

Введение в культуру и размножение *in vitro* *Hemerocallis*, сорта ‘Wine and Roses’

Н.С. Строева, В.Г. Дарханова, Г.В. Филиппова*

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

*nureeva@yandex.ru

Аннотация. Исследована возможность применения методов и подходов биотехнологии высших растений для клонального микроразмножения *in vitro* рода *Hemerocallis* (Красоднев) сорта ‘Wine and Roses’. Использование генеративных органов (бутонов) в качестве первичных эксплантов позволило без причинения ущерба материнским растениям-донорам, произрастающим в коллекционном питомнике, ввести красоднев в культуру *in vitro*. Определены особенности индукции каллусообразования на питательной среде Мурасиге и Скуга в присутствии нафтилуксусной кислоты и/или 6-бензиламинопурина. Апробированы условия для получения растений-регенерантов из эмбриогенных каллусных культур. Использование в качестве регулятора роста биокомпозиата, полученного в результате механохимической обработки древесной зелени пихты (100 мг/л), содержащего водорастворимые соли тритерпеновых кислот, выявило его высокую эффективность в процессах морфогенеза и регенерации в каллусной культуре красоднева *in vitro*. В течение трех пассажей каллуса отмечалось развитие клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в результате многократных делений формировались почки и эмбриоиды. Дальнейшее культивирование приводило к формированию растений-регенерантов красоднева. Проведенное исследование позволило получить стерильную культуру и подобрать состав питательной среды для успешного размножения *Hemerocallis* в условиях *in vitro*. Разработан протокол микроразмножения *in vitro* рода *Hemerocallis* (Красоднев) сорта ‘Wine and Roses’, который может являться эффективным способом для успешного размножения.

Ключевые слова: *Hemerocallis*, культура *in vitro*, каллус, клональное микроразмножение; растения-регенеранты.

Благодарности. 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.

Введение

Лилейник или Красоднев (*Hemerocallis*) – род растений семейства Hemerocallidaceae. Представители рода относительно однородны [1]. Все имеют розетку длинных линейных листьев, отрастающих от многолетнего корневища. Крупные цветки состоят из венчика с шестью лепестками, собраны в соцветия по 2–10 шт. Несмотря на то что продолжительность цветения цветка 1–2 дня, благодаря большому количеству цветоносов цветение продолжается 1–1,5 месяца. Природный ареал *Hemerocallis* охватывает умеренную и субтропическую Азию, причем основное разнообразие рода сосредоточено в Китае, Корее и Японии, а также Дальнем Востоке России [2, 3]. На территории Якутии произрастает

H. minor, численность которого в силу эффективности крупных лимонно-желтых цветков сокращается в результате чрезмерного использования человеком [4]. За пределами Дальнего Востока *Hemerocallis* в основном выращивают как неприхотливое садовое декоративное растение, насчитывающее большое количество селекционных гибридов с различной формой лепестков и окраской венчика.

Также известно об использовании *Hemerocallis* в качестве пищевого и лекарственного растения. В странах Азии сушеные и свежие цветочные почки некоторых видов *Hemerocallis* довольно часто используются в качестве добавки в супы и рагу. В работах [5–7] показано, что цветочные почки обогащены значительным содер-

жанием антиоксидантов, среди которых мощную антиоксидантную активность проявляли гликозиды и некоторые производные кофеилхиновой кислоты. Молодые побеги и корни также употребляются в пищу, но корни проявляют токсичность [8], что связывают с наличием в тканях корней нейротоксинов [2]. Отмечается антипролиферативные эффекты и цитотоксичность в отношении раковых клеток антрахинонов, выделенных из корней [9]. *Hemerocallis* использовался в народной медицине Азии для лечения расстройств сна и частой смены настроения, желтухи и воспалений [2].

