

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.533:582.572.226

**Размножение *in vitro*, рост и развитие *ex situ* редкого вида
Lilium pensylvanicum Ker.-Gawl. (Liliaceae)****Г.В. Филиппова*, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева, О.А. Николаева, Д.Н. Андросова***Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, г. Якутск, пр. Ленина, д. 41***e-mail: nureeva@yandex.ru*

Показана возможность применения методов и подходов биотехнологии высших растений для сохранения и воспроизводства *Lilium pensylvanicum*. Использование семян в качестве первичных эксплантов позволило без причинения ущерба материнским растениям-донорам ввести вид в культуру *in vitro*. Субкультивирование асептических луковиц на среде Гамборга с половинным составом солей микро- и макроэлементов, обогащенной кинетином (5 мг/л) и индолилуксусной кислотой (1 мг/л), вызывало образование 3 ± 1 луковиц на эксплант. Последующие пассажи на четырех вариантах сред позволили отметить среду Мурасиге-Скуга, дополненную 6-бензиламинопурином (0,4 мг/л), которая стимулировала наилучшее развитие луковиц и рост побегов. Укоренение проводили на безгормональных средах. Впервые проведены многолетние наблюдения за акклиматизацией растений-регенерантов *ex situ*. Пятилетние полевые наблюдения в условиях коллекционного питомника Якутского ботанического сада за выживаемостью, ростом и развитием растений-регенерантов ($n = 30$) показали, что 77% особей успешно акклиматизировались. Массовое цветение и плодоношение было отмечено на четвертом году. Выявлены онтогенетические особенности развития молодых растений, которые выражались морфологической поливариантностью цветков и высокой изменчивостью высоты стебля. Разработанный протокол клонального микроразмножения *Lilium pensylvanicum* и результаты многолетних наблюдений за ростом растений-регенерантов позволяют рекомендовать этот метод для воспроизводства сокращающихся численность ценопопуляций.

Ключевые слова: *Lilium pensylvanicum*, культура *in vitro*, клональное микроразмножение, *ex situ*, рост, развитие

В условиях техногенного и антропогенного воздействия на биосферу особую роль приобретают подходы и методы, направленные на сохранение и защиту биологического разнообразия. Наряду с традиционными способами охраны природных экосистем в условиях заповедников, заказников, национальных парков, сохранения редких и исчезающих видов в семенных банках и в условиях интродукции (*ex situ*) все большее внимание заслуживает использование альтернативных биотехнологических методов. В настоящее время эффективные методы культивирования *in vitro* разработаны в отношении значительного числа редких и исчезающих видов растений. Особый интерес вызывает размножение редких и эндемичных видов лилий, что обусловлено необходимостью сохранения генетических ресурсов, пищевой и лекарственной ценностью, а также декоративностью этих растений [1–3]. Успешное использование методов культуры ткани для размножения видов лилий, требующих специальных природоохранных мер, описано для *Lilium rhodopaeum* [1], *L. speciosum* [4], *L. davidii* [2], *L. oxypetalum* [5], *L. mackliniae* [6], *L. brownii* [7] и др.

Для введения различных видов растений в культуру *in vitro* в качестве эксплантов используют надземные и подземные органы, фрагменты их ткани и семена. Лилии можно размножать с использованием нескольких видов тканей и органов, включая листья, стебли, апикальные меристемы побегов, части цветка, семена и луковицы. При клональном микроразмножении лилий для создания регенерационных систем чаще всего используют луковичные чешуи [8]. Лилии, особенно редких видов, как и другие цветочные культуры, часто подвержены болезням. Данный процесс может сопровождаться значительным грибковым и бактериальным инфицированием сегментов изолированных луковиц, что определяет главный недостаток этого типа экспланта. Для некоторых видов лилии с достаточным семенным возобновлением имеются немногочисленные сведения о работах с незрелыми и зрелыми семенами [9, 10]. Вместе с тем такой подход позволяет не наносить ущерб уязвимым природным популяциям, их естественному генетическому разнообразию и особенно важен в отношении популяций северных территорий.

