

Особенности культивирования *in vitro* редких видов семейства Iridaceae Juss.Features of *in vitro* cultivation of rare species of the family Iridaceae Juss.Малаева Е. В.^{1,2}Malaeva E. V.^{1,2}¹ Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия. E-mail: e.malaeva@mail.ru¹ Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia² Волгоградский государственный социально-педагогический университет, г. Волгоград, Россия² Volgograd State Social and Pedagogical University, Volgograd, Russia

Реферат. В статье представлена информация по совершенствованию технологии клонального микроразмножения и особенностях размножения *in vitro* некоторых видов семейства Iridaceae Juss. В коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада культивируется 6 видов рода *Iris* L. В результате исследований проведена оптимизация условий культивирования видов рода *Iris*. на разных этапах клонального микроразмножения. Подобран оптимальный режим стерилизации семян видов рода *Iris* – 5%-й раствор «Лизоформина 3000» при экспозиции 10 минут. Изучены особенности развития проростков *Iris notha* и *Iris pseudonotha* на питательных средах с высоким содержанием цитокининов и ауксинов. Наибольшая регенерационная активность у *Iris pseudonotha* и *Iris notha* наблюдалась на питательных средах ½ МС 2 iP 1,0 мг/л + 0,5 мг/л ИМК и МС + 13 мг/л БАП + 7,0 мг/л ИУК, при этом коэффициент размножения составил 7,5 и 4,7 соответственно. Оптимальной питательной средой для *Iris pumila* для длительного культивирования *in vitro* является питательная среда Кнудсона; у растений-регенерантов наблюдали медленный равномерный рост, при этом количество аномальных и нежизнеспособных растений минимально, что позволяет сохранять *Iris pumila* в коллекции *in vitro* длительное время.

Ключевые слова. Клональное микроразмножение, питательная среда, род *Iris*, эксплант, *in vitro*.

Summary. This article provides information about improving of the clonal micropropagation technology and *in vitro* reproduction peculiarities of some species of family Iridaceae Juss. *In vitro* collection of Volgograd regional botanical garden (VRBG) contains 6 species of genus *Iris*. As a result of the research, optimization of cultivation conditions at different stages of clonal micropropagation of species genus *Iris* L. cultures was carried out.

The optimal mode of sterilization seeds of species of the genus *Iris* has been selected – a 5% solution of Lysoformin® 3000 at an exposure of 10 minutes. The features of the development of *Iris notha* and *Iris pseudonotha* seedlings on nutrient media with a high content of cytokinins and auxins have been studied. The greatest regenerative activity in *Iris pseudonotha* and *Iris notha* was observed on the nutrient media ½ MS 2 iP 1.0 mg/l + 0.5 mg/l IBA and MS + 13 mg/l BAP + 7.0 mg/l IAA, the reproduction coefficient was 7.5 and 4.7, respectively. The optimal nutrient medium for *Iris pumila* for long-term cultivation *in vitro* is the Knudson nutrient medium; regenerate plants have a slow uniform growth, while the number of abnormal and non-viable plants is minimal, which allows *Iris pumila* to be preserved in the collection *in vitro* for a long time.

Key words. Clonal micropropagation, *in vitro*, explants, genus *Iris*, medium nutrient.

Все виды рода *Iris* L. флоры России представляют интерес для интродукции и селекции, большинство из них успешно культивируется в ботанических садах и включены в Красные книги различных рангов. Объектами нашего изучения являются *Iris pumila* L., *I. notha* Vieb. и *I. pseudonotha* Galushko. *Iris notha* Vieb. и *I. pumila* занесены в Красную книгу РФ (Родионенко, Литвинская, 2008; Родионенко, 2008). *I. pumila* Красную книгу Волгоградской области (Попов, Супрун, 2017). *I. notha* и *I. pseudonotha* ограничено, распространены в пределах России, в связи с этим разработка технологии массового размножения становится особенно актуальной.

В настоящее время рядом авторов проведены работы по выявлению общих закономерностей и специфических особенностей культивирования *in vitro* зародышей *Iris*, *Gladiolus*, *Belamcanda*, *Paeonia*

и *Fritillaria* (Ветчинкина, 2010; Сафронова, Малаева, 2010), определены оптимальные сроки изоляции эксплантов (Тихомирова, 2009, 2010; Ветчинкина, 2010).

Для введения *I. notha*, *I. pseudonotha* и *I. pumila* в культуру *in vitro* использовали метод эмбриокультуры.