Наряду с традиционными способами размножения хозяйственно ценных видов, сортов, гибридов растений (семенами, вегетативным размножением, черенкованием) использование микроклонального размножения в культуре *in vitro* позволяет получать большое количество особей для достижения различных задач, вне зависимости от времени года. Возможность введения в культуру *in vitro* различных органов и тканей растений успешно применяется в различных областях сельского хозяйства, а также в цветоводстве для ускорения и облегчения селекционной работы, ускоренного размножения растений с ценными признаками, а также фитофармпроизводстве в качестве источников физиологически активных веществ и т. д. Кроме того, большое значение приобретает сохранение и размножение в культуре *in vitro* редких и исчезающих видов.

Цель исследования – введение в культуру и размножение *in vitro* *Hemerocallis* (Красноднева), определение оптимальных условий каллусогенеза, морфогенеза, соматического эмбриогенеза и ризогенеза.

Материалы и методы

Объектом исследований являлся *Hemerocallis* (Красоднев) ‘Wine and Roses’, произрастающий в коллекционном питомнике многолетней флоры Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны (БС ИБПК). БС расположен в 7 км юго-западнее г. Якутск на второй надпойменной террасе долины р. Лена и на водораздельном пространстве Лено-Вилуйской равнины [10]. Долинная часть территории, на которой расположены коллекционные участки, сложена отложениями четвертичного возраста, представленными песками желтовато-серыми, среднезернистыми, кварц-полевошпатно-слюди-

стыми мощностью 30 м. В основании террасы залегает небольшой по мощности слой галечника карбонатных и, реже, изверженных горных пород. Пески перекрыты серыми тяжелыми суглинками мощностью 1–1,4 м.

В основу протокола по культивированию изолированных тканей и органов были положены методические рекомендации, предложенные Н.В. Катаевой и В.А. Аветисовым [11]. Для успешной регенерации важным моментом считается стадия развития цветка на момент введения в культуру ткани. В этой связи в качестве первичного материала для введения в культуру *in vitro* использовали цветки, собранные с растений, произрастающих в открытом грунте в фазе бутонизации, когда они плотно закрыты листочками обертки. Для успешного введения в культуру экспланты подвергали поверхностной стерилизации. Все работы проводили в стерильных (асептических) условиях ламинарного бокса (БОВ-001-АМС, Россия). Бутоны, смоченные в 96%-м этиловом спирте обжигали в пламени спиртовки. Затем проводили замачивание бутонов в 0,1%-м растворе сулемы в течение 10 мин. Далее их трижды прополаскивали в асептической дистиллированной воде и помещали на фильтровальную бумагу в чашки Петри для удаления излишков воды. Этот метод эффективно освобождает поверхность исходного материала от бактериальной и грибной инфекции.

Работа в асептических условиях, приготовление и стерилизация питательных сред была проведена согласно рекомендациям Р.Г. Бутенко, Ф.Л. Калинина и др. [12,13]. Бутоны делили на фрагменты и помещали на питательные среды с фитогормонами (нафтилуксусная кислота (НУК) и 6-бензиламинопури́н (БАП)). Для культивирования в условиях *in vitro* использовали среду Мурасиге и Скуга (МС) [14]. В состав 0,6%-х агаризованных питательных сред на разных этапах исследования также включали 30 г/л сахарозы, различные концентрации НУК, БАП, кинетина, индолилуксусной кислоты (ИУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), pH среды доводили до 5,8–5,9. Образование и рост каллусов, а затем и растений-регенерантов *Hemerocallis* проводили при 16-часовом световом периоде, постоянной температуре 24–25 °С, освещенности 3000 люкс и влажности 70 %.

Морфологическая характеристика растений-регенерантов *in vitro* осуществлялась путем из-

мерения линейных размеров корней, побегов, а также учитывали их количество.

Статистическую обработку данных проводили с учетом общепринятых методических указаний по биологической статистике [15]. Для каждого признака определяли среднее арифметическое значение и его ошибку. Сравнение выборок проводили методом одно- и двухфакторного дисперсного анализа, значимость отличий определяли с использованием критерия Даннета для множественного сравнения при уровне значимости $p \leq 0,05$. Расчет проводился с помощью пакета AnalystSoft, StatPlus v.2007.