Lilium pensylvanicum Ker.-Gawl. — многолетнее травянистое растение с белой луковицей. Вид распространен от Енисея до Камчатки, на Курильских островах, Сахалине, севере Монголии, северо-востоке Китая, Кореи. В Якутии это южные, юго-западные и центральные районы (до 64° с.ш.). Неуклонное сокращение численности популяции *L. pensylvanicum* в Якутии в результате чрезмерного использования человеком и их исчезновение близ населенных пунктов требуют необходимости принятия специальных мер по охране вида. Категория и статус редкости вида в Якутии — 2 б [11].

Настоящее исследование направлено на изучение особенности морфогенеза и регенерации в условиях *in vitro*, роста и развития *ex situ* редкого вида *Lilium pensylvanicum*.

Материалы и методы

Семена *L. pensylvanicum* собраны с растений, произрастающих в коллекционном питомнике многолетней флоры Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны (БС ИБПК).

Введение в культуру *in vitro*. Поверхностную стерилизацию семян проводили промыванием, сначала в мыльном растворе (25–30 мин), затем последовательно в проточной и дистиллированной воде. Далее поэтапно семена трижды погружали в свежую порцию стерильной воды, 70%-ный этиловый спирт (1 мин), трехкратно промывали стерильной водой, замачивали в 10%-ном растворе хлорамина (30 мин) и вновь трижды промывали водой. Для удаления излишек воды семена помещали на фильтровальную бумагу. После стерилизации в асептических условиях семена высаживали на безгормональные питательные среды Гамборга с половинным составом минеральных солей ($\frac{1}{2} B_5$) [12] и Мурасиге и Скуга (MS) [13]. Содержание сахарозы составляло 40 г/л. Культивирование семян и проростков проводили в свето-культуральной комнате при $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде, освещенности 3000 лк и 70%-ной влажности.

Микроклональное размножение. После формирования проростков образовавшиеся листья и корни удаляли, а очищенные луковицы помещали на питательные среды. Для индукции образования адвентивных луковиц использовали две питательные среды, дополненные регуляторами роста: $\frac{1}{2} B_5$ с 5 мг/л кинетина и 1 мг/л индолил-3-ук-сусной кислоты (ИУК) и MS с 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК. Дальнейшее микроразмножение осуществляли разделением образовавшихся луковиц, которые культивировали на питательных средах $\frac{1}{2} B_5$ и MS с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в двух концентрациях — 1 мг/л или 0,4 мг/л. Укоренение проводили на безгормональных питательных средах. Длительность пассажей составляла 60 сут.

Морфологическую характеристику растений-регенерантов осуществляли путем измерения ли-

нейных размеров и подсчета числа корней и побегов.

Акклиматизация к почвенным условиям *ex situ*.

Высадку растений-регенерантов ($n = 30$) в почву осуществляли в коллекционном питомнике БС ИБПК. Климатические условия участка типичны для Центральной Якутии. Зима продолжительная, морозная и малоснежная, а лето засушливое и жаркое. Годовые перепады температуры по абсолютному минимуму и максимуму достигают 102°C . В июле средняя температура составляет $18,7^\circ\text{C}$, максимальная достигает 38°C . В январе средняя температура — минус $43,3^\circ\text{C}$, минимальная — минус 64°C . Годовое количество осадков составляет 247 мм.

При посадке и уходе за растениями-регенерантами использовали общепринятые агротехнические приемы (механическое разрыхление, внесение перегноя и песка, полив, прополка). Высадку растений осуществляли в лунки глубиной 5–10 см, расстояние между которыми составляло 10–15 см. Для создания более благоприятного микроклимата в период приживаемости растений в течение двух недель использовали укрывной материал (лутрасил). Наблюдения за ростом и развитием осуществляли 2–3 раза в неделю в течение всего вегетационного сезона.

Фенологические наблюдения *ex situ* проводили по методу, опубликованному ранее [14]. Учитывали отрастание растений, переход в фазы листообразования и стеблевания, бутонизацию, окрашивание бутонов, цветение, завязывание и созревание семян. При изучении биометрических показателей учитывали линейные размеры стебля (высота), третьего листа (длина и ширина), цветка (диаметр), лепестка (длина и ширина), число листьев и цветков.