Для культуры изолированных зародышей во многих случаях применяются питательные среды, широко используемые при культивировании растительных тканей. В качестве основы используют прописи питательных сред, к которым добавляются в зависимости от объекта и цели исследования те или иные питательные и физиологически активные вещества.

Зародыши, как правило, выделяют из созревшего семени после набухания. Зародыши, изолированные на ранних стадиях развития с недозрелого семени или семенных зачатков сразу после оплодотворения, очень маленькие, имеют малые размеры органов, из которых они выделяются, поэтому их культивирования связано с определенными технологическими трудностями (Ветчинкина, 2010). Достаточно сложно подобрать питательную среду, которая обеспечит развитие зародыша до его нормального состояния с последующим поддержанием прорастания и роста.

В связи с этим, целью наших исследований является подбор оптимальных питательных сред для длительного культивирования *in vitro* проростков *I. pumila*, *I. notha* и *I. pseudonotha*.

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурой изолированных органов и тканей (Бутенко, 1999) и методах эмбриокультуре (Здрукковская-Рихтер, 1974).

В качестве стерилизатора использовали различные концентрации препарата «Лизоформин® 3000» действующее вещество – глутаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид. Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции.

В качестве эксплантов использовали семена, собранные на территории Волгоградской области в 2020 г. и семена, собранные на интродукционном участке Волгоградского регионального ботанического сада (ВРБС). Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральные основы питательных сред Мурасиге и Скуга (МС), Гамборга и Эвелеге (В5), Кнудсона (Кн) с добавлением 20–40 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозитола, 6–8 г/л агара (Калинин и др., 1980).

На этапе микроразмножения для *I. pumila* использовали следующие варианты сред: 1. питательная среда Мурасиге – Скуга (МС) без добавления фитогормонов; 2. питательная среда Гамборга (В5) без добавления фитогормонов; 3. питательная среда Кнудсона (Кн) без добавления фитогормонов; 4. питательная среда МС, содержащая 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрации 0,5 мг/л; 5. питательная среда МС, содержащая 2 изопентениладенин (2-іР) в концентрации 0,5 мг/л; 6. питательная среда МС, содержащая 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрации 0,1 мг/л + β-индолилуксусне. кислоте (ИУК) в концентрации 0,1 мг/л.

Для проростков *Iris notha* и *Iris pseudonotha* использовали следующие модификации питательных сред: 1. питательная среда МС без добавления фитогормонов; 2. питательная среда МС, содержащая 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрации 1,5 мг/л; 3. питательная среда ½ МС, содержащая 2 изопентениладенин (2-іР) в концентрации 1,0 мг/л + β-индолилмасляне. Кислоту (ИМК) в концентрации 0,5 мг/л; 4. питательная среда МС содержащая 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрации 10,0 и 13,0 мг/л + β-индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрации от 2,0 и 7,0 мг/л соответственно.

Растения культивировали при $t = 26 \pm 2$ °С, освещенностью 2500–5000 люкс при 16 часовом фотопериоде. Все опыты проводились в трехкратной повторности, количество вариантов в каждой повторности составляло 10 пробирок. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007.

Оптимальным режимом стерилизации семян ириса является 5%-й раствор «Лизоформина 3000» при экспозиции 10 минут. При таком режиме стерилизации наблюдается максимальное количество жизнеспособных эксплантов – 60 %. При увеличении концентрации «Лизоформина 3000» до 10 % стерильность эксплантов составляла более 90 %, однако количество жизнеспособных эксплантов при этом было минимальным – 20 %.

Эксперимент по подбору питательных сред для длительного культивирования был проведен с целью увеличения времени пассажа растений-регенерантов с сохранением у проростков нормальных морфофизиологических характеристик.

На предварительном этапе при помощи культуры изолированных зародышей были получены проростки, которые в дальнейшем пересаживали на экспериментальные среды.