Результаты и их обсуждение

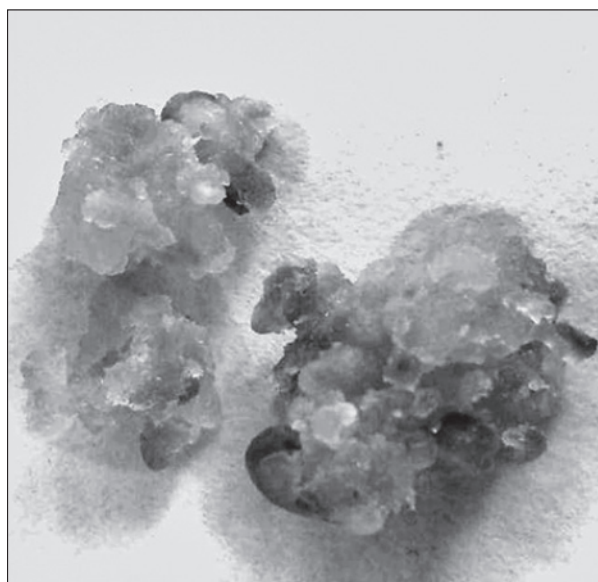
Для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов используют надземные и подземные органы, фрагменты их ткани и семена растений [12]. Результат культивирования *Heimerocallis* во многом зависит от типа экспланта, состава питательных сред, баланса фитогормонов, способности вида (сорта) к регенерации и т. д. [16–18]. Регенерация растений обусловлена уникальным свойством растительных клеток – тотипотентности [12]. Наличие этого свойства позволяет реализовывать разные онтогенетические программы (органогенез, каллусогенез или соматический эмбриогенез) при модификации состава среды культивирования и физических факторов, что обусловлено способностью соматических растительных клеток изменять свой статус в условиях *in vitro* [19].

Основным типом культивируемых растительных клеток является каллусная ткань, которая образуется в результате дедифференциации меристемных и специализированных клеток, не потерявших ядро и способных к пролиферации. Данный процесс в условиях *in vitro* всегда протекает в присутствии биологических регуляторов роста и развития – фитогормонов [20]. В этой связи для образования первичного каллуса из тканей бутонов *Heimerocallis* питательную среду МС дополняли в первом случае БАП и НУК в концентрациях 8 и 3 мг/л соответственно, во втором БАП – 5 мг/л. Образовавшийся каллус постепенно покрывал всю поверхность площади экспланта, имел светло-зеленую окраску, плотную консистенцию и зернистую структуру (см. рисунок).

Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе сома-

тические клетки дифференцируются в эмбриональные, следующая стадия сопровождается развитием эмбриоидов. Соматический эмбриогенез может происходить как в тканях первичного экспланта, так и в каллусной культуре [21]. Для индукции соматического эмбриогенеза в каллусной культуре в нашем исследовании были использованы шесть вариантов, различающихся гормональным составом и их концентрациями в питательной среде, а также один вариант среды, дополненной биоконкомпозитом (табл. 1). Известно, что использование биодоступных органических веществ в культуре *in vitro* способно стимулировать развитие каллусной ткани, ускорять стеблевой морфогенез и укоренение побегов [12, 22]. Показана высокая эффективность использования композита на основе механоактивированной древесной зелени пихты (МПН), содержащего водорастворимые соли тритерпеновых кислот [23–25]. Это обусловило применение МПН в концентрации 100 мг/л.

Отмечено, что наиболее эффективной являлась среда с внесением в качестве стимулятора МПН. В результате на данной питательной среде образовывались многочисленные белые глобулы и рыхлый зернистый зеленый каллус, а также у 50 % наблюдалось образование растений-регенерантов (табл. 2).



Каллус *Heimerocallis*, полученный из первичных эксплантов (бутонов).

Callus *Heimerocallis* obtained from primary explants (flower bud).