Также оценивали всхожесть семян (%), количество вновь образованных луковиц (шт./эксплант), выживание растений-регенерантов (%), количество растений в фазах цветения (%) и плодоношения (%).

Статистическая обработка результатов. На этапе введения в культуру *in vitro* в культуральный сосуд высаживали по 20 семян в 4 повторностях. В экспериментах по индукции луковиц каждый эксплант помещали в индивидуальную биологическую пробирку, для каждого варианта формировали группы по 19 шт. Для наблюдений в культуре *ex situ* формировали группу растений из 30 особей. Обработку данных проводили с учетом общепринятых методических указаний по биологической статистике. Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической (M) и ее стандартной ошибки ($\pm SEM$). Выборки сравнивали методом одно- и двухфакторного дисперсного анализа (ANOVA), статистическую значимость различий определяли с использованием критерия Даннета для множественного сравнения при уровне

значимости $p \leq 0,05$. Расчет проводили с помощью пакета StatPlus v.2007 (AnalystSoft Inc., Германия).

Результаты и обсуждение

Семенное возобновление и вегетативный коэффициент размножения у некоторых видов и сортов лилий могут отсутствовать или являются незначительными [15, 16]. Вместе с тем применение вегетативных и генеративных органов часто может быть ограничено ввиду технических сложностей доставки биологического материала из мест естественного произрастания. Наличие достаточного семенного возобновления у видов делает предпочтительным использование семян, поскольку такой подход позволяет минимизировать воздействие на природные популяции, а также не нарушает структуру коллекционных питомников в случае отбора образцов из условий интродукции. В этой связи в настоящей работе в качестве исходных эксплантов использовали семена *L. pensylvanicum*. Несмотря на то, что наиболее распространенной средой для культивирования лилии является MS, в ряде экспериментальных исследований в зависимости от поставленных целей использовали среды Гамборга, Лисмайера-Скуга, Уайта, Нича и Нич [8]. В работе Икеда и соавт. [17] сообщалось о лучшем развитии эмбрионов на среде $\frac{1}{2} B_5$, чем на среде B_5 . В нашем исследовании в результате проращивания семян на агаризованных питательных средах $\frac{1}{2} B_5$ и MS всхожесть составляла $35 \pm 3\%$ и достоверно не различалась при применении двух вариантов среды.

На втором этапе — собственно размножения — индукцию образования адвентивных лукович, обусловленную тотипотентностью клеток, проводили из лукович асептических растений *L. pensylvanicum*. Известно, что данный процесс вызывают внесением в питательную среду ауксинов и цитокининов. При этом содержание цитокининов должно превышать содержание ауксинов. В некоторых работах [16, 18] индукцию образования лукович вызывали добавлением в питательную среду 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и 10 мг/л кинетина. Нами были использованы две питательные среды: $\frac{1}{2} B_5$ с добавлением 5 мг/л кинетина и 1 мг/л ИУК, а также MS, дополненную 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК.

В первом случае культивирование приводило к образованию лукович в количестве 3 ± 1 шт./эксплант, а во втором — лишь у 25% эксплантов формировались дополнительные луковичи ($4,8 \pm 2$ шт./эксплант). Дальнейшее разделение лукович и культивирование их на четырех различных питательных средах показало, что безгормональная среда MS, а также MS, дополненная БАП в концентрации 0,4 мг/л, вызывали образование в среднем 18 ± 1 шт./эксплант (табл. 1). По этому показателю данные варианты превышали в 1,7 и 0,7 раза два других используемых в исследовании — $\frac{1}{2} B_5$ и MS с БАП 1,0 мг/л соответственно (табл. 1). Среда MS, содержащая БАП в двух использованных концентрациях, вызывала образование наибольшего числа побегов. Вместе с тем для побегов, развивающихся на среде MS с 1,0 мг/л БАП отмечали более низкие значения длины (в 2,1–2,5 раза) по сравнению с вариантами MS с БАП (0,4 мг/л), $\frac{1}{2} B_5$ и MS.