Питательные среды различного состава в первые 2 недели стимулировали развития проростков. На питательных средах, не содержащих фитогормонов, отмечался равномерный рост растений,

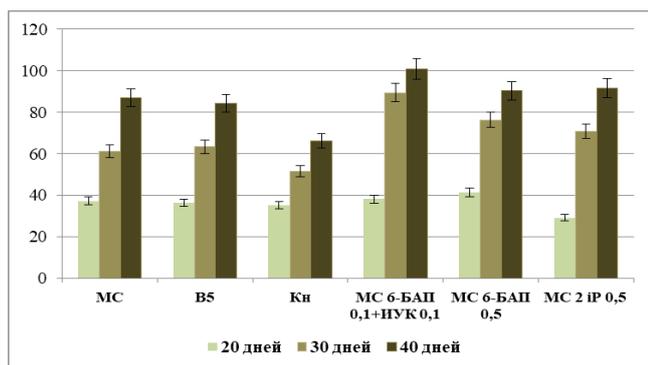


Рис. Динамика изменения длины наиболее развитого листа у проростков *Iris pumila*.

из них наибольшие показатели длины первого листа и количества листьев были получены на питательной среде МС. Однако при культивировании растений более месяца наблюдалось большое количество обводненных побегов и большое число отмерших листьев. На питательной среде Кн наблюдался замедленный, но равномерный рост растений, при этом через 1 месяц культивирования растения были без морфологических отклонений и низким количеством отмерших листьев (рис.).

Длительное культивирование растений на указанных средах, содержащих фитогормоны (более 30 дней), приводило к появлению у проростков *I. pumila* различных аномалий разви-

тия. В некоторых случаях отмечали появление морфогенного каллуса, образование которого замедляло нормальное развитие растений, что согласуется с данными других исследователей (Ветчинкина, 2010; Сафронова, Малаева, 2010).

На питательной среде МС (6-БАП 0,1мг/л + ИУК 0,1 мг/л) развитие растений было динамичным, показатели длины первого листа были наибольшими, но и показатели развития нарушений в росте и развитии растений были достаточно высокими.

Таким образом, наилучшей питательной средой для *I. pumila* при длительном культивировании *in vitro* является питательная среда Кнудсона. На данной среде у растений наблюдается медленный равномерный рост, при этом количество аномальных и нежизнеспособных растений минимально, что в свою очередь позволяет сохранять *Iris pumila* в коллекции *in vitro* длительное время.

Были исследованы особенности развития проростков *Iris notha* и *Iris pseudonotha* на питательных средах с высоким содержанием цитокининов и ауксинов (табл. 1).

Таблица 1

Динамика развития *Iris pseudonotha* на экспериментальных питательных средах

Длительность культивирования (дни)	Питательная среда									
	МС б/г (контроль)		МС + 1,5 мг/л БАП		½МС + 2 iP 1,0 мг/л + 0,5 мг/л ИМК		МС + 10 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК		МС + 13 мг/л БАП + 7,0 мг/л ИУК	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	20,5 ± 1,2	27,6 ± 1,0	32,4 ± 0,9	0	48,1 ± 1,0	8,1 ± 2,1	25,1 ± 1,1	0	32,2 ± 1,6	2,7 ± 1,1
25	41,2 ± 2,1	68,5 ± 0,7	47,7 ± 0,8	6,3 ± 1,1	50,2 ± 0,3	12,3 ± 1,4	39,2 ± 2,1	0	48,4 ± 1,1	4,9 ± 1,7
40	58,3 ± 0,2	73,2 ± 1,0	52,9 ± 1,2	10,8 ± 0,3	75,4 ± 2,1	17,5 ± 2,0	56,4 ± 1,4	0	61,1 ± 1,4	6,2 ± 2,2
55	70,4 ± 1,1	82,4 ± 1,6	68,5 ± 0,6	11,2 ± 0,8	85,2 ± 3,1	25,4 ± 0,9	64,3 ± 0,7	0	74,3 ± 1,7	7,8 ± 1,0
70	89,5 ± 0,8	90,0 ± 0,7	77,1 ± 1,0	11,2 ± 0,2	100,4 ± 1,4	32,2 ± 2,1	75,3 ± 2,4	0	85,5 ± 2,2	9,3 ± 1,3

Примеч.: 1 – длина наиболее развитого листа, мм; 2 – длина корней, мм.

Высокие концентрации фитогормонов значимого влияния на проростки *Iris pseudonotha* не оказывали. Длина наиболее развитого листа варьировала в пределах 2-3 сантиметров. Длина наибольшего листа была максимальна (100,4 ± 1,4 мм) на обедненной питательной среде ½МС + 2 iP 1,0 мг/л + 0,5 мг/л ИМК (табл. 1). Длина корней через 70 дней культивирования составила 32,2 ± 2,1 мм, что в 2 раза меньше показателей на контрольной безгормональной питательной среде (90,0 ± 0,7 мм).

