УДК 635.9:631.52:581.143.6

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В СТЕРИЛЬНУЮ КУЛЬТУРУ *IN VITRO* САДОВЫХ ЛИЛИЙ ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ

Панкратова А.А.

ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия», Кострома, e-mail: pancratova.anna@yandex.ru

В статье представлены результаты исследовательских работ по изучению особенностей введения в стерильную культуру *in vitro* садовых лилий на примере азиатской лилии сорта Марлен с целью дальнейшего клонального микроразмножения полученных растений-регенерантов. Исследовательские работы проводились на базе лаборатории биотехнологии растений ФГБОУ ВО «Костромская ГСХА». В качестве объектов исследований выступали луковицы лилии садовой сорта Марлен. В качестве стерилизующих агентов исходного растительного материала, а именно луковиц, применялись сочетания: этилового спирта и пероксида водорода, этилового спирта и гипохлорита натрия, этилового спирта, гипохлорита натрия и растворов антибиотиков тетрациклина и ампициллина в разных концентрациях и с разной экспозицией. Также дополнительно был проведен сравнительный анализ наилучшего месторасположения вычленяемого эксплантa в чешуйках луковиц. Отработана методика введения в стерильную культуру *in vitro* и дальнейшего клонального микроразмножения регенерированных из выделенных эксплантов растений лилий на питательной среде стандартного минерального состава Мурасиге и Скуга. В результате проведенных исследований были установлены: наилучший вариант стерилизации исходного донорского материала лилий – сочетание 70,0% этанола и 20,0% гипохлорита натрия (выход стерильных жизнеспособных эксплантов на данном варианте составил 80,0%) и месторасположение вычленяемого эксплантa – в нижней базальной части чешуйки луковицы. Подтверждено оптимальное содержание регуляторов роста в составе питательной среды для регенерации растений, их активного роста и дальнейшего размножения – цитокинин 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, образования микролуковичек – сочетание цитокинина 6-БАП и ауксина НУК в концентрации каждого регулятора роста 0,5 мг/л.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, растение-регенерант, лилия, стерилизация, эксплант, коэффициент размножения

FEATURES OF INTRODUCTION OF GARDEN LILIES INTO STERILE CULTURE *IN VITRO* AT CLONAL MICRO REPRODUCTION

Pankratova A.A.

Kostroma State Agricultural Academy, Kostroma, e-mail: pancratova.anna@yandex.ru

The article presents the results of research on the study of the features of the introduction of sterile culture *in vitro* garden lilies at the example of Asian lilies Marlene varieties, with the aim of further clonal micro-reproduction of the obtained plants-regenerants. Research was conducted at the laboratory of plant biotechnology of the Kostroma state agricultural Academy. The objects of research were bulbs of lilies garden varieties Marlene. Combinations of ethyl alcohol and hydrogen peroxide, ethyl alcohol and sodium hypochloride, ethyl alcohol, sodium hypochloride and solutions of antibiotics tetracycline and ampicillin in different concentrations and with different exposures were used as sterilizing agents of the original plant material, as well as bulbs. In addition, a comparative analysis of the best location of the extracted Explant in the bulb scales was carried out. The technique of introducing *in vitro* into sterile culture and further clonal micropropagation of lilies regenerated from isolated explants on nutrient medium of standard mineral composition Murashige and skuga was worked out. As a result of the researches the best variant of sterilizing initial donor material of lilies – a combination of 70,0% ethanol and 20,0% hypochloride of sodium (the yield of sterile viable explants on this variant made 80.0%) and a location of the isolated Explant – in the lower basal part of scales of a bulb was established. The optimal content of growth regulators in the nutrient medium for plant regeneration, their active growth and further reproduction – cytokinin 6-BAP at a concentration of 0.5 mg/l, the formation of micro – bulbs-a combination of cytokinin 6-BAP and auxin NAC in the concentration of each growth regulator 0.5 mg/l was confirmed.

