

**РАЗМНОЖЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* *LILIUM CERNUUM* KOM., *LILIUM DISTICHUM* NAKAI. И *LILIUM PUMILUM* DELILE ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЭКСПЛАНТОВ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ЦВЕТКА**

Набиева А.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Центральный сибирский ботанический сад, Новосибирск, Россия, e-mail: sibflower05@gmail.com*

Статья посвящена актуальной проблеме сохранения редких видов растений азиатской части России. Показана возможность массового получения растений-регенерантов и их сохранения с помощью метода культуры ткани при использовании в качестве эксплантов фрагментов неокрашенных цветков 3 редких видов лилий азиатской части России. Проведенный гистологический анализ позволил выделить 3 варианта развития морфогенетической реакции у эксплантов лилий в зависимости от минерального состава среды и регуляторов роста растений. В статье рассмотрены преимущества использования тканей и органов цветка в качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* трех редких видов лилий азиатской части России с целью сохранения и последующего массового размножения данных видов. Изучены пути реализации морфогенетической реакции трех различных типов эксплантов в зависимости от минерального состава питательной среды и регуляторов роста. С помощью гистологического анализа ранних этапов пролиферации тканей и органов цветка подтверждена возможность получения растений-регенерантов всех трех видов лилий путем адвентивного органогенеза, тогда как соматический эмбриогенез был отмечен у *L. pumilum* и *L. cernuum*. Процесс образования микролуковичек у всех изученных видов лилий происходил более интенсивно на вариантах среды N6m, чем на средах MSm-1 и MSm-2. Применение холодовой обработки полученных микролуковиц позволило успешно провести адаптацию растений-регенерантов в почвенной культуре.

Ключевые слова: культура *in vitro*, редкие виды лилий, экспланты цветка, морфогенез

***IN TISSUE CULTURE MULTIPLICATION OF LILIUM CERNUUM* KOM., *LILIUM DISTICHUM* NAKAI. AND *LILIUM PUMILUM* DELILE BY THE USE OF FLOWER TISSUES AND ORGANS AS THE EXPLANTS**

Nabieva A. Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia, e-mail: sibflower05@gmail.com*

In the article the advantages of the use of flower tissues and organs of three endangered lilies species of Asiatic part of Russia as the explants for tissue culture introduction are considered for the aim of these species conservation and micropropagation. The paths of morphogenetic reaction of three different types of explants are realized in connection with nutrititious medium content and grow regulators. By the help of histological analysis of the early stages of flower tissue and organs proliferation the possibility of plants-regenerants receiving through adventive shoot morphogenesis was approved for 3 *Lilium* species whereas somatic embryogenesis was revealed in *L. pumilum* and *L. cernuum*. The process of bulbil's formation for all studied lilies species occurred more intensively on the N6m medium than on MSm-1 and MSm-2 media. The cool temperature application treatment allowed to conduct successful adaptation of regenerated plants in the soil culture.

Keywords: tissue culture, endangered Lilies species, flower explants, morphogenesis

*L. distichum*, *L. pumilum* и *L. cernuum* (сем. Liliaceae) являются редкими видами азиатской России, нуждающимися в охране. *L. distichum*, *L. pumilum* занесены в Красные книги Хабаровского края (2000), Еврейской Автономной области (2006) как исчезающие виды сокращающие численность, тогда как *L. cernuum* из-за сокращения ареала и численности популяций внесена в Красную книгу РФ (2008).

В условиях интродукции, особенно в климатической зоне средней полосы, возобновление этих видов традиционными способами затруднено [3]. В связи с этим,

необходимым является поиск методов размножения лилий, позволяющих не только размножить ценные декоративные растения, но и сохранить их в природе. При выборе стратегии сохранения биоразнообразия редких, исчезающих видов растений многими исследователями показана эффективность методов биотехнологии в сравнении с традиционными способами их размножения [8].

С помощью метода культуры ткани ранее были успешно размножены многие редкие виды лилий: *L. martagon* L. [6], *L. ledebourii* (Baker) Voiss [4] и некоторые другие. При использовании эксплантов, представлявших собой ткани либо фрагменты генеративного побега лилий, большинство исследователей отмечали появление регенерантов путем образования адвентивных почек из каллуса, тогда как для сохранения генотипов редких и исчезающих растений предпочтительны методы, позволяющие избежать соматической изменчивости у регенерантов. Необходимость изучения ранних стадий морфогенеза лилий в культуре *in vitro* с помощью гистологического анализа объясняется тем, что первичные процессы органогенеза в тканях эксплантов, как правило, определяют их дальнейший путь морфогенеза [6]. При использовании флоральных эксплантов редких видов лилий в культуре *in vitro* исключается возможность повреждения или гибели материнских растений в природе.

