

N E W S

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 65, Number 312 (2015), 36 – 42

INTRODUCTIOINAL CULTIVATION OF THE *Lilium martagon* L. BY THE BIOTECHNOLOGY METHOD

I. O. Baitulin, A. B. Myrzagalieva, A. M. Akzambek

East Kazakhstan State University named after S. Amanzholov, Ust-Kamenogorsk, Kazakhstan

Key words: biotechnology, explant, peroxidase, sodium hypochlorite.

Abstracts. Possibility of management by processes of regeneration by means of growth regulators is experimentally shown. The best inducers reclaiming processes at a stage actually reproduction is use as a part of the basic nutrient medium of certain concentration. The nursery of plants *Lilium martagon* L. which has been grown up in vitro which can be used for further reintroduction plants is created.

УДК.531.1.035; 502.33.338.26 (574)

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ И РАЗМНОЖЕНИЕ *Lilium martagon* L. МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

И. О. Байтулин, А. Б. Мырзагалиева, А. М. Акзамбек

Восточно-Казахстанский государственный университет им. С. Аманжолова, Усть-Каменогорск, Казахстан

Ключевые слова: биотехнология, эксплант, пероксидаза, гипохлорид натрия.

Аннотация. Экспериментально показана возможность управления процессом регенерации регуляторами роста. Показано, что лучшими индикаторами процесса регенерации *L.martagon* является использование в составе основной питательной среды определенных концентраций регуляторов роста.

Сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших задач в деле охраны природы, которой уделяют большое внимание во всем мире. Связано это с ограниченностью необходимых для существования человека биологических ресурсов и угрозой их истощения. На сегодняшний день особую актуальность имеют исследования по разработке методов сохранения растений, ареалы и численность которых резко снижается, а также для уникальных видов, расширяющих и улучшающих ассортимент возделываемых растений.

Актуальным направлением биотехнологий в настоящее время является сохранение и воспроизводство редких и исчезающих видов растений. Эти технологии позволяют ускорить размножение редких и исчезающих видов растений, нуждающихся в охране и рассчитаны на получение дополнительного источника сырья в виде каллусных тканей и суспензионных культур, а также растений-регенерантов для плантационного выращивания сырья ресурсных лекарственных растений. В последние годы методы культуры *in vitro* успешно используются для сохранения биоразнообразия растений. Длительное сохранение *in vitro* не только способствует депонированию ценных генотипов, но и является основой для изучения процессов морфогенеза и регенерации в культуре ткани и исследования процессов адаптации микроклонов к условиям *ex vitro*.

Целью настоящей работы явилось усовершенствование методики введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения *Lilium martagon*, находящегося под угрозой исчезновения лекарственного и декоративного вида флоры Казахстанского Алтая.

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по приоритетам развития науки на 2015-2017 годы на тему «Разработка биотехнологических способов сохранение эндемических и лекарственных растений в условиях *in vitro*».

Многочисленные виды и сорта рода *Lilium L.* Размножаются традиционными методами очень медленно: 3-5 луковичек в год, что значительно затрудняет возобновление популяций лилий в естественных условиях обитания. Метод микроклонального размножения лилий позволяет в короткие сроки получить необходимое количество растений и реинтродуцировать их в природную флору.

Материалы и методы

Объект исследования - *Lilium martagon* или лилия Кудреватая, многолетнее травянистое растение до 100 см высотой, вырастающее из желтой луковицы, состоящей из многочисленных мясистых чешуй. Растения, отобранные для введения в культуру, были собраны из естественных мест произрастания на Западном Алтае.

В работе придерживались общепринятых методик приготовления и стерилизации питательных сред, инструментов и оборудования.

Как исходный материал для биотехнологических исследований использовали чешуи с луковиц лилий. Стерилизацию питательных сред и работу в асептических условиях проводили согласно общепринятым рекомендациям [1]. Стерилизацию материала проводили по разработанным авторами схемам.

