

**А.В.Ки.Льчевский**, член-корреспондент ААН РБ, доктор биологических наук, профессор  
**В.В.Французб.ЧОК**, ассистент

Белорусская сельскохозяйственная академия

УДК 631.53:635.9:582.572.228

## Размножение лилий в культуре *in vitro*

*В статье рассматриваются результаты экспериментов по размножению различных сортов Азиатских Гибридов лилий в культуре *in vitro* и переносу регенерантов в нестерильные условия. Лучшей является питательная среда Мурашиге - Скуга, а из фитогормонов а - НУК. Концентрация ауксина зависит от сортовых особенностей. На первом этапе наибольший процент регенерации эксплантов и максимальная масса луковичек были при 0,1 мг/л а - НУК. На втором этапе концентрацию необходимо повысить до 0,5 мг/л. б - БАЛ не оказывал положительного влияния на пролиферацию эксплантов. На первом и втором этапах культивирования концентрацию сахарозы необходимо повышать до 60 г/л. Оптимальная освещенность эксплантов - 1000 люкс. При переносе регенерантов *in vivo* высокая приживаемость наблюдалась на верховом торфе (рН 6,0), а также его смеси с песком и перлитом. При доращивании растений необходимо вносить удобрения, содержащие азот в аммонийной форме.*

*The article deals with the results of the experiments on the propagation of various varieties of Asiatic Hybrids of lilies in culture *in vitro* and the transfer of regenerates in non sterile conditions. The best media was found to be Murashige and Skoog, and from phytohormones a - NAA. Auxine concentration depends on variety particularities. At the first stage the highest regeneration coefficient of explants and maximum bulb mass were when NAA was 0,1 mg/l. At the second stage the concentration was to be increased up to 0,5 mg/L. BA did not produce any positive effect on explant proliferation. At the first and second stages of cultivation sucrose concentration should be increased to 60 g/L. Optimal explant lighting is 1000 lux. In transplanting regenerates *in vivo* high resistance was registered on sphagnum peat (pH 6,0), as well as its mixture with sand and perlite. If additional growing is necessary, fertilisers are required containing nitrogen in the form of ammonia, j*

Достойное место среди декоративных культур по праву принадлежит лилиям. Благодаря высокой декоративности, универсальности и простоте возделывания культура сыскала большую популярность во всем мире. Несомненный интерес представляют лилии для условий нашей республики как важная декоративная культура. Почвенно-климатические условия Беларуси благоприятны для возделывания многих форм лилий, в особенности Азиатских Гибридов, отличающихся зимостойкостью и неприхотливостью. Для цветоводческих хозяйств очень важным является то, что лилии с большим успехом используются для выгонки в зимнее время. Это позволяет заметно расширить ассортимент цветочной продукции в "мертвый сезон". К тому же, выгонка лилий экономически очень выгодна по той причине, что продолжительность ее составляет в среднем 70-90 дней, а плотность посадки очень высокая. Следовательно, затраты, связанные прежде всего с отоплением и освещением, будут сравнительно низкими. Несмотря на многие достоинства культуры и быстро растущую популярность, производство лилий в Беларуси находится практически на нулевом уровне. Это связано, в первую очередь, с недостатком посадочного материала современных сортов. Традиционные методы вегетативного размножения не позволяют получить достаточное количество качественного посадочного материала. В этом случае существует опасность распространения с посадочным материалом бактериальных, грибных и вирусных заболеваний, представляющих большую опасность для культуры. Поэтому как альтернативу традиционным методам размножения во многих странах рассматривают метод *in vitro*. Этот метод позволяет более эффективно и исключительно быстро размножить растения вне

зависимости от погодных условий и сезона, обходиться без маточных насаждений, а также препятствовать распространению заболеваний с посадочным материалом.

В мировой практике интерес к ускоренному размножению лилий возник еще в конце 50-х годов, однако наиболее активные исследования начали проводиться в конце 70-х - начале 80-х годов учеными Голландии, США, Японии и других стран.