Образование и рост корней (число и длина) на безгормональных средах были значительно лучше относительно варианта с добавлением гормона в концентрации 0,4 мг/л. Следует отметить, что в питательной среде MS с БАП в концентрации 1 мг/л не наблюдалось ризогенеза.

Таким образом, при микроклональном размножении *L. pensylvanicum* для развития лукович и образования побегов предпочтительнее использование среды, содержащей БАП в концентрации 0,4 мг/л, а укоренение растений-регенерантов целесообразнее проводить на безгормональных питательных средах.

Пересадка растений-регенерантов в почву является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения растений. Наиболее благоприятное время для пересадки — весна или лето. К концу первого вегетационного сезона, в результате акклиматизации к почвенным и температурно-влажностным режимам в условиях *ex situ*, выживаемость составляла 90% (рисунок). После перезимовки, на момент отрастания, отмечено снижение числа выживших растений еще на 10%. Все выжившие растения успешно вегетировали в последующие три года. Вместе с тем на пятом году выживаемость вновь снижалась и составляла 77%.

Таблица 1

Зависимость динамики роста и развития растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* от состава питательных сред

Показатели		Состав питательной среды культивирования							
		$\frac{1}{2} B_5$		MS		MS + БАП 0,4 мг/л		MS + БАП 1,0 мг/л	
		30 сут	60 сут	30 сут	60 сут	30 сут	60 сут	30 сут	60 сут
Число лукович, шт.		$8,0 \pm 1,0a$	$10,0 \pm 2,0a$	$11,0 \pm 2,0b$	$17,0 \pm 1,0c$	$14,0 \pm 1,0b$	$18,0 \pm 2,0c$	$9,0 \pm 1,0a$	$14,0 \pm 1,0b$
Побеги	число, шт.	$5,0 \pm 1,0a$	$9,0 \pm 2,0a$	$6,0 \pm 1,0a$	$10,0 \pm 2,0ab$	$10,0 \pm 2,0b$	$15,0 \pm 3,0b$	$5,0 \pm 1,0a$	$12,0 \pm 1,0b$
	длина, см.	$3,6 \pm 0,2a$	$5,3 \pm 0,4a$	$4,1 \pm 0,2b$	$6,0 \pm 0,4a$	$4,1 \pm 0,3ab$	$5,1 \pm 0,5a$	$1,7 \pm 0,2c$	$2,4 \pm 0,2b$
Корни	число, шт.	$4,0 \pm 1,0a$	$8,0 \pm 2,0a$	$6,0 \pm 2,0a$	$13,0 \pm 2,0b$	$1,0 \pm 0,5b$	$2,0 \pm 1,0c$	0	0
	длина, см.	$1,0 \pm 0,3a$	$2,1 \pm 0,4a$	$1,2 \pm 0,2a$	$2,3 \pm 0,3a$	$0,3 \pm 0,2b$	$0,3 \pm 0,1b$	0	0

a, b, c — в каждой строке разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения для соответствующих суток ($p \leq 0,05$, ANOVA, критерий Даннета).

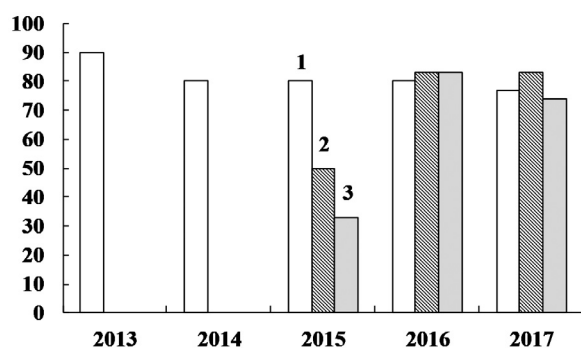


Рисунок. Межгодовая динамика выживаемости, цветения и плодоношения (%) растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* (n = 30) в условиях *ex situ*.

