I.V. *Somaticheskii embriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii polucheniya i sokhraneniya mnogoletnikh sado-vykh kul'tur* [Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnology of perennial horticultural plants obtaining and conservation]. Kiev: Agrarna nauka Publ., 2011, 344 p. (in Russian)

7. Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V., Yezhov V.N. *Sposib deponuvannya v umovakh in vitro plodovikh i dekorativnikh kul'tur:*

Metodichni rekomendatsii [The method of fruit and ornamental crops conservation *in vitro*: Guidelines]. Yalta. NBG-NSC, 2010, 36 p. (in Ukrainian)

8. Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N. Using of biotechnological methods for plants improvement and propagation of virus-free planting material of perspective ornamental plants. In: *Sbornik trudov gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Works of State Nikitskii Botanic Garden]. 2014, vol. 138, pp. 5–56. (in Russian)

9. Molkanova O.I., Vasil'eva O.G., Konovalova L.N. The scientific basis for conservation and sustainable reproduction of plant genofond in culture *in vitro*. *Vestnik Udmurtskogo Universiteta* [Proc. of Udmurt University]. 2015, vol. 25, no. 2, pp. 95–100. (in Russian)

10. Novikova T.I., Nabieva A.Yu., Poluboyarova T.V. Rare and useful plants' conservation in the *in vitro* collection of Central Siberian Botanical garden. *Vestnik VOGiS* [Russian journal of genetics]. 2008, vol. 12, no. 4, pp. 564–572. (in Russian)

11. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Karasholakova L.N., Aralbaeva M.M., Rakhimbaev I.R., Kushnarenko S.V. *In vitro* collection of wild *Berberis* species. *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Bull. of the State Nikitskii Botanic Garden]. 2016, no. 121, pp. 69–76. (in Russian)

12. Tefvik 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*. *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Bull. of the State Nikitskii Botanic Garden]. 2016, no. 121, pp. 56–62. (in Russian)

13. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V. The influence of growth regulators on regeneration capacity of garden canna (*Canna* × *hybrida hort.*). *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* [Vestnik of Lobachevsky state university of Nizhni Novgoro]. 2014, no. 3 (3), pp. 124–127. (in Russian)

14. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V., Kuzmina T.N. The peculiarities of clonal micropropagation of canna garden (*Canna* × *hybrida hort.*). *Biotechnologia Acta*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 71–76. (in Russian)

15. Belokurova V.B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation. Review. *Cytology and Genetics*. 2010, vol. 44, no. 3, pp. 174–185.

16. Brown D.C.W., Thorpe T.A. Crop im-

provement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1995, vol. 11, pp. 409–415.

17. Cruz-Cruz C.A., González-Arno M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*. 2013, vol. 2, pp. 73–95. doi:10.3390/resources2020073

18. Engelmann F. *In vitro* conservation methods. In: *Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use*. Eds. Ford-Lloyd B.V., Newbury J.H., Carrow J.A. UK: Wallingford: CABI Publ., 1997, pp. 119–162.

19. Malaurie B. Medium-and Long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. *Acta Horticulturae*. 2001, vol. 560, pp. 69–77.

20. McCown B.H., Lloyd G. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*. 1981, vol. 16, pp. 453–453.

21. Milošević S., Cingel A., Jevremović S., Stanković I., Bulajić A., Krstić B., Subotić A. Virus Elimination from Ornamental Plants Using *in vitro* Culture Techniques. *Pestic. Phytomed.* 2012, vol. 27, no. 3, pp. 203–211.

22. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina E.L., Chirkov S.N. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanical Gardens and biotechnology of fig plants regeneration. *Acta Horticulturae*. 2016, no. 1139, pp. 303–310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.53

23. Mitrofanova I.V., Movchan O.P., Shishkin V.A., Mitrofanov V.I. Gene-pool collection *in vitro* in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center. *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Bull. of the State Nikitskii Botanic Garden]. 2002, no. 85, pp. 30–33.

24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497.

25. Sakai T., Imai K. The influences of growth regulators and culture medium composition on shoot-tip cultures of edible canna. *Environ. Control Biol.* 2007, vol. 45 (3), pp. 155–163.

26. Thammasiri K. Conservation of Thai orchid species using cryobiotechnology. *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Bull. of the State Nikitskii Botanic Garden]. 2016, no. 120, pp. 7–16.

27. Withers L.A., Engels J.M.M. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation. *IBPGR Newsletter for Asia and the Pasific*. 1990, no. 3, pp. 1–2.

Критерии авторства

Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Арзы Ш. Тевфик,

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма
К. б. н., мл. н.с. лаборатории биотехнологии
tevfik.arzy@yandex.ua.

Ирина В. Митрофанова

Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН
Д.б.н., ст. н.с., зав. отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности
irimitrofanova@yandex.ua.

Поступила 28.02.2017

Contribution

Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V. carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Tevfik A.Sh., Mitrofanova I.V. have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

AUTHORS' INDEX

Affiliations

Arzy Sh. Tevfik,

Research Institute of Agriculture of Crimea, Ph.D. (Biology), Junior Scientists
Laboratory of Biotechnology,
tevfik.arzy@yandex.ua.

Irina V. Mitrofanova

Nikitskii Botanical Garden – National Scientific Centre RAS
Doctor of Biology, Senior Researcher, Head of Plant Developmental Biology, Biotechnology and Biosafety Department
irimitrofanova@yandex.ua.

Received 28.02.2017