

Таким образом, развитие растениеводства Алтайского района в составе АЭТРЗ может быть успешным, может внести весомый вклад в аграрную экономику Алтайского края при реализации, как минимум, следующих положений:

1) на всех площадях сельскохозяйственных угодий будут соблюдаться принципы севооборота или пастбищеоборота;

2) во всех хозяйствах будет налажена под руководством специалистов райсельхозуправления система семеноводства;

3) растениеводство района будет инвестировано и адаптировано к работе в составе Алтайской экономической туристско-рекреационной зоны.

#### Библиографический список

1. Микуров О. «Бирюзовая Катунь»: как реализуется проект / О. Микуров // Алтайская правда. № 114 (26306). 22 апреля. 2008.

2. Мусохранов В.Е. Отчет о научно-исследовательской работе «Рекомендации по рациональному использованию пастбищ в низкогорьях Алтайского района» / В.Е. Мусохранов, А.Г. Тараканов, Н.В. Ревякина // Рукопись. НИИГП. Барнаул, 1993. 110 с.

3. Заключительный отчет о количестве и качестве высеванных семян в хозяйствах Алтайского района в 2007 году / ФГУ «Россельхозцентр» по Алтайскому краю, 2007.



УДК 582.572

А.Ю. Набиева,  
О.В. Дорогина

### ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* *LILIAM MARTAGON L. SUBSP. PILOSIUSCULUM (FREYN)* *ILJIN EX B. FEDTSCH.* С ПОМОЩЬЮ СПЕЛЫХ И НЕСПЕЛЫХ СЕМЯН

#### Введение

Рассматриваемый в данной работе подвид *L. martagon ssp. pilosiusculum* – слаболопастный в Западной и Восточной Сибири абсолютно преобладает при отсутствии других подвидов, совместно с типовым подвидом он отмечен только в бассейнах рек Вятки и Камы, тогда как на остальной европейской части России он не обнаружен; вне территории России встречается в Монголии [1]. Численность популяций данного подвида заметно сокращается в результате возрастающего воздействия антропогенного фактора, особенно активно он уничтожается вблизи больших городов как декоративное и лекарственное растение. Данный подвид включен в Красную книгу Иркутской области (2001), Красную книгу Республики Саха (2000) [2, 3].

Ежегодно у особи созревает только одна почка возобновления [4]. Диссеминация наступает с растрескивания коробочек с середины августа. Семенная продуктивность особей данного подвида

сравнительно невелика [5]. Известно, что спелые семена ко времени диссеминации имеют недоразвитый, слабодифференцированный зародыш. Семена лилий секции *Martagon* имеют глубокий морфофизиологический покой, обусловленный наличием ингибиторов и недостаточной газопроницаемостью тканей, окружающих зародыш [6]. Общепринятой является точка зрения, что семена лилий прорастают после завершения дифференциации зародыша [7].

Сеянцы подвида в культуре зацветали на 5–6-й год [4].

Для сохранения редких и исчезающих видов в настоящее время широко применяются биотехнологические методы, представляющие возможность как сохранения генотипа, так и ускорения процессов морфогенеза у регенерантов [8]. В то время как типовой вид *L. martagon L. s. str.* был введен в культуру ткани из семян, а также была разработана методика получения каллуса из тканей проростков, рассматриваемый в данной работе

подвид не был вовлечен в биотехнологические исследования [9, 10].

Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ всхожести спелых и неспелых семян *Lilium martagon subsp. pilosiusculum* в культуре *in vitro*; определить возможные пути ускорения онтогенеза проростков и получения наибольшего количества дочерних микролуковичек от одного семени.

#### Материал и методы

Для исследования были собраны нераскрытые коробочки *Lilium martagon subsp. pilosiusculum* по 2-3 шт. с разных частей растений – всего не менее 12 растений, произрастающих в смешанном лесу в окрестностях г. Новосибирска. Сбор проводили 1-2 августа и 5 сентября в 2006-2007 гг. Собранные в первый срок коробочки (вне зависимости от года) были еще зеленые, семенная кожура белого цвета, что свидетельствует о незаконченности формирования как стенок плода, так и самой семенной кожуры, при этом размер семян не отличался от такового у собранных в сентябре из спелых вскрывающихся коробочек. Эти семена первого сбора мы охарактеризовали как неспелые.

Семена, посеянные 05.09.04 и 22.03.05, были собраны из спелых коробочек с одного и того же растения. В марте семена были посеяны после хранения в течение 6 месяцев при +20°C.

