

Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, Л.В. Пронькина

Регенерация и ускоренное размножение лилейника *in vitro*

Изучены процессы регенерации и микро-размножения высокодекоративного лилейника сорта Алан, трудно размножаемого традиционными способами. Овладение процессами регенерации позволило разработать технологию его ускоренного размножения. В короткий срок получено необходимое количество посадочного материала высокого качества.

Материалы и методы работы

Объект исследования — лилейник (род *Heimerocallis*), сорт Алан (альый околоцветник), выращиваемый на опытном участке отдела декоративных растений Южно-Сибирского ботанического сада с 1992 г.

Первичный эксплант — фрагмент молодого побега с точкой роста, развившийся из почки возобновления текущего года. Побег изолировали в конце фазы бутонизации (начало августа).

Поверхностную стерилизацию проводили 0,1% раствором сулемы в течение 20 мин., затем четырежды промывали в стерильной дистиллированной воде.

Культивирование проводили на агаризованных (0,8% агар) основных питательных средах по прописям Мурасиге и Скуга (МС) и Гамборга В₅ [1], дополненных различными регуляторами роста: кинетином (К), 6-бензиламинопурином (БАП), α -нафтилуксусной кислотой (НУК), β -индолилмасляной кислотой (ИМК), гибберелловой кислотой (ГК). Питательные среды стерилизовали в автоклаве при давлении (0,9+0,1 атм). Все операции, требующие соблюдения условий стерильности, проводили в ламинар-боксе.

Процессы регенерации и размножения изучали в контролируемых условиях: фотопериод — 16/8 часов, температура — 25±1°C.

Субкультивирование проводили через 20-25 суток. Учитывали количество почек *de novo*; количество и длину побегов, корней.

Результаты и обсуждение

Высокодекоративные сорта лилейника традиционно размножают вегетативным способом — делением куста. Но такой способ характеризуется низким коэффициентом размножения. В некоторых случаях пользуются приемом, основанным на способности живых тканей к регенерации при нарушении

нормальных условий развития: срезают ростки у самого основания, чуть выше корневой шейки. Однако коэффициент размножения при таком подходе, по сравнению с традиционным делением куста, увеличивается незначительно — на 1,1 [2].

Проблему повышения эффективности размножения для многих видов растений решают методами культивирования изолированных органов и тканей. Эти методы являются мощным инструментом расширения возможности процессов регенерации, позволяют создавать технологии микроразмножения.

Для лилейника сорта Алан изучены особенности культивирования и регенерации на каждом из четырех этапов микроразмножения.

Этап введения в культуру *in vitro*: из-за недостаточного количества почек возобновления в культуру *in vitro* вводили единственный фрагмент побега с точкой роста. Поверхностная стерилизация прошла успешно. В течение первых трех пассажей первичный эксплант культивировали на среде МС с 20 мкМ БАП. За этот период удалось не только вывести точку роста из состояния покоя, но и индуцировать меристематические клетки, находящиеся в базальной части побега, к развитию почек *de novo*. Их сформировалось 12 штук.

В ряде исследований, посвященных проблемам изучения регенерации культивируемых вегетативных тканей, указывается на то, что для стимулирования регенерационных процессов целесообразно использовать не только цитокинины, но ГК и ауксин совместно [3; 4]. Поэтому почки, регенерировавшие *de novo*, отделяли и пассировали на подобранную эмпирическим путем среду МС+10 мкМ БАП+5 мкМ НУК+5 мкМ ГК. В этой среде в течение двух пассажей удалось получить 20-кратное увеличение количества регенерировавших почек. Но процессы регенерации почек *de novo* сопровождались развитием быстрорастущего каллуса. Уменьшение процесса каллусогенеза получили при замене основной питательной среды МС на В₅, где содержание азота значительно меньше, а регуляторы роста оставили в том же составе и той же концентрации. Темпы регенерации оставались на прежнем уровне.

На этапе собственно размножения, имея достаточное количество экспериментального материала, изучали действие цитокининов: К и БАП. В предварительном эксперименте было выяснено, что на коэффициент размножения оказывает влияние не природа цитокинина, а его концентрация. Далее был поставлен эксперимент по изучению влияния наиболее широко применяемого для размножения цитокинина БАП (табл. 1).