Цель исследования – определить особенности регенерации и реализации морфогенетического потенциала различных типов эксплантов, выделенных из цветков 3–х редких видов рода *Lilium* L. в зависимости от минерального состава питательной среды и внесенных регуляторов роста.

#### **Объекты и методы**

Объектами для введения в культуру *in vitro* являлись три вида из р. *Lilium*, произрастающие в азиатской части России: *L. cernuum* Kom., *L. distichum* Nakai, *L. pumilum* Delile. *L. cernuum* и *L. distichum* получены из природных популяций Дальнего Востока. *L. pumilum* собрана из окрестностей села Б. Голоустное (западное побережье о. Байкал). Исследования по микроразмножению данных объектов проведены в лаборатории биотехнологии Центрального сибирского ботанического сада. Эксплантами служили различные ткани и органы, выделенные из неокрашенных бутонов трех видов лилий: 1. Поперечные срезы оси соцветия, толщиной 1,5-2 мм; 2. Фрагменты цветоложа такой же толщины; 3. Пыльник с тычиночной нитью и с частью цветоложа. Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей проводили по общепринятым методикам [2]. Для стерилизации бутонов проводили их обработку 96 %-м этанолом в течение 1 мин, далее их обжигали в пламени спиртовки, после чего выдерживали 5 минут в 0,1 %-м водном растворе HgCl<sub>2</sub> (0.1%), а затем 4 раза промывали в стерильной дистиллированной воде.

Для инокуляции и культивирования эксплантов использовали две питательные среды: MS [7] и N6 [5] модифицированные нами и обозначенные – MSm и N6m. Модификация состояла в том, что концентрация сахарозы была увеличена до 4%, содержание микросолей и органических компонентов в данных средах было идентично среде MS. Концентрации и компонентный состав макросолей в каждой из сред соответствовал их базовому уровню. Для получения полутвердой питательной среды применяли агар-агар марки «Васто agar» в концентрации 4-6 г/л. Значение pH сред = 5.7-5,8, продолжительность одного пассажа составляла 3–4 недели. Дальнейшее изучение морфогенетических потенций эксплантов тканей и органов цветков у данного вида лилии было проведено на 4 вариантах питательных сред MSm и N6m, содержавших регуляторы роста 2,4 Д и БАП как по отдельности, так и в комбинации друг с другом.

На всех этапах культивирования растения выращивались: а) при искусственном освещении 40 мкмоль·м<sup>-2</sup>/сек<sup>-1</sup>, 16 часовом фотопериоде и температуре 22 ± 24° С; б) для лучшей адаптации перед высадкой *ex vivo* растения - регенеранты выдерживали 1-1,5 месяца в световом термостате фирмы Rumed (Германия) при + 7° С.

Гистологическое изучение тканей регенерантов было выполнено на постоянных препаратах, для дифференцированной окраски на ДНК-РНК ткани окрашивали метиловым зеленым и пиронином. Готовые препараты и образцы тканей просматривали на микроскопе “AxioLab” фирмы “Zeiss” в центре коллективного пользования ЦСБС.

### **Результаты и обсуждение**

Предварительные эксперименты показали, что морфогенетическая реакция вышеуказанных типов эксплантов тканей и органов цветка 3 видов лилий отсутствовала при их инокуляции на среды MSm и N6m без регуляторов роста. Использование таких эксплантов у лилий, как ось соцветия или ткани цветоложа, являющихся органами осевой природы, часто еще не закончивших развитие и не утративших своих морфогенетических способностей, как правило, приводит к образованию микролуковичек непрямым путем, т. е. путем каллусогенеза [9]. В процессе развития регенерантов важно исключить эту стадию, чтобы получить растения-регенеранты идентичные исходному генотипу. Перед нами стояла задача подобрать такие типы эксплантов, которые представляли бы собой индивидуальные органы, выделенные с частью побега, имеющие наибольшую регенерационную способностью без образования каллуса.

Гистологическое изучение тканей эксплантов генеративной сферы *L. pumilum*, *L. cernuum* было проведено с целью построения прогнозируемой модели морфогенеза регенерантов, исключая возможность возникновения соматональной изменчивости. Начальные стадии морфогенеза у данных видов лилий *in vitro* были отмечены образованием

скоплений меристематических клеток у эксплантов, выделенных из тканей и органов цветков. На постоянных препаратах делящиеся группы клеток, находящиеся в субэпидермальном слое эксплантов были выявлены благодаря дифференцированной окраске, начиная с 20-25 дня инокуляции, и представляли собой мелкие клетки с хорошо различимыми ядрами, образывавшие шаровидные структуры, включающие васкулярные элементы (рис.1). Подобные меристематические структуры были отмечены ранее многими исследователями – [6], [10] на ранних стадиях морфогенетического развития эксплантов луковичных растений в культуре *in vitro*. В нашем эксперименте эти центры адвентивного побегообразования в дальнейшем давали начало эндогенно образующимся микролуковицам лилий.