Семена для стерилизации помещали на 30 с в 70%-ный раствор этилового спирта, затем на 7-9 мин. в 0,2%-ный раствор хлорида ртути и промывали 4 раза в стерильной дистиллированной воде. Все семена проращивали в темноте при температуре +22...24°C.

В дальнейшем проводилось 3 серии опытов:

1) была изучена всхожесть семян лилии данного подвида в зависимости от их спелости и времени хранения. В данном опыте все семена были помещены на питательную среду МС без регуляторов роста, содержащую 20 г/л сахарозы [11];

2) для выяснения возможных путей морфогенеза в культуре *in vitro* у неспелых семян *L. martagon subsp. pilosiusculum* в зависимости от типа питательной среды и внесенных регуляторов роста (0,2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП) семена помещали для прорастания на один из четырех вариантов питательных сред (табл. 3), содержавших 30 г/л сахарозы;

3) для изучения влияния состава питательной среды и 0,2 мг/л БАП на формирование метамеров у проростков неспелых семян все проросшие семена переносили на питательные среды МС, N6, П-2, содержавшие 20 г/л сахарозы [12, 13].

Проросшие семена, а также семена, образовавшие эмбриогенный каллус и соматические эмбриониды, переносили в условия фотопериода 16/8 ч на те же среды, содержавшие 0,2 мг/л БАП. В качестве среды, применявшейся для наилучшего укоренения и дальнейшей адаптации микролуковичек к условиям *ex vivo*, нами использовалась среда S МС, содержащая 20 г/л сахарозы. Все регенеранты и сеянцы, полученные на средах без применения регуляторов роста, имеющие крупные (не менее 10 мм) луковицы, были высажены через 7-8 месяцев в стерильные субстраты, а затем в стаканчики с почвенной смесью в условиях закрытого грунта. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием статистических пакетов Microsoft Excel 2000.

#### Результаты

Согласно полученным данным период прорастания спелых семян данного подвида до и после хранения более продолжителен, чем у свежесобранных семян (спелых и неспелых), а всхожесть меньше (табл. 1).

При проращивании неспелых семян лилии данного подвида на среде П-2, дополненной ауксином 0,2 мг/л 2,4-Д и цитокинином 0,1 мг/л БАП, у основания главного корня проростков было отмечено формирование биполярных структур, представлявших собой соматические эмбриониды. Органогенез происходил путем прямой регенерации без образования каллуса, что позволило получить от одного семени в среднем до 3,02 регенерантов.

На остальных средах – МС и N6 с такими же добавками у большинства сеянцев происходило формирование каллусной ткани в основании семядоли, тогда как в контроле на среде МС без гормонов дочерние луковицы практически не образовывались (табл. 2).

Через шесть месяцев культивирования изучали заложение метамеров у микролуковичек данного подвида, полученных от неспелых семян в зависимости от состава питательных сред (табл. 3).

Таблица 1

Всхожесть семян *L. martagon subsp. pilosiusculum* при +20°C на среде МС в зависимости от сроков посева, n = 100

Вид растения	Число, месяц и год посева	Число дней на каждом этапе		% проросших семян
		до начала прорастания	прорастание	
<i>L. martagon subsp. pilosiusculum</i>	5.09.06 (спелые)	18,0±0,7	45,0±1,0	87,0±0,8
	22.03.07 (спелые-после хранения)	29,9±0,9	61,8±1,1	76,0±0,9
	02.08.06 (неспелые)	7,0±0,3	16,0±0,6	98,0±0,6
F <sub>теор.</sub> = 3,55 НСР <sub>0,05</sub>		F <sub>факт.</sub> = 310,03 НСР <sub>0,05</sub> = 2,10	F <sub>факт.</sub> = 748,65 НСР <sub>0,05</sub> = 2,51	F <sub>факт.</sub> = 173,77 НСР <sub>0,05</sub> = 2,48

Таблица 2

Возможные пути морфогенеза в культуре *in vitro* у неспелых семян *L. martagon subsp. pilosiusculum* в зависимости от типа питательной среды, n = 50

Вариант	Преобладающий тип морфогенеза	Количество микролуковичек (шт.) через 3 мес. от 1 семени
1. МС (контроль)	эмбриогенез	1,29±0,68
2. МС + 0,2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП	каллусогенез; непрямой органогенез	2,86±0,72
3. N6 + 0,2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП	каллусогенез; непрямой органогенез	3,31±0,86
4. П-2 + 0,2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП	эмбриогенез	3,02±0,68

Таблица 3

Влияние состава питательной среды на формирование метамеров в проростках неспелых семян *L. martagon subsp. pilosiusculum*, n = 10

Среды для культивирования проросших семян	Среднее количество метамеров
1. МС	3,7±0,4
2. МС + 0,2 мг/л БАП	5,8±0,8
3. N6	3,5±0,2
4. N6 + 0,2 мг/л БАП	6,3±1,3
5. П-2 + 0,2 мг/л БАП	8,5±0,8
НСР <sub>0,05</sub> (1) = 4,50; НСР <sub>0,05</sub> (2) = 4,14; НСР <sub>0,05</sub> (1,2) = 3,29	

Примечание. Фактор 1 – присутствие (отсутствие) 0,2 мг/л БАП в среде; фактор 2 – вариант питательной среды; фактор 1,2 – взаимодействие между первым и вторым факторами.