По оси абсцисс — год; по оси ординат — %; 1 — выживаемость; 2 — цветение; 3 — плодоношение.

Ежегодно в период вегетационного сезона проводили фенологические наблюдения за ростом и развитием *L. pensylvanicum*. На третий год после высадки растений-регенерантов в грунт у 50% особей зафиксировано цветение, тогда как завязывание коробочек с семенами отмечено только у 33% особей. На четвертом и пятом годах цвели 83% особей, а завязывание коробочек было у 83% и 74% соответственно (рисунок). Следует отметить, что на четвертом году у некоторых особей наблюдалась морфологическая поливариантность, которая выражалась в увеличении числа лепестков. У трех особей количество лепестков увеличивалось до 8, у двух особей — до 7, тогда как в норме — 6 лепестков. На пятом году было отмечено, что у одной особи цветок состоял из 14 лепестков. Известно, что морфологическая поливариантность растений может быть связана

с экологическими условиями произрастания, включая степень увлажненности, и онтогенетическим состоянием [19]. Вероятно, отмеченная нами поливариантность генеративных органов молодых растений *L. pensylvanicum* обуславливалась возрастными особенностями и погодными условиями вегетационных сезонов. Сравнение морфологических признаков вегетативных и генеративных органов пятилетних растений-регенерантов относительно *L. pensylvanicum*, произрастающих в культуре, показало, что средние значения высоты стебля и числа листьев статистически достоверно выше у средневозрастных растений (табл. 2). Остальные признаки (длина и ширина листа, число и диаметр цветков, длина и ширина лепестка) не различались. При анализе коэффициента вариации установлена высокая изменчивость морфологических признаков у молодых особей растений-регенерантов (высота стебля, число листьев и цветков), тогда как у средневозрастных особей в культуре — число листьев и цветков, длина листа и ширина лепестка. По-видимому, высокая изменчивость числа листьев и цветков, вне зависимости от онтогенетического состояния, является биологической особенностью данного вида.

Сравнение феноритмики *L. pensylvanicum* растений-регенерантов и растений, произрастающих в культуре, показало, что регенеранты по отрастанию, листообразованию и стеблеванию опережали в среднем на 5–10 сут особей в культуре. Однако бутонизация, окрашивание бутонов, цветение и плодоношение наблюдались раньше на 5–7 сут в культуре (табл. 3).

Таблица 2

Средние значения биометрических показателей и коэффициент вариации у *Lilium pensylvanicum*

Вариант	Высота стебля, см	Число листьев, шт.	Длина листа, см	Ширина листа, см	Число цветков, шт.	Диаметр цветка, см	Длина лепестка, см	Ширина лепестка, см
Растения-регенеранты	44,0±2,2a (21,5)	38,0±3,2a (35,4)	7,9±0,3a (14,9)	0,7±0,1a (17,7)	3,0±0,4a (64,0)	8,3±0,5a (5,42)	6,2±0,1a (5,12)	2,4±0,1a (10,7)
Растения в культуре	58,7±2,0b (18,3)	60,0±4,6b (41,8)	7,2±0,3a (22,9)	0,7±0,1a (21,0)	3,2±0,3a (55,4)	8,9±0,2a (8,57)	6,4±0,1a (9,78)	2,3±0,1a (20,1)

a, b — в каждом столбце разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения ($p \leq 0,05$, ANOVA, критерий Даннета); в скобках указано значение коэффициента вариации.

Таблица 3

Фенологические фазы растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* и средневозрастных растений в культуре

Год	Отрастание	Листообразование	Стеблевание	Бутонизация	Окрашивание бутонов	Цветение	Завязывание семян	Созревание семян
Растения-регенеранты								
2014	V.23	V.27	VI.03	—	—	—	—	—
2015	V.18	V.25	V.29	VI.18	VI.22	VI.23	VII.02	VIII.17
2016	V.10	V.21	VI.02	VI.14	VI.17	VI.19	VI.28	VIII.25
2017	V.15	V.23	V.28	VI.13	VI.19	VI.21	VI.29	VIII.18
Растения в культуре								
2014	V.12	V.20	V.30	VI.06	VI.16	VI.17	VI.24	VIII.25
2015	V.25	VI.01	VI.06	VI.11	VI.22	VI.22	VII.01	VIII.27
2016	V.17	V.31	VI.03	VI.06	VI.17	VI.17	VI.26	VIII.29
2017	V.26	VI.06	VI.09	VI.09	VI.13	VI.17	VI.25	VIII.27