Keywords: clonal micro-reproduction, regenerant plant, Lily, sterilization, Explant, reproduction coefficient

К основным недостаткам традиционных способов размножения лилий относят сравнительно невысокий выход качественного посадочного материала и большую инфицированность растений болезнями.

Метод клонального микроразмножения растений *in vitro* широко применяется для быстрого тиражирования ценных генотипов растений, он является обязательной частью в технологической цепочке по получению оздоровленного посадочного материала любой культуры. Оздоровление путем стерилизации и дальнейшее введение в культуру *in vitro* растений, полученных из естественных условий произрастания – процесс достаточно трудоемкий и длительный. Основная задача при выполнении работ такого типа должна быть направлена на получение стерильных растительных эксплантов, освобожденных от любого вида инфекции, присутствующей на поверхности и внутри растений, с максимально воз-

можным количеством получаемых стерильных растений-регенерантов.

Введение в культуру *in vitro* растений лилии осуществляется методом вычленения эксплантa из чешуек луковицы. Вариантов и методов стерилизации растительного материала существует достаточно много. В литературных источниках встречаются рекомендации применения для этих целей различных стерилизующих растворов и детергентов (в различных концентрациях, с разной экспозицией в зависимости от применяемого вещества и исходного вводимого в стерильную культуру растительного материала).

Цель проводимых нами исследований заключалась в усовершенствовании и оптимизации способов и приемов введения в стерильную культуру *in vitro* садовых лилий с целью последующего клонального микроразмножения культуры.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились в лаборатории биотехнологии растений ФГБОУ ВО «Костромская ГСХА». В качестве объектов наших исследований служили луковицы азиатской лилии сорта Марлен. Все исследования выполняли в соответствии с общепринятыми методиками [1–3].

Для выполнения работ использовали луковицы лилий, прошедших после осенней уборки период покоя в течение 2 месяцев при температуре + 4 – 6 °С. Для очистки исходного материала от загрязнений и удаления внешней инфекции луковицы предварительно отмывали водопроводной водой с добавлением коммерческого препарата Доместос хлор. Дальнейшую стерилизацию подготовленных луковиц проводили в стерильных условиях ламинар-бокса по следующей схеме (табл. 1).

После проведения поверхностной стерилизации чешуи луковиц разрезали на сегменты, для чего базальную часть каждой чешуйки с помощью скальпеля разрезали поперечно на три сегмента: нижний, средний, верхний. Из каждого сегмента вырезали экспланты величиной 0,3–0,5 см, которые затем помещали на питательную среду внешней поверхностью вниз. Для культивирования эксплантов за основу брали питательную среду, состоящую из минеральных солей по прописи Мурасиге – Скуга. В качестве регуляторов роста использовали цитокинин 6-бензиламинопурин (6 – БАП) в концентрации, рекомендованной для клонального микроразмножения большинства культур – 0,5 мг/л [3–5]. Первую пересадку на свежую питательную среду микрорастений-регенерантов проводили через 6 недель культивирования.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведения серии исследовательских работ было подтверждено, что успех введения в культуру тканей в большей степени определяется эффективностью стерилизации. Как показал сравнительный анализ, действие различных сочетаний стерилизующих агентов было отличным в зависимости от используемого варианта стерилизации (табл. 2). В нашем случае наиболее удачным вариантом стерилизации исходного материала лилий было сочетание этилового спирта и раствора гипохлорита натрия (вариант стерилизации № 2 – см. табл. 1). Проведение стерилизации данным способом обеспечивало достаточную стерильность материала – количество стерильных эксплантов, образующих почки и микропобеги, достигало 80,0%. Однако до 15,0% растительного материала не удавалось освободить от грибной и бактериальной инфекции, 5,0% введенного в стерильную культуру материала не имели видимых признаков инфицированности, но были нежизнеспособными, т.е дальнейшая регенерация на них не отмечалась.