На начальном этапе исследования важно было подобрать оптимальные условия для стерилизации эксплантов *Lilium martagon*. Первичный эксплант должен быть полностью освобожден от всех микроорганизмов (бактерий, грибов, микоплазм и т.д.), и его дальнейшее существование *in vitro* требует поддержания абсолютной асептики, так как грибная и бактериальная инфекции ингибируют рост клеток и приводят культуру к гибели. Наиболее часто применяемыми для стерилизации эксплантов являются растворы гипохлорита натрия, пероксида водорода и спирта (таблица 1). Нами были отобран наиболее оптимальный способ стерилизации растительного материала.

В качестве материала для введения *Lilium martagon* в культуру *in vitro* использовали сегменты чешуй луковиц, собранных в естественных местах произрастания в период с мая по июль. Луковицы освобождают от кроющих чешуй, промывают их проточной, водопроводной водой в течение 15-20 минут с применением моющего средства. Все эти манипуляции проводят в нестерильных условиях.

Стерилизующий раствор необходимо периодически перемешивать, так как чем интенсивнее перемешивание, тем эффективнее идет процесс стерилизации.

После инкубации эксплантов в стерилизующем растворе их промывают в 2-4 порциях стерильной водой по 10 минут в каждой. Простерилизованные и промытые объекты помещают в чашки Петри на стерильные фильтры.

После полной стерилизации объекта экспланты размером $0,5 \times 0,5$ см помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением агара и сахарозы. Культивирование регенерантов производили в биологических пробирках объемом 100 мл. Часть эксплантов культивировали в культивационном помещении при температуре $23\text{--}25^{\circ}\text{C}$, при 16-ти часовом фотопериоде, освещенности 3,5-4 тыс. люкс и относительной влажности 70-80%, часть эксплантов – сначала в темноте в течение 6 недель при температуре 25°C , затем при 16-ти часовом фотопериоде.

В качестве регуляторов роста использовали 6-бензиламинопурин (БАП), 3-индолилуксусную кислоту (ИУК).

На этапе введения в культуру нами проводилось испытание нескольких вариантов концентраций фитогормона 6-бензиламинопурина (6-БАП) в питательной среде:

- 1) среда Мурасиге-Скуга безгормональная (контроль);
- 2) среда Мурасиге-Скуга с концентрацией 0,3 мг/л 6-БАП;
- 3) среда Мурасиге-Скуга с концентрацией 0,4 мг/л 6-БАП;
- 4) среда Мурасиге-Скуга с концентрацией 0,5 мг/л 6-БАП;
- 5) среда Мурасиге-Скуга с концентрацией 1,0 мг/л 6-БАП.

Образовавшиеся луковички и регенеранты из adventивных чешуй, в случае отсутствия контаминации, через 1,5-2 месяца пересаживают на свежую питательную среду, и вновь самостоятельно культивируют..

В ходе экспериментов *in vitro* учитываются влияние состава питательной среды, в частности фитогормонов, на показатели роста и развития регенерантов: коэффициент размножения; образованием регенерантов с учетом их числа на экспланте и числа эксплантов, проявивших морфогенетические реакции; длина регенерантов; число образовавшихся луковичек [2].

Укоренение *Lilium martagon*. Ризогенез – следующий важный этап в технологии клonalного микроразмножения. На этапе ризогеза концентрацию сахарозы снижают до 20 мг/л [59]. Этот прием способствует постепенному привыканию микростенов к дальнейшему питанию на собственных корнях в нестерильных условиях [7].

Степень укореняемости сортов в зависимости от концентрации ауксина была изучена с помощью следующих вариантов опыта:

- 1) полный минеральный состав по Мурасиге-Скуга:
 - а) безгормональная (контроль);
 - б) 0,5 мг/л β-индолилуксусная кислота (ИУК);
 - в) 1,0 мг/л ИУК;
- 2) 1/2 минерального состава по Мурасиге-Скуга:
 - а) безгормональная;
 - б) 0,5 мг/л ИУК;
 - в) 1,0 мг/л ИУК.