Проведенные исследования роста и развития растений-регенерантов *L. pensylvanicum* в условиях коллекционного питомника показали, что сохранение и воспроизводство данного вида методом микроклонального размножения является перспективным. Выявленная морфологическая поливариантность цветков, изменчивость высоты стебля, а также сроков прохождения некоторых фенологических фаз, вероятно, обусловлена онтогенетическим состоянием растений.

Разработан протокол микроклонального размножения *in vitro* *L. pensylvanicum* — вида, численность которого сокращается в результате чрезмерного использования человеком и занесенного в Красную книгу Республики Саха (Якутия). Использование семян в качестве первичных эксплантов позволило без причинения ущерба материнским растениям-донорам ввести вид в культуру *in vitro*. Субкультивирование асептических лукович на среде Гамборга с половинным составом солей микро- и макроэлементов, обогащенной кинетином (5 мг/л) и ИУК (1 мг/л), вызывало образование 3 ± 1 шт. лукович на эксплант. Установлено, что среда Мурасиге-Скуга, дополненная БАП (0,4 мг/л), являлась наилучшей для развития лукович и роста побегов. Пятилет-

ние наблюдения за выживаемостью и онтогенетическим развитием растений-регенерантов в условиях *ex situ* показали, что акклиматизацию к почвенным и температурно-влажностным условиям Якутии успешно прошли 77% растений-регенерантов. Массовое цветение и плодоношение отмечалось на четвертый год. Для молодых растений-регенерантов отмечены: морфологическая поливариантность цветков, изменчивость высоты стебля, а также незначительное смещение сроков прохождения вегетативных и генеративных фенологических фаз. Приведенные результаты дают основания предполагать, что использование микроклонального размножения может являться эффективным способом для восстановления природных ценопопуляций *L. pensylvanicum*.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБПК СО РАН на 2017–2020 гг. по проекту VI.52.1.8. «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения разнообразия растительного мира Северной и Центральной Якутии» (№ АААА-А17-117020110056-0).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stanilova M.I., Ilcheva V.P., Zagorska N.A. Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. // Plant Cell Rep. 1994. Vol. 13. N 8. P. 451–453.
2. LingFei X., FengWang M., Dong L. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor) // Sci. Hort. Amsterdam. 2009. Vol. 119. N 4. P. 458–461.
3. Yarmolinsky L., Zaccai M., Ben-Shabat Sh., Mills D., Huleihel M. Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus binjamina* and *Lilium candidum* *in vitro* // New Biotechnol. 2009. Vol. 26. N 6. P. 307–313.
4. Chang Ch., Chen Ch-T., Tsai Y-Ch., Chang W-Ch. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker // Bot. Bull. Acad. Sinica. 2000. Vol. 41. N 2. P. 139–142.
5. Joshi S.K., Dhar U. In vitro propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya // Acta Physiol. Plant. 2009. Vol. 31. P. 833–838.
6. Sahoo M.R., Devi M.P., Dasgupta M., Prakash N., Ngachan Sh.V. An efficient protocol for *in vitro* regeneration and conservation of Shirui lily (*Lilium mackliniae* Sealy): a lab-to-land approach to save the rare endangered Asiatic lily species // In Vitro Cell. Dev.-Pl. 2018. Vol. 54. N 6. P. 701–710.
7. Wu Y., Ma Y-D., Li Y., Zhang L., Xia Y-P. Plantlet regeneration from primary callus cultures of *Lilium brownii* F.E.Br. ex Miellez var. *giganteum* G.Y. Li & Z.H. Chen, a rare bulbous germplasm // In Vitro Cell. Dev.-Pl. 2019. Vol. 55. N 1. P. 44–59.
8. Bakhshaie M., Khosravi S., Azadi P., Bagheri H., Tuyul J.M. Biotechnological advances in *Lilium* // Plant Cell Rep. 2016. Vol. 35. N 9. P. 1799–1826.
9. Ault J.R., Siqueira S.S. Morphogenetic response of *Lilium michiganense* to four auxin-type plant growth regulators *in vitro* // Hortscience. 2008. Vol. 43. N 6. P. 1922–1924.
10. Dhyani A., Sharma G., Nautiyal B.P., Nautiyal M.Ch. Propagation and conservation of *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle // J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 2014. Vol. 1. N 4. P. 144–147.
11. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н.С. Данилова. М.: Изд-во Реарт, 2017. 412 с.
12. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. Vol. 46. P. 417–421.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–476.
14. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Изд-во Наука, 1974. 139 с.
15. Пугачева Г.М., Соколова М.А. Клональное микро-размножение лилий // Вестн. МичГАУ. 2010. № 1. С. 35–37.
16. Степанова А.Ю., Ильина В.С., Староверов В.В., Терешонок Д.В. Микроклональное размножение лилии азиатской // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т. 26. С. 237–243.
17. Ikeda N., Niimi Y., Han D. Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. Vol. 73. N 2. P. 159–166.