Таблица 1

Схема стерилизации исходного растительного материала

Вариант стерилизации	Стерилизующий агент	Концентрация,%	Экспозиция, мин/сек
1	Этиловый спирт	70,0	10 с
	Пероксид водорода	3,0	25 мин
2	Этиловый спирт	70,0	10 с
	Гипохлорит натрия	20,0	7 мин
3	Этиловый спирт	70,0	10 с
	Гипохлорит натрия	20,0	10 мин
	Тетрациклин, ампициллин	5,0	7 мин

Таблица 2

Жизнеспособность выделенных эксплантов лилий в условиях *in vitro*, %

Вариант стерилизации	Стерилизующий агент	Выход стерильных эксплантов	Число инфицированных эксплантов	Число нежизнеспособных эксплантов
1	Этиловый спирт	2,0	90,0	8,0
	Пероксид водорода			
2	Этиловый спирт	80,0	15,0	5,0
	Гипохлорит натрия			
3	Этиловый спирт	72,0	8,0	20,0
	Гипохлорит натрия			
	Тетрациклин, ампициллин			

Совместное применение этилового спирта, растворов гипохлорита натрия, растворов антибиотиков тетрациклина и ампициллина (вариант стерилизации № 3 – см. табл. 1) обеспечивало стерилизующий эффект растительного материала несколько ниже по сравнению с предыдущим вариантом стерилизации – 72,0 %. Несмотря на то, что антибиотики губительно действуют на микроорганизмы, в нашем случае они оказывали токсическое влияние непосредственно и на сами экспланты. Число нежизнеспособных эксплантов составляло 20,0 %, число инфицированных эксплантов – 8,0 %.

Среди всех изученных стерилизующих агентов 3,0 % раствор пероксида водорода показал наименьший стерилизующий эффект, инфицированность эксплантов составляла 90,0 %, которая состояла в основном из грибной микрофлоры и введенные побеги через 5–7 суток погибали – 8,0 %. Количество полученных стерильных эксплантов на данном варианте не превышало 2,0 % (вариант стерилизации № 1– см. табл. 1).

Инфицированность и нежизнеспособность эксплантов отмечалась, независимо от изначального их месторасположения в чешуе луковицы.

Таким образом, было установлено, что наилучшим вариантом для стерилизации чешуй луковиц в наших исследованиях оказался вариант № 2, т.е. сочетание 70,0 %-ного этанола с экспозицией 10 с и использование в качестве основного стерилизующего агента 20,0 % гипохлорита натрия с экспозицией 7 мин.

Начало развития адвентивных микропобегов наблюдали через 2 недели после введения в культуру на всех вариантах опыта, более активная регенерация которых отмечалась на эксплантах, вырезанных из нижней базальной части чешуи по сравнению с сегментами, вырезанными из средней и верхней частей – 98,0 %, (табл. 3).

Таблица 3

Регенерация растений лилий после введения в стерильную культуру *in vitro*, %

Расположение экспланта в чешуе	Процент регенерированных растений
нижнее	98,0
среднее	77,0
верхнее	54,0

На протяжении этапа «собственно микроразмножение» растений из биометрических показателей проводили учет прироста растений в высоту (рис. 1). Через месяц после начала активной регенерации высота растений варьировала от 3,5 до 6,0 см, каждый последующие месяц высота растений увеличивалась в среднем на 2 см и через 3 месяца составляла в среднем 7,5–9,0 см.

Наглядно поэтапное развитие растений-регенерантов лилий после введения эксплантов в стерильную культуру, а также на этапе «собственно микроразмножение» представлено на рис. 2, 3.

Для последующего формирования микролуковичек использовали питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую в своем составе кроме цитокинина 6 – БАП (0,5 мг/л) также ауксин НУК (нафтилуксусную кислоту) в концентрации 0,5 мг/л.

Более высокие значения основных анализируемых показателей развития растений-регенерантов, а именно, значения коэффициента размножения – 5,0 шт. микролуковичек/эксплант и размера образовавшихся луковичек – в среднем 2,8 мм также были отмечены на эксплантах вырезанных с нижней части чешуи по сравнению с эксплантами со средних и верхних сегментов чешуй (табл. 4).