Таблица 1

Влияние экзогенных регуляторов роста на морфогенез и регенерационную способность в культуре каллуса *Hemerocallis*

Table 1

The influence of exogenous growth regulators on morphogenesis and regenerative capacity in callus culture *Hemerocallis*

Регуляторы роста, мг/л [Growth regulators, mg/l]	Образование [Formation]				
	регенерантов [regenerated plants]	корней [root]	побегов [shoot]	эмбриоидов [embryoid]	каллуса [callus]
БАП [BAP] 8,0 НУК [NAA] 3,0	–	–	–	+	+
БАП [BAP] 0,2 ИУК [IAA] 0,1	+	–	+	+	+
БАП [BAP] 1,5 НУК [NAA] 0,1	+	+	+	+	+
2, 4 Д [2.4 D] 1,0 Кинетин [kinetin] 0,2	+	+	+	+	+
НУК [NAA] 1,0	+	–	+	–	+
ИУК [IAA] 1,0	–	–	–	+	+
МПН [MPA] * 100,0	+	+	+	+	+

Примечание. «–» – отсутствие; «+» – наличие; * – МПН.

Note. «–» – lack of; «+» – available; * – mechanochemical preparation from *Abies*.

Таблица 2

Влияние механохимического препарата пихты (100 мг/л) на морфогенез и регенерационную способность в культуре каллуса *Hemerocallis*

Table 2

The effect of the mechanochemical preparation from *Abies* (100 mg / l) on the morphogenesis and regenerative ability in the culture of callus *Hemerocallis*

Признак [Sign]	1-й пассаж [1st passage]	2-й пассаж [2nd passage]
Частота побегообразования [Shoot formation frequency], %	50,0±12,5	31,0±7,6
Частота ризогенеза [Rhizogenesis frequency], %	50,0±12,5	39,6±6,8
Число побегов на эксплант, шт. [The number of shoots per explant, pcs]	2,1±0,4	2,1±0,4
Число листьев на побег, шт. [The number of leaves per shoot, pcs]	4,7±0,9	2,1±0,3
Длина листьев, см [Leaf length, cm]	2,5±0,5	1,7±0,2
Количество корней на побег, шт. [The number of roots per shoot, pcs.]	2,3±1,4	1,2±0,1
Длина корней, см [Root length, cm]	5,5±1,0	4,0±0,5

**Динамика развития эмбриогенного каллуса и регенерантов *Heimerocallis*
в зависимости от среды культивирования и экзогенных регуляторов роста**

Table 3

**Dynamics of the development of embryogenic callus and *Heimerocallis* regenerants
depending on the culture medium and exogenous growth regulators**

Признак [Sign]	МПН 100 мг/л [MPA* 100 mg/l]		БАП 0,2 мг/л + ИУК 0,1 мг/л [BAP 0,2 mg/l + IAA 0,1 mg/l]	
	30 день [days]	60 день [days]	30 день [days]	60 день [days]
Частота каллусогенеза [Callusogenesis frequency], %	22,6±7,2	12,5±3,5	80,0±5,8	80,0±6,3
Частота побегообразования [Shoot formation frequency], %	83,9±5,4	87,5±2,2	30,0±9,5	40,0±8,2
Частота ризогенеза [Rhizogenesis frequency], %	48,4±11,3	45,0±8,5	10,0±0,1	22,0±4,8
Число побегов на эксплант, шт. [The number of shoots per explant, pcs]	1,4±0,2	2,0±0,3	1,3±0,3	2,3±0,5
Число листьев на побег, шт. [The number of leaves per shoot, pcs]	2,5±0,3	2,3±0,2	1,5±0,5	1,7±0,3
Длина листьев, см [Leaf length, cm]	2,2±0,3	4,1±0,3	1,1±0,3	1,7±0,3
Количество корней на побег, шт. [The number of roots per shoot, pcs.]	1,6±0,2	2,2±0,3	1,0±0,1	1,5±0,1
Длина корней, см [Root length, cm]	4,4±0,6	4,8±0,3	0,5±0,2	1,0±0,2