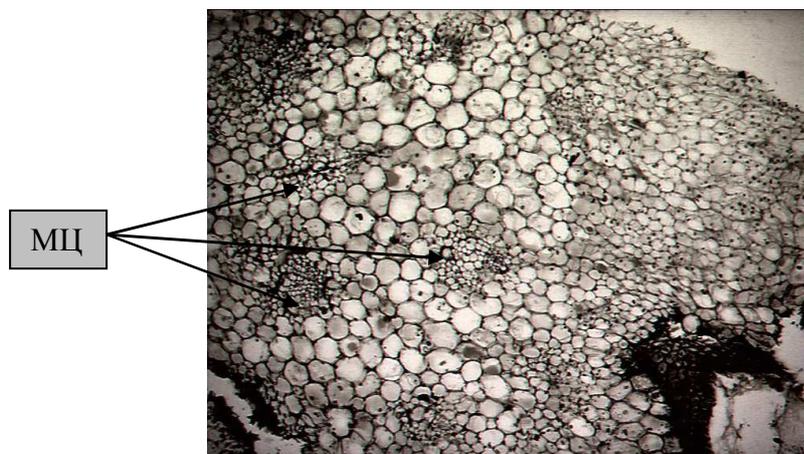


Рис.1. Заложение меристематических центров (МЦ) в паренхиме цветоложа *L. pumilum*, инокулированного на среду N6m-1, увеличение  $\times 250$

Отмечено, что образование микролуковичек происходило на всех типах эксплантов, выделенных из цветков 3 видов лилий в большинстве случаев по пути адвентивного побегообразования (гемморизогенеза) как на средах MSm, так и на средах N6m. Минеральная основа среды для инициации, а также концентрация ауксина 2,4- Д оказывали существенное влияние на образование микролуковичек у различного типа эксплантов, взятых из тканей и органов цветка *L. pumilum*, *L. cernuum* и *L. distichum*. Процесс образования побегов и микролуковичек у всех изученных видов лилий происходил более интенсивно на вариантах среды N6m, чем на средах MSm (табл. 1).

#### Таблица 1

Влияние минерального состава среды и концентрации 2,4- Д на тип морфогенетической реакции и интенсивность регенерации (шт. микролуковиц на эксплант) у эксплантов тканей и органов цветка *Lilium cernuum*, *L. distichum*, *L. pumilum*, n=24

Виды лилий, типы эксплантов	Варианты питательных сред			
	MSm-1	MSm-2	N6m-1	N6m-2
	0,2 мг/л БАП+ 0,2 мг/л 2,4 Д	0,2 мг/л БАП+ 0,8 мг/л 2,4 Д	0,2 мг/л БАП+ 0,2 мг/л 2,4 Д	0,2 мг/л БАП+ 0,8 мг/л 2,4 Д
1. Фрагм. цветоложа				
а) <i>L.cernuum</i>	1,0 ± 0,13 По,К	1,29±0,17 По,К	2,33±0,25 Сэ,К	2,72±0,23 По
б) <i>L. distichum</i>	0,25±0,09 По	0,42±0,10 К	1,04±0,15 По	1,75 ±0,17 По
в) <i>L. pumilum</i>	2,30±0,24 К	3,4±0,29 К	3,8±0,30 По	4,2±0,30 По
2. Срез оси соцветия:				
а) <i>L.cernuum</i>	-	-	0,5±0,13 К	-
б) <i>L. distichum</i>	-	-	-	-
в) <i>L. pumilum</i>	-	-	-	0,75±0,21 По,К
3. Тыч. нить с пыльн. и фрагм. цветоложа:				
а) <i>L.cernuum</i>	2,0±0,24 По	1,72,0±0,25 По	3,21±0,27 По	3,51±0,22 По
б) <i>L. distichum</i>	1,04±0,15 По	1,20±0,20 По	1,70±0,23 По	3,80±0,33 По
в) <i>L. pumilum</i>	2,70±0,31 По	3,10±0,27 По	3,80±0,30 Сэ	4,12±0,30 По

Примечание :– - отсутствие морфогенетической реакции; По – прямой органогенез; К – каллусогенез; Сэ – соматический эмбриогенез

