

К разработке эффективного протокола микроклонального размножения *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch.

To the development of an efficient micropropagation protocol *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch.

Терентьева С. Г., Кучарова Е. В., Охлопкова Ж. М.

Terentieva S. G., Kucharova E. V., Okhlopkova Zh. M.

Северо-Восточный федеральный университет, г. Якутск, Россия
E-mail: saina.terenteva.1999@mail.ru, oleneek@mail.ru, zhm.okhlopkova@s-vfu.ru
North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Реферат. Сокращение численности редких и исчезающих растений требует разработки и внедрения альтернативных путей размножения включая технологии культуры *in vitro*. Особое место занимают декоративные группы растений. Одним из дикорастущих декоративных видов растения Якутии является *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch. Это редкий вид растения по категории «2 б», численность популяций которого сокращается в результате вырубки лесов, сбора, выкапывания луковиц и требующий специальных мер охраны. В данном исследовании оптимизированы условия к получению микроклонов лилии кудреватой. Для регенерации использованы листовые и луковичные экспланты от дикорастущего растения, произрастающего на территории Нюрбинского района Якутии. Наиболее оптимальным для получения проростков в культуре *in vitro* является питательная среда Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением бензиламинопурина (БАП, 1 мг/л) и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (0,5 мг/л). Инициация побегообразования на основе луковичных чешуек достигнута при культивировании в условиях фитостеллажа на питательной среде МС с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л. Полученные микропобеги лилии кудреватой разъединены и пересажены для инициации ризогенеза и изучения адаптации регенерантов в условиях различных почвенных субстратов.

Ключевые слова. Культура *in vitro*, микроклональное размножение, чешуйки луковицы, Якутия, *Lilium pilosiusculum*.

Summary. The reduction in the number of rare and endangered plants requires the development and implementation of alternative ways of reproduction, including *in vitro* culture technology. Ornamental groups of plants are of particular importance. *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch is one of the wild growing ornamental species of plants in Yakutia. This rare plant species of «2 b» category is undergoing a decline in numbers due to deforestation, collection, digging of bulbs and requires special protection precautions. This study optimised the conditions under which microclones of *Lilium pilosiusculum* were obtained. The leaf and bulb explants obtained from a wild plant growing on the territory of the Nyurbalul of Yakutia were used for regeneration. The most optimal for obtaining sprouts *in vitro* culture is Murashige and Skoog medium (MS) with the addition of benzylaminopurine (BAP, 1 mg/L) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0,5 mg/L). Initiation of sprouting on the basis of bulb scales was achieved during cultivation under conditions of plant shelf with grow lights on MS medium with the addition of BAP at a concentration of 0.5 mg/L. Obtained microshoots of *Lilium pilosiusculum* were separated and transplanted for rhizogenesis initiation and for studying the adaptation of regenerants in the conditions of various soil substrates.

Key words. Bulb scales, *in vitro* culture, *Lilium pilosiusculum*, micropropagation, Yakutia.

Lilium L. – род травянистых растений семейства Лилейные (Liliaceae Juss.). Во флоре Республики Саха (Якутия) насчитывается 2 вида рода *Lilium*: *Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl., *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch. (Кузнецова, Захарова, 2012). *Lilium pilosiusculum* занесена в «Красную книгу Якутии» с категорией и статусом редкости «2 б», для которой численность популяции сокращается в результате чрезмерного использования их человеком и может быть стабилизирована специальными мерами охраны (Данилова, 2017).

Сохранение редких и исчезающих растений в данный момент является проблемой мирового масштаба. Несмотря на меры защиты, включая занесение данных групп растений в «Красную книгу» и создание особо охраняемых природных территорий, численность редких растений с годами сокраща-

ется. Необходимы подходы и приемы на основе клеточных биотехнологий. Современные технологии позволяют ускорять размножение с помощью клонального микроразмножения, что является эффективным методом для получения большего количества растений за короткие сроки и круглогодично. Полученные таким образом растения являются оздоровленными и свободными от вирусной инфекции. Эти растения отличаются мощным и активным ростом (Пугачева, Соклова, 2010; Ширина, 2018; Емельянова и др., 2019).

Целью исследования является изучение условий микрклонального размножения лилии кудреватой (*Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch.). Для введения *Lilium pilosiusculum* в культуру *in vitro* был собран растительный материал во время экспедиционных работ на территории Нюрбинского района Якутии в окрестностях г. Нюрба и с. Жархан в июле 2022 г. При щадящих условиях были изъяты образцы луковиц растения и собраны семена. Семенной материал был очищен, упакован и положен на хранение в условиях холодильника при +2...+4 градусов Цельсия. Луковицы содержали в почвенной смеси с места произрастания и хранили также в условиях холодильника.