Полученные растения в среднем имели 4,7±0,9 шт. листьев и 2,3±1,4 шт. корней, длиной 2,5±0,5 и 5,5±1,0 см соответственно. С целью поддержания способности к делению и сохранения жизнеспособности каллуса через 4–6 недель, как правило, производят перенос клеток каллуса на свежую питательную среду – пассируют. Регулярное пассирование позволяет в течение длительного времени сохранять каллусные культуры в условиях *in vitro*. Во втором пассаже при посеве эмбриогенного каллуса красоднева на аналогичную среду отмечено образование растений-регенерантов только в 31 % случаев, в остальных – наблюдался рост каллуса. Количество побегов на эксплант составляло 2,1±0,4 шт. Растения-регенеранты характеризовались наличием 2,1±0,3 шт. листьев с длиной 1,7±0,2 см. Показано, что только у 40 % растений были индуцированы процессы ризогенеза. Среднее количество корней на одно растение составляло 1,2±0,1 шт, с длиной 4,0±0,5 см (табл. 2).

В следующем пассаже в результате культивирования каллуса на двух различных питательных средах отмечено, что безгормональная среда MS, дополненная МПН, вызывала, в отличие от среды, содержащей фитогормоны, наибольшую частоту побегообразования и ризогенеза, растения-регенеранты формировали большее число листьев и корней (табл. 3).

Следует отметить, что интенсивность роста растений-регенерантов также была выше в варианте с использованием механоактивированной древесной зелени пихты. По этому показателю отмечено превышение в 2,4 раза длины листьев и в 4,0 раза длины корней по сравнению с вариантом, содержащим БАП и ИУК в концентрации 0,2 мг/л и 0,1 мг/л соответственно.

Заключение

Показана возможность применения методов и подходов биотехнологии высших растений для клонального микроразмножения *in vitro* рода *Heimerocallis* (Красоднев) сорта ‘Wine and Roses’.

Использование генеративных органов (бутонов) в качестве первичных эксплантов позволяет без причинения ущерба материнским растениям-донорам, произрастающим в коллекционном питомнике, ввести красоднев в культуру *in vitro*. Исследовали особенности индукции каллусообразования на питательной среде Мурасиге и Скуга в присутствии нафтилуксусной кислоты и/или 6-бензиламинопурина. Также апробированы условия для получения растений-регенерантов из эмбриогенных каллусных культур. Использование в качестве регулятора роста биокомпозита, полученного в результате механохимической обработки древесной зелени пихты (100 мг/л), содержащего водорастворимые соли тритерпеновых кислот, выявили его высокую эффективность в процессах морфогенеза и регенерации в каллусной культуре красоднева *in vitro*. В течение трех пассажей каллуса отмечали развитие клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в результате многократных делений формировались почки и эмбриониды. Дальнейшее культивирование приводит к формированию растений-регенерантов красоднева. Таким образом, проведенное исследование позволило получить стерильную культуру и подобрать состав питательной среды для успешного размножения *Hemerocallis* в условиях *in vitro*.