Таблица 1

Влияние БАП на инициацию и развитие почек лилейника сорта Алан in vitro (6-пассаж), n=12

БАП, мкМ	Количество почек de novo, шт.	Количество ведущих побегов, шт.	Высота ведущих побегов, мм	Каллусогенез (+, -)
0	0	1	10-12	-
1,0	1-2	1	25-30	-
2,0	1-2	1	18-25	-
5,0	2-3	1-2	18-20	-
10,0	8-12	5-7	10-12	-
15,0	10-15	8-10	10-12	-
20,0	18-22	15-20	6-8	+
30,0	20-25	20-25	4-5	+

Данные таблицы показывают, что БАП оказывает влияние как на коэффициент размножения, так и на рост и развитие почек: с увеличением концентрации БАП возрастает количество регенерировавших почек и количество ведущих побегов, но замедляется рост побегов в высоту. А при относительно высоких значениях БАП (20, 30 мкМ) наблюдали развитие конгломерата почек, имеющих примерно одинаковую высоту; развитие почек сопровождалось нежелательным развитием каллуса.

На основании этого эксперимента предложено два типа питательных сред для размножения: использование относительно высоких концентраций БАП (15-20 мкМ) — для увеличения коэффициента размножения, а относительно низких его значений (1-2 мкМ) — для дорастивания побегов перед использованием их на следующем этапе микроразмножения — этапе укоренения.

Для укоренения использовали побеги, достигшие в высоту не менее 20 мм, так как использование побегов меньших размеров или почек на среде для укоренения, содержащей ауксин, приводило к индукции каллусогенеза на базальной части.

Во многих работах показано, что использование обедненных по минеральному составу питательных сред, например 1/2 или 1/4, способствует лучшему развитию корневой

системы. Для некоторых видов растений даже не возникает необходимости вводить в состав питательной среды ауксины. В случае с лилейником укоренение также происходило на безгормональной среде В₅. Но в тех вариантах, где в качестве индуктора ризогенеза была использована ИМК, результаты были значительно лучше. Анализ эксперимента по укоренению, данные которого представлены в таблице 2, показал, что ИМК положительно влияет на ризогенез и развитие растений-регенерантов: увеличивается количество корней на эксплант, возрастает их длина, побеги достигают большей высоты. Более интенсивное развитие регенерантов требует наличия в питательной среде соответствующего количества минеральных солей. Поэтому более интенсивный рост регенерантов происходил на основной питательной среде полного состава, чем на редуцированной вдвое по минеральному составу.

Таблица 2

Влияние основной питательной среды и ИМК на рост и развитие растений-регенерантов лилейника сорта Алан in vitro, n=12

Среда	Начало ризогенеза, сутки	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Длина побега, мм	
				начало пассажа	конец пассажа
В ₅	25	1	0,2	20-25	30-35
1/2В ₅ +ИМК3 мкМ	15	2-3	20-30	20-25	40-45
В ₅ +ИМК3 мкМ	7	3-4	50-60	20-25	60-70

Сформированные растения-регенеранты можно было использовать на последнем этапе микроразмножения — акклиматизации к условиям выращивания in vivo: растения-регенеранты лилейника извлекали из пробирок, отмывали корни от агара и высаживали в песок. Накрывали полиэтиленовой пленкой, через неделю постепенно начинали открывать пленку и оставлять растения без укрытия на несколько минут. Затем интервал времени постепенно увеличивали. Через две недели все растения-регенеранты могли нормально расти и развиваться в обычных условиях.

В мае акклиматизированные растения-регенеранты лилейника были высажены на опытный участок отдела декоративных растений, где они успешно растут и развиваются.

Таким образом, трудности традиционного размножения высокодекоративного лилей-

ника сорта Алан были преодолены с помощью культуры тканей: успешное введение *in vitro* позволило изучить процессы регенерации и разработать технологию микро-размножения. Увеличение коэффициента размножения происходило в среде В₅ с 15-

20 мкМ БАП; доращивание побегов — в среде В₅ с 1-2 мкМ БАП; 100% укоренение — на среде В₅ с 3 мкМ ИМК. Растения-регенеранты характеризуются высокой степенью приживаемости в обычных условиях выращивания.

Литература

1. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
2. Попова К.С. Размножение лилейника гибридного почками возобновления в лесостепи Алтайского края//Тез. докл. Всерос. совещ. садоводов. Москва, 20-21 июня. М., 1995.
3. Ovesna J., Lhotova M. Study of callus growth and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue cultures//Sci. agr. bohemosl. 1987. V. 19. N 4.
4. Chuang M.J., Chang W-C. Embryoid formation and plant regeneration in callus cultures derived from vegetative tissues of *Dioscorea pleiantha* (Hance) Woodson//J. Plant Physiol. 1987. V. 128. N 3.