Собранные семена были использованы для получения стерильных проростков объекта исследования. Для этого разработали два варианта стерилизации семян. При первом варианте семена обрабатывали 1 %-м раствором «Доместоса» в течение 5 мин с помывкой простерилизованной дистиллированной водой, затем 70 %-м этиловым спиртом в течение 1 мин. с дальнейшей трехкратной промывкой простерилизованной дистиллированной водой. Простерилизованные семена сушили в потоке воздуха в ламинарном боксе и производили посадку по 5 шт. семян на каждую чашку Петри с безгормональной питательной средой МС. На 21-е сутки наблюдали 60 % прорастание семян и развитие проростков. При втором варианте стерилизации семена обрабатывали 3 %-м раствором «Доместоса» в течение 5 мин. с промывкой простерилизованной дистиллированной водой. Далее семена окунали в 70 %-й этиловый спирт с Твином на 1 мин. с трехкратной промывкой простерилизованной дистиллированной водой. Простерилизованные семена после сушки сажали на безгормональную питательную среду МС в чашки Петри. Чашки размещали в условиях фитостеллажа. На 10-е сутки наблюдалось 80 %-е проклевывание семян и развитие проростков. Из полученных стерильных проростков использовали кусочки листьев для инициации роста культуры *in vitro*. Стерилизацию листовых эксплантов от проростков проводили 5 %-м раствором хлорсодержащего средства «Доместос» и 70 %-м этиловым спиртом. Листовые экспланты пересаживали на питательную среду МС, содержащую БАП (0,5 мг/л; 1 мг/л) и 2,4-Д (0,5 мг/л; 1 мг/л) на колбы объемом 150 мл в трех повторностях каждый вариант.

Чешуйки луковиц лилии кудреватой промывали водопроводной водой в течение 5–10 минут для удаления поверхностного загрязнения, ополаскивали дистиллированной водой (рис.).



Рис. Чешуйки луковицы *Lilium pilosiusculum*.

Затем подвергали стерилизации погружением в 70 %-й этиловый спирт в течение 1 мин., в 5 %-ый раствор «Доместоса» в течение 3 мин. с дальнейшим многократным промыванием стерилизованной дистиллированной водой. Обработанные чешуйки луковиц подсушивались в потоке воздуха в условиях ламинарного бокса. Посадку подготовленных чешуй луковиц проводили на твердые питательные среды в колбах и баночках на 250 мл. В качестве питательной среды для прорастания чешуек была взята среда Мурасиге-Скуга (МС), на 1 л брали: макросоли – 50 мл, микро-соли – 1 мл, Fe-хелат – 5 мл, инозит – 100 мг, витамины по Уайту – 1 мл, CaCl₂ 20 % – 1,75 мл, сахарозу – 30 г, агар – 12 г. В качестве регуляторов роста апробировали разные концентрации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и бензиламинопурина (БАП) (табл.).

Варианты питательной среды МС с добавлением фитогормонов

№	2,4-Д, мг/л	БАП, мг/л
1	-	0,5
2	-	1
3	1	-
4	2	-

После пересадки чешуек на питательную среду колбы и баночки размещали на фитостеллажи с режимом 16/8 (день/ночь) при комнатной температуре. На 14-е сутки на чешуйках луковиц наблюдалось прорастание и интенсивное побегообразование. Наиболее оптимальная инициация роста и развития побегов лилии кудреватой на основе чешуек луковицы наблюдалась при добавлении на питательную среду МС фитогормона БАП при концентрации 0,5 мг/л. Полученные микропобеги лилии кудреватой были посажены на корнеобразование с использованием фитогормона нафтилуксусной кислоты в разных концентрациях.

Таким образом, в рамках работы разработаны протоколы стерилизации семян, листовых эксплантов и чешуек луковиц, оптимизирован состав питательных сред для прорастания семян и инициации побегообразования *in vitro*. Масштабировано получение микроклонов *Lilium pilosiusculum*. Поставлены эксперименты по укоренению микроклонов и разрабатываются методы для дальнейшей адаптации растений-регенерантов в условиях открытого грунта.

Благодарности. Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда №22–14–20031, <https://rscf.ru/project/22-14-20031/>.

ЛИТЕРАТУРА

- Данилова Н. С.** Лилия кудреватая – *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Misch. // Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н. С. Данилова. – Москва: Изд-во «Реарт», 2017. – С. 129.
- Емельянова И. С., Большакова Е. В., Лукаткин А. С.** Влияние питательных сред и регуляторов роста на микроклональное размножение *Lilium cernuum* Kom. // Промышленная ботаника, 2019. – Вып. 19, № 3. – С. 64–68.
- Кузнецова Л. В., Захарова В. И.** Конспект флоры Якутии: Сосудистые растения. – Новосибирск: Наука, 2012. – 272 с.
- Пугачева Г. М., Соклова М. А.** Клональное микроразмножение лилий // Вестник Мич-ГАУ, 2010. – № 1. – С. 35.
- Ширнина И. В.** Особенности клонального микроразмножения и сохранения представителей семейства Liliaceae Juss. в культуре *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Материалы XI Междунар. конф. – Минск: Медисонт, 2018. – С. 270–271.