Литература

1. Dahlgren R.M.T., Clifford H.T., Yeo P.F. The families of the monocotyledons. Structure, Evolution, and Taxonomy. Berlin: Springer, 1985. 520 p.
2. Rodriguez-Enriquez M.J., Grant-Downton R.T. A new day dawning: *Hemerocallis* (daylily) as a future model organism // AoB Plants. 2012. Vol. 5. P. 1–15. pls055: doi:10.1093/aobpla/pls055.
3. Хими́на Н.И. Лилейники. М.: Кладезь-Букс, 2009. 96 с.
4. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н.С. Данилова. М.: Ре-арт, 2017. 412 с.
5. Bor J.Y., Chen H.Y., Yen G.C. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. Vol. 54. P. 1680–1686. doi:10.1021/jf0527448.
6. Cichewicz R.H., Nair M.G. Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Hemerocallis*) flowers // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 50. P. 87–91. doi:10.1021/jf010914k.
7. Lin Y.L., Lu C.K., Huang Y.J., Chen H.J. Antioxidative caffeoylquinic acids and flavonoids from *Hemerocallis fulva* flowers // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. P. 8789–8795. doi: 10.1021/jf201166b.
8. Zhang Y., Cichewicz R.H., Nair M.G. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves // Life Science. 2004. Vol. 75. P. 753–763. doi:10.1016/j.lfs.2004.03.002.
9. Cichewicz R.H., Zhang Y., Seeram N.P., Nair M.G. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies // Life Sciences. 2004. Vol. 74. P. 1791–1799. doi:10.1016/j.lfs.2003.08.034.
10. Нахабцева С.Ф. Растительность Якутского ботанического сада // Интродукция растений в Центральной Якутии. М.; Л.: Наука, 1965. С. 37–43.
11. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 137–149.
12. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
13. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 320 с.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473–476.
15. Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных. М., 1991. 183 с.
16. Чурикова О.А. Микроклональное размножение и некоторые особенности лилейников и хост *in vitro* // Вестник Московского университета: Биология. 2008. № 2. С. 45–50.
17. Chen J., Hall D.E., De Luca V. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.) // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 2005. Vol. 41. P. 58–62. doi:10.1079/IVP2004595.
18. Matand K., Wu N., Conley S., Acquah G. A more improved protocol for in vitro shoot organogenesis in daylily (*Hemerocallis* sp.) // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12(8). P. 820–825. doi: 10.5897/AJB12.2561
19. Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003. Vol. 74. P. 201–228.
20. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Изд. 2-е. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2010. 240 с.
21. Halperin W., Wetherall D.F. Adventive embryony in tissue cultures of wild carrot: *Daucus carota* // Amer. J. Bot. 1964. Vol. 51. P. 274–283.
22. Korolev K.G., Lomovskii O.I., Rozhanskaya O.A., Vasil'ev V.G. Mechanochemical preparation of water-soluble forms of triterpene acids // Chemistry Natural Compounds. 2003. Vol. 39(4). P. 366–372. doi:10.1023/B:CONC.0000003418.28517.f6
23. Рожанская О.А., Дарханова В.Г., Строева Н.С., Королев К.Г., Ломовский О.И. Особенности морфогенеза

неза эспарцета и люцерны *in vitro* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2008. № 5 (185). С. 58–65.

24. Рожанская О.А., Юдина Н.В., Ломовский О.И., Королев К.Г. Влияние регуляторов роста растительного происхождения на морфогенез рапса *in vitro* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2003. № 2 (148). С. 108–112.

25. Дарханова В.Г., Трофимова И.Г., Строева Н.С., Филиппова Г.В., Воронов И.В. Влияние механохимического препарата пихты на морфогенез картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при микроразмножении *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 130. С. 670–679. doi: 10.21515/1990-4665-130-046.

Поступила в редакцию 12.12.2019

Принята к публикации 05.02.2020

Об авторах

СТРОЕВА Наталья Семеновна, инженер-исследователь, Институт биологических проблем криолитозоны ФИЦ ЯНЦ СО РАН, 677980, Якутск, пр. Ленина, 41, <http://orcid.org/0000-0003-2803-4440>, natali.stroeva.62@mail.ru;

ДАРХАНОВА Валентина Гаврильевна, инженер-исследователь, Институт биологических проблем криолитозоны ФИЦ ЯНЦ СО РАН, 677980, Якутск, пр. Ленина, 41, <http://orcid.org/0000-0002-8789-5147>, darhana@mail.ru;

ФИЛИППОВА Галина Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биологических проблем криолитозоны ФИЦ ЯНЦ СО РАН, 677980, Якутск, пр. Ленина, 41, <http://orcid.org/0000-0002-2024-6062>, nureeva@yandex.ru.