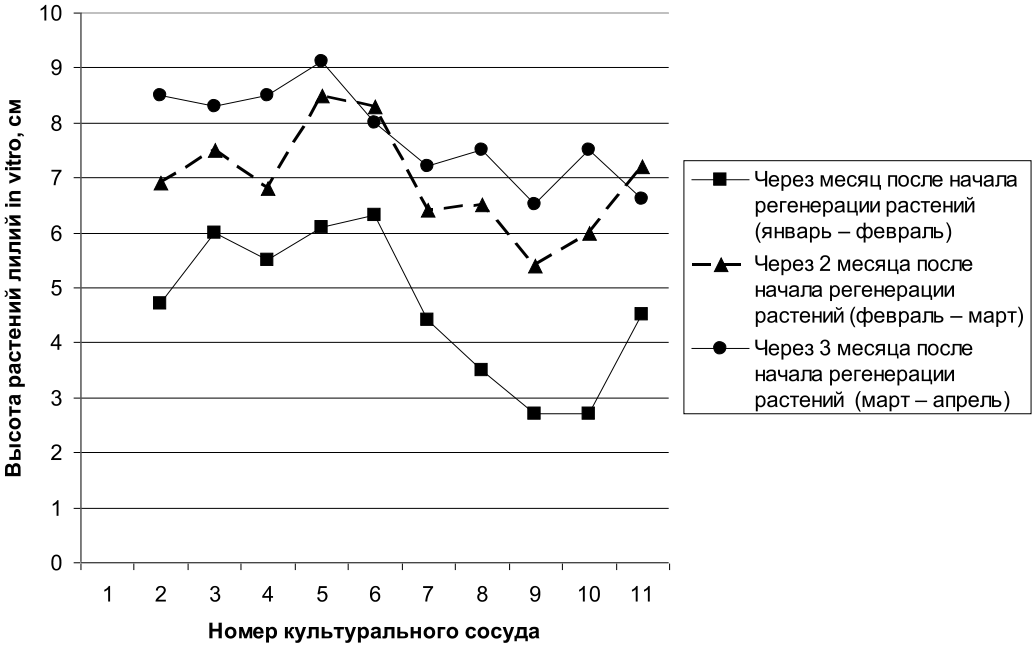

Рис. 1. Динамика увеличения высоты растений-регенерантов лилий на этапе «собственно микроразмножение», см

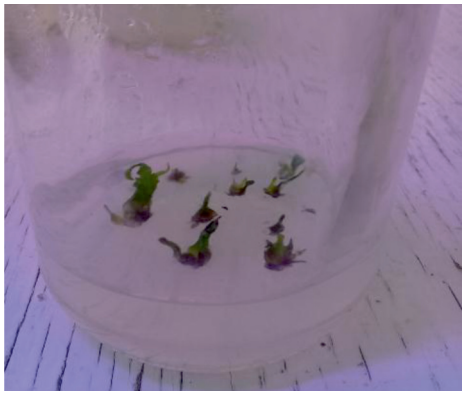

Рис. 2. Регенерация растений лилий на эксплантах (через 2 недели после начала регенерации)

Рис. 3. Микрорастения лилий, регенерированные из эксплантов (через 1,5 месяца после начала регенерации)

Таблица 4

Показатели развития растений-регенерантов лилий после введения в стерильную культуру *in vitro*

Расположение экспланта в чешуе	Коэффициент размножения, шт. микролуковичек/эксплант	Средний размер луковичек, мм
нижнее	5,0	5,5
среднее	2,5	4,3
верхнее	2,0	1,8
$НСР_{05}$	1,07	0,83

Таким образом, было установлено, что при наличии достаточного количества исходного донорского материала для введения в стерильную культуру предпочтительней использовать только базальную часть чешуй луковиц размером, не превышающим 1,0–1,5 см.

Наглядно конгломерат растений-регенерантов лилий с формирующимися микролуковицами представлен на рис. 4.