Через 3-4 недели после пересадки на укоренение проводится оценка результатов: регенерацию листьев, побегов, корней (количество, длина, наличие корневых волосков).

Коэффициент вегетативного размножения устанавливали путем подсчета образовавшихся дочерних лукович на эксплантах из одной материнской луковицы через два - четыре месяца вегетации.

Динамику роста определяли путем измерения высоты растений.

Адаптация укоренных пробирочных растений к условиям почвенного субстрата является одним из ответственных этапов в процессе клonalного микроразмножения. Растения осторожно вынимают из пробирок пинцетом с длинными концами. Корни отмывают от остатков агара, растения на короткое время опускают в 1%-ный раствор KMnO_4 и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный в автоклаве при температуре 120°C (1,0 атм.) в течение 1-2 часов. Перед посадкой субстрат обрабатывают слабым раствором KMnO_4 [59].

Пересадку растений проводили в почвенную смесь следующего состава: почвогрунт («Terra Vita») - почвенная смесь, состоящая из высококачественных верховых торфов различной степени разложения с добавлением структурирующих компонентов - очищенного речного песка и агроперлита.

Для лучшей приживаемости необходимо соблюдать следующие условия: влажность воздуха в начальной период 90-100%, температура 22-25⁰С, 16-ти часовой световой день с освещенностью 3-5 тыс. лк [3].

Для предотвращения потери воды микрорастениями необходимо поддерживать высокую влажность воздуха в области его надземной части. Это достигается использованием пластмассовых стаканчиков (микротелички), которыми прикрывают высаженные растения (рисунок 1). Высокую влажность необходимо поддерживать не менее 3-4 недель, постепенно приоткрывая стаканчик с 3-4 дня. Сначала приоткрывают на 5-10 минут, далее время увеличивают [4].



Рисунок 1 – Молодые сформировавшиеся растения *L.martagon* переведенные из условий *in vitro* в *ex vitro*

Для активного роста и развития следует 1 раз в 7-10 дней растения подкармливать разбавленным в 2-3 раза раствором Мураисге-Скуга.

Через 4-5 недель определяется процент приживаемости растений, характер роста и развития.

Математическую обработку осуществляли на основе дисперсионного анализа. Анализ данных проведен на компьютерных программах MS Excel.

Результаты и их обсуждение

В проведенных нами исследованиях отмечено, что успех введения в культуру *in vitro* тканей определяется эффективностью стерилизации. В соответствии с таблицей 1, стерилизующие агенты оказывают значительное влияние на степень приживаемости эксплантов на питательной среде и на число получаемых растений-регенерантов.

Как показал сравнительный анализ действия стерилизующих агентов, наименьшим эффектом стерилизации обладал водный раствор бытового препарата «Белизна», где бактериальная и грибная инфицированность эксплантов составляла 34,2%, степень стерильности – 65,8%. Действие на жизнеспособность меристемы отмечена на уровне 36,2%.

Применение раствора пероксида водорода обеспечивало больший стерилизующий эффект материала – 67,9 %, инфицированных эксплантов – 32,2%. В опыте отмечено самое жесткое действие данного дезинфицирующего агента на жизнеспособность меристематических верхушек, где количество жизнеспособных регенерантов не превышало 19,3%.

Таблица 1 – Результативность стерилизации при введении в культуру *in vitro* эксплантов *L.martagon*

Прием асептики	Эффект действия стерилизации, %	Среднее по сортам
Гипохлорит натрия (1:3; 20 мин.)	стерильность	72,2
	жизнеспособные экспланты	38,6
	погибшие экспланты	61,4
	инфицированные экспланты	27,8
«Белизна» (1:3; 5 мин.)	стерильность	65,8
	жизнеспособные экспланты	36,2
	погибшие экспланты	63,8
	инфицированные экспланты	34,2
Пероксид водорода (3 %; 5 мин.)	стерильность	67,9
	жизнеспособные экспланты	19,3
	погибшие экспланты	80,7
	инфицированные экспланты	32,2
95 % этанол (1,5 мин.)	стерильность	43,4
	жизнеспособные экспланты	61,5
	погибшие экспланты	38,5
	инфицированные экспланты	56,6