Несмотря на то, что показатели длины корней на всех питательных средах, содержащих фитогормоны, уступали контрольным, корневая система была развита достаточно хорошо, образовывались корни 2 и 3 порядка. На питательной среде МС + 10 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК образование корней не было отмечено.

Для *Iris notha* показано, что наибольшая длина листа составила $98,5 \pm 2,7$ мм на питательной среде МС + 10 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК (табл. 2), что на 0,9 мм ниже контрольной величины.

Таблица 2

Динамика развития растений-регенерантов *Iris notha* на экспериментальных питательных средах

Длительность культивирования (дни)	Питательная среда									
	МС 6/г (контроль)		МС + 1,5 мг/л БАП		$\frac{1}{2}$ МС + 2 ip 1,0 мг/л + 0,5 мг/л ИМК		МС + 10 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК		МС + 13 мг/л БАП + 7,0 мг/л ИУК	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	$25,3 \pm 2,7$	$9,9 \pm 3,8$	$31,1 \pm 1,1$	0	$29,4 \pm 1,8$	0	$22,3 \pm 1,8$	0	$25,4 \pm 0,8$	0
25	$47,9 \pm 2,5$	$16,8 \pm 3,1$	$39,6 \pm 2,7$	0	$37,2 \pm 2,2$	0	$31,1 \pm 2,5$	0	$45,3 \pm 3,1$	0
40	$68,3 \pm 1,1$	$22,1 \pm 1,3$	$45,7 \pm 2,1$	0	$48,1 \pm 2,7$	0	$35,6 \pm 2,5$	0	$61,8 \pm 0,8$	0
55	$82,4 \pm 1,1$	$39,7 \pm 2,4$	$52,3 \pm 3,5$	0	$56,4 \pm 3,2$	0	$42,5 \pm 2,1$	0	$88,4 \pm 2,2$	0
70	$97,6 \pm 0,8$	$52,3 \pm 1,0$	$61,1 \pm 3,8$	0	$64,3 \pm 3,3$	0	$48,8 \pm 1,3$	0	$98,5 \pm 2,7$	0

Примеч.: 1 – длина наиболее развитого листа, мм; 2 – длина корней, мм.

Отмечено, что питательные среды с гормональными компонентами оказали угнетающее воздействие на ризогенез *I. notha*. Однако на экспериментальных питательных средах удалось индуцировать образование пазушных меристем, что увеличивает коэффициент размножения в несколько раз и ускоряет сам процесс размножения.

На контрольной питательной среде все растения-регенеранты *I. notha* и *I. pseudonotha* формировали только один побег.

Наибольшая регенерационная активность у *I. pseudonotha* и *I. notha* наблюдалась на питательных средах $\frac{1}{2}$ МС 2 ip 1,0 мг/л + 0,5 мг/л ИМК и МС + 13 мг/л БАП + 7,0 мг/л ИУК, коэффициент размножения составил $10 \pm 0,4$ и $7 \pm 0,9$ соответственно.

На питательной среде МС + 1,5 мг/л БАП наблюдался спонтанный органогенез у *I. pseudonotha* и *I. notha*, коэффициент размножения составил $2,2 \pm 0,3$ и $1,6 \pm 1,2$ соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования in vitro семян и зародышей редких видов растений: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 20 с.

Здруйковская-Рихтер А. И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений in vitro. – М.: Колос, 1974. – 60 с.

Калинин В. Ф., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.

Попов А. В., Сунрун Н. А. Касатик карликовый (*Iris pumila* L.) // Красная книга Волгоградской области. 2-изд., перераб. и доп. Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 145.

Родионенко Г. И., Литвинская С. А. Касатик ненастоящий (*Iris notha* Vieb.) Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – С. 303.

Родионенко Г. И. Касатик карликовый (*Iris pumila* L. s. l.) Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – С. 304.

Сафронова Г. Н., Малаева Е. В. *Iris pumila* L. в культуре in vitro: Труды Томского гос. ун-та «Ботанические сады. Проблемы интродукции». – Томск, 2010. – Т. 274. – С. 332–334.

Тихомирова Л. И. Особенности морфогенеза *Iris sibirica* L. в культуре in vitro // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы VIII междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул, 2009. – С. 364–369.

Тихомирова Л. И. Особенности индуцированного морфогенеза и регенерации у различных типов эксплантов in vitro культиваров видов рода *Iris* L.: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Барнаул, 2010. – 19 с.