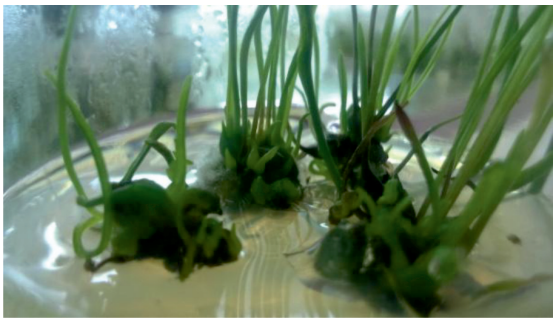

Рис. 4. Формирование микролуковиц на растениях лилий сорта Марлен

Устойчиво растущая стерильная культура лилий *in vitro* представлена на рис. 5.

Рис. 5. Устойчиво растущая стерильная культура in vitro лилий сорта Марлен

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что для введения в стерильную культуру лилий, путем вычленения эксплантов из чешуй луковиц наиболее эффективно применение сочетания 70,0%-ного этанола с экспозицией 10 с и 20,0%-ного гипохлорита натрия – 7 мин, что обеспечивало более высокий выход стерильных жизнеспособных растений – 80,0% по сравнению с другими испытуемыми вариантами. Также было подтверждено, что вычленять экспланты предпочтительней из нижней части чешуи луковицы, что в свою очередь позволяет получать до 98,0% успешно регенерированных растений с более качественными биометрическими показателями, а именно размером микролуковичек *in vitro* 5,5 мм и коэффициентом размножения – 5,0 шт./эксплант.

Таким образом, применение метода клонального микроразмножения может оказаться весьма полезным и перспективным направлением в размножении ценных сортов и гибридов лилий, особенно если в качестве исходного донорского материала имеется ограниченное количество луковиц. Кроме того, постоянное поддержание растений в стерильной культуре *in vitro* может служить своеобразным банком для сохранения и поддержания генофонда наиболее ценных сортов и гибридов культуры.

Список литературы / References

1. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 144 с.

Kalashnikova E.A., Kochieva E.Z., Mironova O.Y. Workshop on agricultural biotechnology. M.: KolosS, 2006. 144 p. (in Russian).

2. Соколова М.А. Некоторые аспекты клонального микроразмножения лилий // Субтропическое и декоративное садоводство. 2018. № 65. С. 125–129.

Sokolova M.A. Some aspects of clonal micro-reproduction of lilies // Subtropical and ornamental gardening. 2018. № 65. P. 125–129 (in Russian).

3. Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Клональное микроразмножение ценных гибридов лилий // Патент РФ № 2384050. Патентообладатель ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева. 2010. Бюл. 8.

Mokshin E.V., Lukatkin A.S. Clonal micropropagation of valuable Lily hybrids // Patent RF № 2384050. Patentoobladatel' GOU VPO «Mordovskiy gosudarstvennyy universitet im. N.P. Ogareva. 2010. Byul. 8. (in Russian).

4. Мокшин Е.В. Морфо-физиологические особенности клонального микроразмножения *in vitro* различных сортов лилий (*Lilium* L.) и гладиолусов (*Gladiolus* L.): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2005. 20 с.

Mokshin E.V. Morpho-physiological features of clonal micro-reproduction *in vitro* of different varieties of lilies (*Lilium* L.) and gladiolus (*Gladiolus* L.): avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Nizhny Novgorod, 2005. 20 p. (in Russian).

5. Шестибратов К.А., Салмова М.А., Алпатова А.А., Азарова А.Б. Способ клонального микроразмножения сирени // Патент РФ № 2457669. Патентообладатель ООО Научно-производственное предприятие «МИКРОКЛОН». 2012.

Shestopalov K.A., Salimova M.A., Alpatova A.A., Azarov A.B. Method of clonal micropropagation of lilac // Patent RF № 2457669. Patentoobladatel' OOO Nauchno-proizvodstvennoye predpriyatiye «MIKROKLON». 2012. (in Russian).