Информация для цитирования

Строева Н.С., Дарханова В.Г., Филиппова Г.В. Введение в культуру и размножение *in vitro* *Hemerocallis*, сорта 'Wine and Roses' // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2020, Т. 25, № 1. С. 85–93. <https://doi.org/10.31242/2618-9712-2020-25-1-9>

DOI 10.31242/2618-9712-2020-25-1-9

Introduction to culture and *in vitro* reproduction of the *Hemerocallis*, variety 'Wine and Roses'

N.S. Stroeve, V.G. Darkhanova, G.V. Filippova*

Institute of Biological Problems of Cryolithozon, SB RAS, Yakutsk, Russia

**nureeva@yandex.ru*

Abstract. The possibility to use the methods and approaches of higher plant biotechnology for *in vitro* clonal micropropagation of the genus *Hemerocallis* (Krasodnev) of the varieties 'Wine and Roses' was investigated. The use of generative organs (flower buds) as primary explants allowed them to be introduced into an *in vitro* culture without any harm to donor plants grown in the nursery. The specific features of the induction of callus formation on the nutrient medium of Murashige and Skoog in the presence of naphthylacetic acid and/or 6-benzylaminopurine are determined. The conditions for obtaining regenerated plants from embryogenic callus cultures were tested. The use of a biocomposite obtained as a growth regulator by means of mechanochemical treatment of the biological product from fir branches and needles (100 mg/l) containing water-soluble salts of triterpene acids revealed its high efficiency in the processes of morphogenesis and regeneration in the callus culture of *Hemerocallis in vitro*. During the three passages of callus, the development of meristematic and embryonic cells was noted, from which the kidneys and embryoids formed as a result of repeated divisions. Further cultivation led to the formation of regenerated plants. The

study allowed us to obtain a sterile culture and select the composition of a nutrient medium for the successful propagation of Hemerocallis in vitro. In vitro clonal micropropagation protocol was developed for the genus Hemerocallis of the 'Wine and Roses' variety, which can be an effective method for successful reproduction.

Key words: *Hemerocallis*, in vitro culture, callus, clonal micropropagation, regenerated plants.

Acknowledgements. *The work was carried out as part of the state assignment of the Institute of Biological Problems of the Cryolithozone of the SB RAS for 2017-2020. according to project VI.52.1.8. Fundamental and applied aspects of the study of plant diversity in Northern and Central Yakutia No. AAAA-A17-117020110056-0.*