Одни исследователи строили схемы массового размножения лилий *in vitro* на основе прямой регенерации луковичек из эксплантов маточных растений [4,5,7,8]. Другие же отдавали предпочтение каллусной культуре, из которой в дальнейшем регенерировали целое растение [5]. По данным J.A. Simmonds и B.G. Cumming [5], из одного грамма каллуса за год можно получить  $6 \times 10^2$  растений. Несмотря на столь высокий коэффициент размножения, большинство исследователей предпочитают прямой метод. Это объясняется рядом особенностей каллусной ткани, среди которых, в первую очередь, учитывается вероятность потери сортовой чистоты в результате мутаций. Необходимо отметить, что подавляющее большинство зарубежных работ посвящено изучению размножения *in vitro* лилий из разделов Восточные и Длинноцветковые. Сорты данных групп представляют большую ценность в декоративном и коммерческом отношении, однако для условий республики они не имеют столь большого значения по причине их недостаточной зимостойкости. Предлагаемые в некоторых работах [7,8] схемы микрклонального размножения лилий являются, на наш взгляд, сложными и малопримлемыми для промышленных лабораторий. Рекомендуемые дозы регуляторов роста для этих методик находятся в интервале от 0,01 до 10 мг/л. Данные различных иссле-

дователей по этому вопросу, как и по ряду других, порой довольно противоречивы. В связи с этим целью наших исследований была оптимизация основных этапов микроклонального размножения лилий.

Весь процесс микроклонального размножения растений, как правило, разграничивается на три-четыре этапа. Для лилий главной задачей на первом этапе - этапе введения в культуру *in vitro* - является получение стерильной пролиферирующей культуры. На втором этапе - этапе размножения - обеспечивается быстрое увеличение коэффициента размножения посредством создания оптимальных условий культивирования и правильного выбора вида и концентрации экзогенных гормонов. Здесь возможны два пути: 1) стимуляция образования адвентивных луковичек с помощью только ауксинов; 2) стимуляция образования адвентивных видоизмененных побегов в виде своеобразных конгломератов посредством высокой концентрации цитокининов. Каждый из этих путей имеет свои преимущества и недостатки. Третий этап - этап укоренения или получения нормально сформированных луковичек - необходим для растений, размножавшихся по второму пути. Последним этапом является перенос регенерантов в нестерильные условия. Перенос растений *in vivo* сопряжен с рядом сложностей, требует учета сортовой специфики и при неправильном проведении может свести все усилия к нулю.

В Белорусской сельскохозяйственной академии на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии и экологии впервые в республике разработана технология массового размножения лилий *in vitro*, которая может быть использована для промышленного производства посадочного материала. По предлагаемой схеме размножались сорта из разделов Восточные, Кандидум, Трубочатые и Азиатские Гибриды. В данной статье рассматриваются только результаты экспериментов с рядом сортов Азиатских Гибридов, ввиду наибольшей значимости их для нашей республики.

Культивирование *in vitro* осуществляется в асептических условиях. Поскольку лучшим источником эксплантов при введении в культуру являются луковичные чешуи, то стерилизация представляет определенные сложности. Для их преодоления необходимо здоровые, без явных механических повреждений чешуи тщательно промыть водой и не менее 0,5 ч обработать в 0,01%-ном растворе детергента (Твин-20 и др.). В качестве антисептика могут с успехом использоваться гипохлорит кальция или натрия, хлорамин, 70%-ный этанол. В наших экспериментах лучшие результаты получены при стерилизации 3%-ным раствором пшохлорита кальция с экспозицией 20 мин. Апикальная часть чешуи характеризуется низкой способностью к регенерации [1], поэтому в качестве экспланта не используется. Важно правильно сориентировать эксплант на поверхности питательной среды, поскольку у лилий луковички образуются только на внутренней поверхности чешуи. Для более быстрого и полного выявления инфекции первичные экспланты лучше высаживать на питательную среду Зао [цит. по 2] или Мурасиге - Скуга [9], дополненную гидролизатом лак-

тальбумина. В этом случае уже на третий день выявляется большая часть инфицированных эксплантов. Одним из важнейших условий получения успешно пролиферирующей культуры является правильный выбор питательной среды, вида и концентрации экзогенных гормонов. При микроклональном размножении лилий наиболее употребимыми являются а - нафтилуксусная кислота (НУК) и б - бензиламинопуридин (БАП). Нами изучены следующие концентрации НУК и БАП - 0; 0,1; 0,5 и 1 мг/л как в отдельности, так и в сочетании (16 вариантов). Эксперимент, проведенный с сортами Sun Ray и Тгоjan, показал, что предпочтение следует отдавать НУК. При концентрации 0,1 мг/л процент регенерировавших эксплантов был наибольшим. При сравнительно большом коэффициенте размножения (3,1-7,8) масса луковичек была максимальной (50-70). Добавление в питательную среду БАП незначительно повышало коэффициент размножения. Более ощутимо это было только в вариантах с НУК. Однако луковички формировались мелкие, часто аберрантно развитые, особенно при концентрации БАП 0,5 мг/л и выше.