18. Takayama S., Misawa M. A scheme for mass propagation of *Lilium in vitro* // Sci. Hortic-Amsterdam. 1983. Vol. 18. N 4. P. 353–362.

19. Osmanova G.O. Biomorphology of *Actaea erythrocarpa* Fisch. individuals and ecological–demographic charac-

terization of its cenopopulations // Biology Bull. 2016. Vol. 43. N 5. P. 468–473.

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 20.04.2020 г.

Принята в печать 29.04.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

In vitro reproduction, *ex situ* growth and development of a rare species *Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. (Liliaceae)

G.V. Filippova*, V.G. Darkhanova, N.S. Stroevea, O.A. Nikolaeva, D.N. Androsova

*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
41 Lenin st., Yakutsk, 677980, Russia*

*e-mail: nureeva@yandex.ru

The possibility of applying the methods and approaches of biotechnology of higher plants for the conservation and reproduction of *Lilium pensylvanicum* is shown. The use of seeds as primary explants allowed introducing the species into an *in vitro* culture without causing damage to the donor mother plants. Subculture of bulbs aseptic plants on the Hamburg medium with half the composition of salts micro and macro elements enriched in kinetin (5 mg/l) and indolylacetic acid (1 mg/l) caused the formation of three bulbs per explant. Subsequent passages on four media options allowed to isolate Murashige-Skoog medium supplemented with 6-benzylaminopurine (0.4 mg/l), which stimulated the best development of bulbs and shoot growth. Rooting was performed on hormone-free media. For the first time, long-term observations of the acclimatization of *ex situ* regenerated plants were carried out. Five-year field observations in the conditions of the collection nursery of the Yakutsk Botanical Garden for the survival, growth and development of regenerated plants (n = 30) showed that 77% of individuals successfully acclimatized. Mass flowering and fruiting were noted in the fourth year. Ontogenetic features of the development of young plants were revealed, which were expressed by the morphological polyvariance of the flowers and the high variability of the stem height. The developed protocol for the clonal micropropagation of *Lilium pensylvanicum* the results of long-term observations of the growth of regenerated plants allow us to recommend this method for propagating endangered cenopopulations.

Keywords: *Lilium pensylvanicum*, culture *in vitro*, clonal micropropagation, *ex situ*, growth, development

Сведения об авторах

Филиппова Галина Валерьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: nureeva@yandex.ru

Дарханова Валентина Гаврильевна — инженер-исследователь лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: vdarhana@mail.ru

Строева Наталья Семеновна — инженер-исследователь лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: natali.stroevea.62@mail.ru

Николаева Ольга Александровна — инженер-исследователь лаборатории Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: olka87.87@mail.ru

Андросова Дария Николаевна — инженер-исследователь лаборатории Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: darija_androsova@mail.ru