References

1. Dahlgren R.M.T., Clifford H.T., Yeo P.F. The families of the monocotyledons. Structure, Evolution, and Taxonomy. Berlin: Springer, 1985. 520 p.
2. Rodriguez-Enriquez M.J., Grant-Downton R.T. A new day dawning: *Hemerocallis* (daylily) as a future model organism // *AoB Plants*. 2012. Vol. 5. P. 1–15. p1s055: doi:10.1093/aobpla/pls055.
3. Khimina N.I. Lileyniki. M.: Kladez'-Buks, 2009. 96 p.
4. Krasnaya kniga Respubliki Sakha (Yakutiya). Vol. 1: Redkie i nakhodyashchiesya pod ugrozoy ischeznoventiya vidy rasteniy i gribov / Otv. red. N.S. Danilova. M.: Reart, 2017. 412 p.
5. Bor J.Y., Chen H.Y., Yen G.C. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54. P. 1680–1686. doi:10.1021/jf0527448.
6. Cichewicz R.H., Nair M.G. Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Hemerocallis*) flowers // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. Vol. 50. P. 87–91. doi:10.1021/jf010914k.
7. Lin Y.L., Lu C.K., Huang Y.J., Chen H.J. Antioxidative caffeoylquinic acids and flavonoids from *Hemerocallis fulva* flowers // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. Vol. 59. P. 8789–8795. doi: 10.1021/jf201166b.
8. Zhang Y., Cichewicz R.H., Nair M.G. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves // *Life Science*. 2004. Vol. 75. P. 753–763. doi:10.1016/j.lfs.2004.03.002.
9. Cichewicz R.H., Zhang Y., Seeram N.P., Nair M.G. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies // *Life Sciences*. 2004. Vol. 74. P. 1791–1799. doi:10.1016/j.lfs.2003.08.034.
10. Nakhabtseva S.F. Rastitel'nost' Yakutskogo botanicheskogo sada // *Introduktsiya rasteniy v Tsentral'noy Yakutii*. M.; L.: Nauka, 1965. P. 37–43.
11. Kataeva N.V., Avetisov V.A. Klonal'noe razmnozhenie v kul'ture tkani. Kul'tura kletok rasteniy. M.: Nauka, 1981. P. 137–149.
12. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy. M.: Nauka, 1964. 272 p.
13. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. Metody kul'tury tkaney v fiziologii i biokhimmii rasteniy. Kiev: Naukova dumka, 1980. 320 p.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. P. 473–476.
15. Zaytsev G.N. Matematicheskiy analiz biologicheskikh dannykh. M., 1991. 183 p.
16. Churikova O.A. Mikroklonal'noe razmnozhenie i nekotorye osobennosti lileynikov i khost in vitro // *Vestnik Moskovskogo universiteta: Biologiya*. 2008. No. 2. P. 45–50.
17. Chen J., Hall D.E., De Luca V. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 2005. Vol. 41. P. 58–62. doi:10.1079/IVP2004595.
18. Matand K., Wu N., Conley S., Acquah G. A more improved protocol for in vitro shoot organogenesis in daylily (*Hemerocallis* sp.) // *African Journal of Biotechnology*. 2013. Vol. 12(8). P. 820–825. doi: 10.5897/AJB12.2561
19. Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2003. Vol. 74. P. 201–228.
20. Lutova L.A. Biotekhnologiya vysshikh rasteniy. Izd. 2-e. SPb.: Izd-vo S.-Peterb. Un-ta, 2010. 240 p.
21. Halperin W., Wetherall D.F. Adventive embryony in tissue cultures of wild carrot: *Daucus carota* // *Amer. J. Bot.* 1964. Vol. 51. P. 274–283.
22. Korolev K.G., Lomovskii O.I., Rozhanskaya O.A., Vasil'ev V.G. Mechanochemical preparation of water-soluble forms of triterpene acids // *Chemistry Natural Compounds*. 2003. Vol. 39(4). P. 366–372. doi:10.1023/B:CONC.0000003418.28517.f6
23. Rozhanskaya O.A., Darkhanova V.G., Stroeveva N.S., Korolev K.G., Lomovskiy O.I. Osobennosti morfogeneza espartseta i lyutserny in vitro // *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 2008. No. 5 (185). P. 58–65.
24. Rozhanskaya O.A., Yudina N.V., Lomovskiy O.I., Korolev K.G. Vliyanie regulatorov rosta rastitel'nogo proiskhozhdeniya na morfogeneza rapsa in vitro // *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 2003. No. 2 (148). P. 108–112.

25. Darkhanova V.G., Trofimova I.G., Stroeveva N.S., Filippova G.V., Voronov I.V. Vliyaniye mekhanokhimicheskogo preparata pikhty na morfogenez kartofelya (*Solanum tuberosum* L.) pri mikrorazmnozhении in vitro // Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2017. No. 130. P. 670–679. doi: 10.21515/1990-4665-130-046.

About the authors

STROEVA Natalya Semenovna, research engineer, Institute for Biological Problems of Cryolithozone, SB RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia,
<http://orcid.org/0000-0003-2803-4440>, natali.stroeveva.62@mail.ru;

DARKHANOVA Valentina Gavril'evna, research engineer, Institute for Biological Problems of Cryolithozone, SB RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia,
<http://orcid.org/0000-0002-8789-5147>, darhana@mail.ru;

FILIPPOVA Galina Valer'evna, senior researcher, Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia,
<http://orcid.org/000000000-0002-2024-6062>, nureeva@yandex.ru.

Citation

Stroeveva N.S., Darkhanova V.G., Filippova G.V. Introduction to culture and in vitro reproduction of the *Hemerocallis*, variety 'Wine and Roses' // Arctic and Subarctic Natural Resources. 2020, Vol. 25, N 1. P. 85–93. <https://doi.org/10.31242/2618-9712-2020-25-1-9>