Заметное влияние на пролиферацию эксплантов оказывает сахароза. Увеличение концентрации с 30 до 60 г/л повышает коэффициент размножения на 15-27% и массу луковичек на 25-62%. При выборе питательной среды изучены два состава: среда Мурасиге - Скуга (MS) и ее модификация (MS\*) с изменениями J.A. Simmonds и B.G. dimming [6], а также В. А. Румынина и А.Г. Слюсаренко [3]. Экспланты сорта Тгоjan хорошо развивались на обеих средах, а Sun Ray - на среде MS. Реакция других сортов, с которыми проводилась работа, на состав питательной среды и различные концентрации НУК показана в таблице 1. Питательная среда MS была лучшей для всех сортов. Все показатели были здесь заметно выше, чем на среде MS\*. Выявлены существенные сортовые различия по отношению к концентрации НУК.

Эксперимент по подбору гормонального состава для этапа размножения проводился с сортами Медунца и Эстафета. Изучались следующие концентрации НУК - 0; 0,1; 0,5 и 1 мг/л, БАП - 0; 0,1; 0,5; 1 и 5 мг/л как в отдельности, так и в сочетании (20 вариантов). Результаты эксперимента представлены в таблице 2. Показано, что на этапе размножения предпочтение также следует отдать НУК. У обоих сортов при концентрации 0,5 мг/л наблюдается оптимальное сочетание всех показателей. В данном эксперименте БАП практически не влиял на коэффициент размножения, а при концентрации 0,5 мг/л и выше во всех вариантах без НУК оказывал отрицательное влияние. В этих случаях экспланты регенерировали только одни листья либо каллус (при высокой концентрации БАП).

Данный эксперимент показал, что луковички формируются довольно мелкие - 15-30 мг. Работать с ними по этой причине сложно. Поэтому был проведен опыт по изучению влияния различной концентрации сахарозы и гидролизата казеина на массу адвентивных луковичек. В результате установлено, что максимальная масса луковичек и наибольший коэффициент размножения могут быть достигнуты при концентрации сахарозы 60

Таблица 1. Реакция различных сортов лилий на состав питательной среды и разные концентрации НУК

Сорт	Показатели	Среда MS			Среда MS*
		0,1 мг/л НУК	0,5 мг/л НУК	/ мг/л НУК	0,1 мг/л НУ К
Медуница	% регенерации	88,9	81,4	79,1	54,7
	Коэффициент размножения, шт./эксплант	4,9	4,8	3,9	2,1
	Средняя масса луковички, мг	79,6	56,0	60,2	25,7
Эстафета	% регенерации	91,3	80,0	81,3	50,0
	Коэффициент размножения, шт/эксплант	8,4	10,9	8,5	5,3
	Средняя масса луковички, мг	56,3	39,9	43,3	20,0
Эмилия	% регенерации	85,3	84,5	83,5	78,5
	Коэффициент размножения, шт/эксплант	7,9	9,9	11,8	6,3
	Средняя масса луковички, мг	57,4	50,9	44,3	41,2
Виринея	% регенерации	95,4	90,1	86,0	45,4
	Коэффициент размножения, шт/эксплант	5,1	6,3	7,2	4,5
	Средняя масса луковички, мг	68,5	62,8	46,7	29,6
Болгария	% регенерации	90,0	85,2	78,3	60,8
	Коэффициент размножения, шт/эксплант	5,4	6,1	6,3	3,8
	Средняя масса луковички, мг	47,7	46,4	46,3	44,9
Пелеринка	% регенерации	86,8	73,9	64,3	78,2
	Коэффициент размножения, шт/эксплант	5,8	5,9	6,4	4,4
	Средняя масса луковички, мг	49,8	39,7	35,3	19,7

Таблица 2. Влияние НУК и БАП на пролиферацию эксплантов на этапе размножения лилий in vitro

Гормоны, мг/л		Сорт					
НАА	ВА	Эстафета			Медуница		
		% регенерации	коэффициент размножения, шт.	средняя масса луковички, мг	% регенерации	коэффициент размножения, шт.	средняя масса луковички, мг
0	0	89	1.3	15.7	83.3	1.6	22.1
0.1	0	93.7	2.6	25.8	85.7	2.1	35.8
0.5	0	100	2.9	37.3	98	2.5	49.6
1	0	100	2.7	30.9	98	2.2	39.3
0	0.1	Луковичек нет, растения образуют только листья					
0.1	0.1	93.7	2.3	22.1	95	2.4	30.1
0.5	0.1	100	2.4	24.2	85	2.5	25.4
1.0	0.1	100	2.2	19.5	85	2.4	22.9
от 0 до 1	0.5 до 5	Регенерации луковичек не отмечено. Образуются листья, отдельные инициалии, каллус					

г/л. При более низкой и высокой концентрации эти показатели уменьшаются. Гидролизат казеина не способствовал заметному увеличению массы луковичек.