Использование только одного вида стерилизующего вещества не являлось эффективным. Наиболее оптимально использование комплекса стерилизующих веществ. Так, серия опытов по отработке схемы стерилизации чешуй луковиц выявила, что наилучшей оказалась следующая. Стерилизацию эксплантов луковиц лилий (чешуи) проводили в септических и асептических условиях. Сначала чешуи луковиц промывали проточной водой, затем теплой мыльной водой, погружали в 95% этанол на 1,5 минуты. Выдерживали в 0,5% гипохлорите натрия 20 минут, после чего промывали в трех порциях стерильной дисциллированной воды в течение 20 минут для удаления загрязнений. При использовании, таких комбинаций стерилизующих растворов, для эксплантов луковиц достигнута 80-90 %-ная стерильность.

Через 19 дней культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование меристематических очагов, а через полтора месяца начинали формироваться адVENTивные почки и побеги. Также было отмечено, что экспланты из базальной части чешуй образуют быстрее и в два раза больше луковиц, чем экспланты из дистальной части. Культивирование в темноте способствовало образованию луковичек. При культивировании на свету образуются адVENTивные почки с развитием листьев.

В эксперименте нами было изучено влияние концентраций фитогормонов 6-БАП и кинетина на возобновление развития и роста меристематических эксплантов и образование ими дополнительных побегов.

Для растений лилии кудреватой, в соответствии с таблицей 2, было показано, что фрагменты чешуй из базальной и верхушечной части по-разному реагируют на присутствие в питательной среде регуляторов роста.

Таблица 2 – Реакция эксплантов лилии кудреватой на этапе введения в культуру *in vitro* на состав питательной среды

Питательная среда	Длина листа, см	Количество листьев, шт./побег	Ширина листа, см	Коэффициент размножения
Безгормональная*	1,2	1,8	0,5	1,0
6-БАП 0,3 мг/л	0,5	2,2	0,3	1,5
6-БАП 0,4 мг/л	0,2	1,1	0,4	1,5
6-БАП 0,5 мг/л	0,4	1,2	0,5	1,4
6-БАП 1 мг/л	1,1	2,9	0,7	2,4

* Контроль.

Интенсивное развитие вегетативных органов *L.martagon* отмечено на питательной среде с концентрацией 6-БАП 1 мг/л, слабое – с концентрацией 6-БАП 0,4 мг/л. Повышение концентрации более 1 мг/л оказывает угнетающее воздействие на рост и развитие.

Наблюдения за динамикой образования микролуковиц показали, что на экспланте их образуется от 1 до 6. Они образуются не одновременное, а последовательно, что осложняет технологический процесс разновозрастным составом микролуковиц показано на рисунке 2.



Рисунок 2 – Регенеранты разного размера, образовавшиеся на одном экспланте

Изучением особенностей элементов технологии клонального микроразмножения выявлено, что основные причины, снижающие его эффективность связаны с этапом введения эксплантов в культуру *in vitro* и адаптацией растений-регенерантов к нестерильным условиям.

Интенсивное развитие тканей экспланта на этапе введения *in vitro* происходит при концентрации фитогормона 6-бензиламинопурина 1 мг/л, слабое – при 0,4 мг/л. Коэффициент размножения колеблется в пределах от 1,0 до 2,4.

Концентрация 0,4 мг/л оказывает более интенсивное влияние на fazu развития меристематических эксплантов, тогда как регенеранты на питательной среде без гормонов характеризовались низким уровнем роста и развития.

Анализ влияния концентрации цитокининов показал, что наибольший показатель коэффициента размножения отмечен на питательной среде при использовании 1,5 мг/л 6-бензиламинопурина, сочетания фитогормонов 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л кинетина, низкий – при 0,4 мг/л 6-бензиламинопурина, 5 мг/л кинетина.