В нашем эксперименте наличие в среде ауксинов и цитокининов и их взаимодействие могло обеспечивать интенсивную индукцию гемморизогенеза как прямым, так и непрямым путем, т.е. путем дедифференциации и каллусогенеза. Каллусообразование отсутствовало только у одного типа эксплантов, а именно, у тычиночных нитей с пыльником и фрагментом цветоложа на всех четырех вариантах сред. Как известно, интенсивность образования каллуса пропорциональна величине раневой поверхности экспланта [1]. Очевидно, что при использовании тычиночных нитей с пыльником и фрагментом цветоложа ткани экспланта данного типа менее всего оказались подвержены поранению. Кроме того, меристематические структуры, как показал гистологический анализ в данной работе, закладывались именно в субэпидермальном слое.

При добавлении к среде N6m ауксина 2,4 Д в сочетании с цитокинином БАП в равных концентрациях (0,2 мг/л) примерно у 20 % эксплантов *L. cernuum*, представлявших собой тычиночные нити, объединенные с тканью цветоложа и с пыльником, было зафиксировано появление биполярных образований, имевших как зародышевую почечку, так и зародышевый корень, что позволило идентифицировать их как соматические эмбриониды (рис.2).

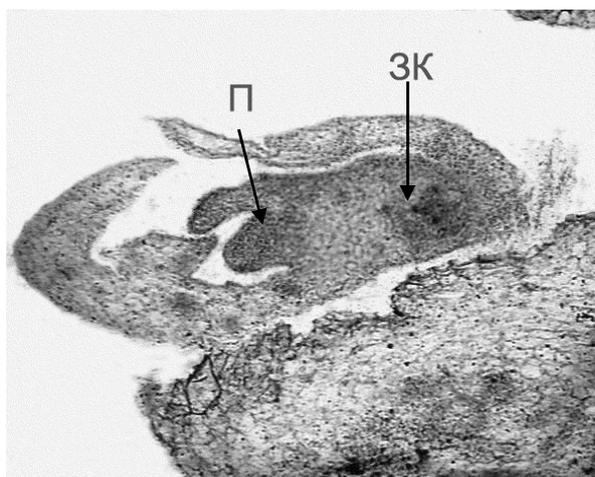


Рис.2. Образование соматического эмбриона через 40 дней культивирования тычиночной нити с пыльником и тканью цветоложа *L. pumilum* на среде N6m + 0,2 мг/л 2,4 Д + 0,2 мг/л БАП; П – почечка; ЗК – зародышевый корень, увеличение  $\times 50$

Только в том случае, когда в составе питательной среды концентрация ауксина и цитокинина была одинакова, было отмечено образование соматических эмбрионов у 2-х видов лилий: *L. cernuum* и *L. distichum* (рис.3). Таким образом, очевидно, именно низкая концентрация (0,2 мг/л) ауксина 2,4 Д в составе питательной среды N6m способствовала образованию соматических эмбрионов как прямым (*L. pumilum*), так и непрямым путем (*L. cernuum*).

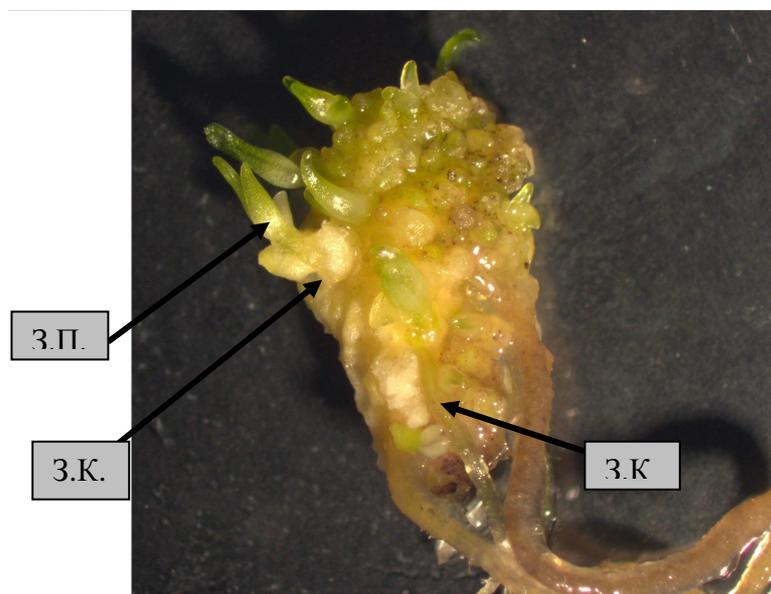


Рис.3. Образование соматических эмбрионов из ткани цветоложа *L. cernuum* на среде N6m с добавлением 0, 2 мг/л 2,4 Д и 0,2 мг/л БАП: ЗК – зародышевый корень; ЗП – зародышевая почечка; увеличение  $\times 10$