Важное влияние на пролиферацию эксплантов лилий оказывает интенсивность света. Эксперименты, проведенные с сортами Медуница и Эстафета, позволили сделать вывод, что оптимальной является освещенность 1000 лк.

Растения лилий, регенерировавшие на питательной среде MS, содержащей 60 г/л сахарозы и НУК в пределах 0,1-1 мг/л, имеют крупные луковички массой более 50 мг, хорошо развитые корни и листья. В этом случае не требуется специального этапа укоренения растений in vitro. Такие растения, перенесенные в условия in vivo, хорошо адаптировались в культуральной комнате на верхнем торфе (рН 6,0) или его смеси с песком и перлитом (1:1). Приживаемость растений была около 100%. После укоренения в субстрате в течение 4-5 недель растения были готовы к посадке в теплицу.

При доращивании регенерантов лилий в условиях пленочной теплицы важно создать подходящий почвенный субстрат. Это могут быть хорошо окультуренная

дерновая почва либо субстраты на основе верхового торфа. Установлено, что заметное влияние на рост и развитие доращиваемых растений оказывают минеральные подкормки. В первую очередь это касается формы азота. Предпочтительным является аммонийный азот. В нашем эксперименте при всех равных дозах элементов питания форма азота оказывала более существенное влияние на массу луковиц, нежели наличие или отсутствие в удобрениях ионов хлора (табл. 3).

За четыре месяца доращивания в условиях пленочной теплицы растения формировали относительно крупные луковицы, часть из которых в следующем году давала цветущие стебли. Таким образом, полученные in vitro растения лилий раздела Азиатские Гибриды требуют доращивания до товарной (цветущей) луковицы в течение двух лет.

Предлагаемая нами технология позволяет получить за один год из одной материнской луковицы среднего размера более 500 000 растений и может быть использована для ускоренного размножения ценных сортов лилий для цветоводческих хозяйств республики.

**Таблица 3.** Влияние минеральных подкормок на рост и развитие доращиваемых после *in vitro* луковиц лилий

Сорт	Средняя масса луковиц, г			
	Вариант 1*	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Пелеринка	1,50	1,06	1,12	1,19
Эмилия	1,65	1,29	1,24	1,27

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Н.В. Размножение лилий культурой изолированной ткани// Декоративное садоводство в Центр, чернозем, зоне РСФСР: Сб. науч. тр. ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина-Мичуринск, 1984.С.27-30.
- 2.Иванович А.А. Разработка основных элементов технологии микрклонального размножения голубики высокой: Дис. ... канд. с.-х. наук: /Белорус, с.-х. акад. 06.01.05.-Горки, 1994-149с.
3. Румынии В. А.,Слюсаренко А.Г. Масс - клональное размножение лилий//Бюл. Гл.ботан.сада -1989-Вып. 153-С.62-69.
- 4, Novak F.J., Petru E.Tissue culture propagation of Lilium hybrids//Sci. hort. 1981. vol. 14. P. 191-199.

\*Схема  
эксперимента

Вариант	Элементы питания		
	Азот	Фосфор	Калий
1	(NH <sup>+</sup> SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Ca(H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ca(H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	KCl
	NH <sub>4</sub> N0 <sub>3</sub>	Ca(H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

5. Stimart D.P., Asher P.D.Tissue culture of bulb-scale sections for asexual propagation of Lilium longiflorum Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1978. vol. 103. P. 182-184.
6. Simmonds J.A., Cumming B.G. Propagation of Lilium hybrids. 2.Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates//Sci. hort. 1976.Vol. 5. P. 161—170.
7. Takayama S., Misawa M. A scheme for mass propagation of Lilium *in vitro*// Sci. Hort. 1983. vol. 18. P.353-362.
8. Takayama S., Misawa M. The mass propagation of Lilium *in vitro* by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and by shake culture// Can.J.Bot. 1983. vol. 61. P.224-228.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// Physiol. plant. 1962. vol.15. P.473-497.