Рисунок 3 – Растения *L.martagon*, полученные в пробирках и высаженные в питомник

Сокращение концентрации минеральных элементов негативно сказалось показателе коэффициента размножения и на показателях роста и развития растений-регенерантов.

Активное протекание процесса ризогенеза происходит на питательной среде при концентрации β -индолилуксусной кислоты 1 мг/л.

Уменьшенное содержание минеральных солей в питательной среде способствует уменьшению процента укоренения микрорастений, но более интенсивному развитию корневой системы.

Укорененные и прошедшие адаптацию в лабораторных условиях растения в июне месяце были высажены в открытый грунт. В течение лета растения показали хорошую приживаемость, образовали по 1-2 новых листа. По результатам замеров от 03.09.15 года длина листа составила 14 см \pm 0,02 см, ширина листа 1,2 \pm 0,06 см, число листьев 3,4 \pm 0,05, размер луковицы 0,6 \pm 0,02 см.

Выводы:

1. Экспериментально показана возможность управления процессами регенерации с помощью регуляторов роста. Лучшими индукторами регенерационных процессов на стадии собственно размножения является использование в составе основной питательной среды определенных концентраций. Создан питомник растений *L.martagon*, выращенных *in vitro*, который может быть использован для дальнейшей реинтродукции растений.

2. Разработанные приемы получения растений-регенерантов *L.martagon* методами биотехнологии могут быть использованы для сохранения генофонда в коллекциях *in vitro*; адаптированные к условиям выращивания *ex vitro* регенеранты редких и исчезающих видов флоры Казахстанского Алтая - для интродукции и реинтродукции, уникальных видов растений - для селекции и получения высококачественного посадочного материала.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. «Технология микроклонального размножения растений». Наукова думка, 1992;
- [2] Деменко В. И. Проблемы и возможности микроклонального размножения садовых растений. Введение в культуру / В. И. Деменко // Известия ТСХА. - 2005. - №2. – С. 48-58
- [3] Катаева Н.В., Р.Г. Бутенко. Клональное микроразмножение растений / - М.: Наука, 1983;
- [4] Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Под ред. Е. Н. Джигадло – Орел : ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 51 с.

REFERENCES

- [1] Kalinin F.L., Kushnir G.P, Sarnatskaya V.V. Technology of the microclonal reproduction of plants». Naukova dumka, 1992. (in Russ.).
- [2] Demenko V.I. Problems and possibilities of microclonal reproduction of garden plants. Introduction in culture / V.I. Demenko // News TAA. - 2005. - №2.P. 48-58. (in Russ.).
- [3] Kataeva N.V., Butenko R.G. Clonal microreproduction of plants / - M: a science, 1983. (in Russ.).
- [4] Methodical recommendations about use of biotechnological methods in work with fruit, berry and decorative cultures / Under the editorship of E.N. Dzhigadlo - Orel: GNU VNIISPK, 2005. - 51 p. (in Russ.).

***Lilium martagon* МӘДЕНИЕТІ МЕН КӨБЕЮНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯДАҒЫ ТӘСІЛДЕР АРҚЫЛЫ КІРІСПЕ**

Байтулин И.О., Мырзагалиева А.Б., Ақзамбек А.М.

С. Аманжолов атындағы Шығыс Қазақстан мемлекеттік университеті, Өскемен, Қазақстан

Тірек сөздер: биотехнология, эксплант, пероксидаза, натрий гипохлориді.

Аннотация. Регенерация процессін өсуді реттегіштер арқылы басқару мүмкіндігі тәжірибе түрінде көрсетілген. *L.martagon* регенерация процессінің ең үздік индикаторлары негізгі нәрлі орта құрамындағы белгілі бір өсуді реттегіштер концентрацияларын пайдалану болып табылатындығы көрсетілген.

Поступила 05.11.2015 г.