### Обсуждение

Как следует из представленных данных, всхожесть семян данного подвида в культуре *in vitro* зависит от их спелости и сроков посева. В процессе исследования было установлено, что наибольшее число микролуковичек было образовано путем

непрямого органогенеза у семян, эмбриональные ткани которых образовали каллус на средах МС и N6 с регуляторами роста. Несмотря на то, что образовавшихся в результате соматического эмбриогенеза число микролуковичек на среде П-2 с добавлением 0,2 мг/л 2,4Д и

0,1 мг/л БАП было несколько меньше, такой путь морфогенеза более предпочтителен, так как способствует получению растений генетически идентичных исходным [14]. Кроме того, на данной среде число метамеров, слагающих луковицу сеянца, было достоверно выше, чем на средах МС и N6 без регуляторов роста. Известно, что в определенной степени число метамеров является количественным выражением физиологического состояния особи и показателем онтогенетического развития [7]. Было отмечено, что в условиях *in vitro* у видов лилий секции *Martagon* ювенильная стадия продолжается 3-4 года [1], луковицы трехлетнего возраста состоят из 5-7 чешуй. Нами было отмечено увеличение количества метамеров до 8 спустя всего 6 месяцев произрастания сеянцев на питательной среде П-2.

#### Выводы

1. Неспелые семена *L. martagon subsp. pilosiusculum*, способные к прорастанию и не имеющие морфофизиологического покоя, прорастали в культуре *in vitro* более дружно и за более короткие сроки, чем семена, собранные с тех же растений на месяц позже.

2. Образование микролуковичек на среде П-2 происходило путем вторичного соматического эмбриондогенеза, что позволило увеличить коэффициент микро-размножения данного подвида в 2-3 раза.

3. На среде П-2 с добавлением 0,2 мг/л БАП развитие сеянцев проходило более ускоренно.

#### Библиографический список

1. Баранова М.В. Лилии / М.В. Баранова. Л.: Агропромиздат, 1990.
2. Красная книга Иркутской области: сосудистые растения. Иркутск, 2001.
3. Красная книга Республики Саха (Якутия). Якутск: НИПК, Сахаполиграфиздат, 2000. Т. 1.
4. Биологические особенности растений Сибири, нуждающихся в охране / отв.

ред. К.А. Соболевская. Новосибирск: Наука, 1986.

5. Боронникова С.В. Семенная продуктивность *Lilium martagon subsp. pilosiusculum* (Freyn) Iljin ex B. Fedtsch. и *Paeonia anomala* L. (Пермская обл.) / С.В. Боронникова // Растительные ресурсы. 2002. Вып. 3. Т. 38. С. 50-54.

6. Николаева М.Г. Покой семян / М.Г. Николаева // Физиология семян. М.: Наука, 1982. С. 125-183.

7. Баранова М.В. Луковичные растения семейства Лилейных (география, биоморфологический анализ, выращивание) / М.В. Баранова. СПб.: Наука, 1999. 229 с.

8. Молканова О.И. Сохранение редких и исчезающих растений в банке меристем ГБС РАН / О.И. Молканова, Ю.Н. Горбунов // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: тез. докл. III Межд. науч. конф. СПб., 2003. С. 42.

9. Pelkonen V.P. Tissue culture as means in the production of hardy lilies / V.P. Pelkonen // J. Acta Horticulturae, 1997. 447. P. 665-667.

10. Kedra M. Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture / M. Kedra, A. Bach // Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 2005. 47/1. P. 65-73.

11. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant J. 1962. Vol. 15. P. 473-497.

12. Chu Ch.-Ch. The № 6 medium and its application to anther culture of cereal crops / Ch.-Ch. Chu // Proc. sympos. on Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press, 1978. P. 43-50.

13. Chuang Ch.-Ch. A set of potato media for wheat anther culture / Ch.-Ch. Chuang, T.-W. Quyang // Proc. sympos. on Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press, 1978. P. 51-56.

14. Батыгина Т.Б. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. Т. 2. С. 629-633.