На этапе адаптации полученных микролуковичек 3 редких видов лилий к условиям *ex vitro* для увеличения их размеров и лучшей укореняемости была произведена холодовая обработка регенерантов, для чего полученные микролуковицы лилий содержались в световом термостате при + 70 в течение от 1 до 1,5 месяца. После адаптации и высадке

микролуковиц *ex vitro* в стерильный песок процент погибших растений составлял не более 5-7 %.

Таким образом, результаты показали, что совместное действие БАП и 2,4 Д обеспечивают регенерацию микролуковичек по пути прямого органогенеза или соматического эмбриогенеза. Нежелательной дедифференциации тканей эксплантов при каллусообразовании можно избежать при введении в культуру *in vitro* эксплантов, объединяющих в себе пыльник с тычиночной нитью и с частью цветоложа. Интенсивность регенерации, измеряемая по количеству микролуковичек, образующихся у различного типа эксплантов, взятых из тканей и органов цветка *L. pumilum*, *L. cernuum* и *L. distichum* зависела от минеральной основы среды, концентрации 2,4 и была больше на среде N6m-2. Гистологический анализ тканей и органов цветка *L. pumilum* и *L. cernuum* показал, что начальным этапом морфогенеза при культивировании *in vitro* данных типов эксплантов, следует считать образование меристематических зон и элементов проводящей системы, развивающихся в дальнейшем в адвентивные побеги. Изучены морфогенетические потенции цветоложа, околоцветников, тычиночных нитей лилий как перспективных эксплантов для сохранения данных видов в природе с помощью методов культуры тканей. При использовании способа размножения фрагментами бутонов *in vitro* исключается возможность повреждения или гибели растения, являющегося донором экспланта.

### **Заключение**

Установлено, что в культуре тканей и органов цветков видов *L. distichum*, *L. pumilum*, *L. cernuum* возможна реализация процессов как адвентивного органогенеза, соматического эмбриогенеза, так и каллусогенеза. 2. Изучены морфогенетические потенции цветоложа, околоцветников, тычиночных нитей лилий как перспективных эксплантов для сохранения данных видов в природе с помощью методов культуры тканей. Наибольшая регенерационная способность к образованию микролуковичек у всех 3 видов лилий была отмечена у тычиночных нитей с пыльником и фрагментом цветоложа, культивировавшихся на среде N6m, включавшей 0,8 мг/л 2,4 Д и БАП в концентрации 0,2 мг/л. 3. Определен тип эксплантов, представляющий собой сопряженную систему: пыльник – тычиночная нить – ткань цветоложа, с помощью которой получены регенеранты путем прямого органогенеза и соматического эмбриогенеза без фазы каллусообразования. При использовании способа размножения фрагментами бутонов *in vitro* исключается возможность повреждения или гибели растения, являющегося донором экспланта.

Таким образом, разработана технология клонального микроразмножения 3 видов лилий Сибири и Дальнего Востока от стерильной культуры до растений - регенерантов с использованием в качестве эксплантов тканей и органов цветка.

## Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
3. Растения Красной книги России в коллекциях ботанических садов и дендрариев/ РАН. Отд-ние. биол. наук. Совет ботан. садов России. Глав. ботан. сад им. Н. В. Цицина. – М., 2005. – 142 с.
4. Azadi P., Khosh-Khui M. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments// Electron. J. Biotechn. – 2007. – Vol. 10. №4. DOI: 10.2225/vol10-issue4-fulltext-7
5. Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops: In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture, – Beijing: Science Press, 1978. – P. 43–50.
6. Kedra M., Bach A. Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture// Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. – 2005. – Vol.47. №1. – P. 65-73.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// J. Physiol. Plant. –1962. – Vol.15. – P. 473-497.
8. Paunescu A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview// Rom. Biotechnol. Lett. – 2009. Vol. 14. №1. – P. 4095-4103.
9. Pelkonen V.-P., Kauppi A. The effect of auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis// Int. J. Plant Sci. – 1999. Vol. 160. – P. 483–490.
10. Subotic A., Trifunovic M., Jevremovic S., Petric M. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Frittilaria meleagris*// Biol. Plant.– 2010. Vol. 54. №3. – P. 592-596.

### Рецензенты:

Новикова Т.И., д.б.н., зав. лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск;  
Дорогина О.В., д.б.н., профессор, зав. лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск.