УДК 575:631.527

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ НА ПРИМЕРЕ *IRIS SIBIRICA* L.

©2013 Л.И. Тихомирова

Алтайский государственный университет, г. Барнаул

Поступила 22.05.2013

Рассмотрено использование методов биотехнологии для сохранения *Iris sibirica* L. Данный вид включен в региональные Красные книги Алтайского и Ставропольского краёв, Омской, Тверской, Тюменской областей как редкий, встречающийся в немногих местах.

Ключевые слова: *культура ткани, биотехнологии, редкие виды, микроклональное размножение.*

Ареал *Iris sibirica* L. необычайно огромен: с запада на восток от северных областей Италии и востока Швейцарии вплоть до озера Байкал. Самые северные его популяции встречаются в южных областях Архангельской области и республики Коми, а самые южные − на Кавказе и в северной Турции. Ирисы сибирские – перспективные многолетние растения с высокими декоративными качествами.

Данный вид включен в региональные Красные книги в Алтайском и Ставропольском краях, Омской, Тверской, Тюменской областях как редкий, встречающийся в немногих местах. Две популяции находятся под защитой Висимского и Полистовского заповедников [1].

В отделе биотехнологии Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета создана коллекция лекарственных, садовых и редких видов растений, сохраняемых в культуре *in vitro*. Такие коллекции не только способствуют депонированию ценных генотипов, но и являются основой для изучения процессов морфогенеза и регенерации в культуре ткани для разработки биотехнологий на их основе.

Цель работы – разработать элементы биотехнологии для сохранения и размножения *I. sibirica* L.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей были проведены по общепринятым методикам [2]. Растительные ткани культивировали на питательных средах MS [3]. Питательные среды дополняли фитогормонами цитокининового типа действия 6-бензиламинопурином (БАП) и ауксинового типа действия α-нафтилуксусной кислотой (НУК).

При микроразмножении использовали питательные среды, содержащие 2.5, 5, 7.5 и 10 мкм БАП. Микропобеги культивировали по следующим схемам: а) пассажи без чередования сред; б) пассажи с чередованием сред с высокой концентрацией цитокинина и низкой (1 мкМ БАП). В качестве контроля была использована питательная среда, содержащая 1 мкМ БАП. Для культуры зародышей использовали питательную среду, содержащую 6 мкМ БАП + 5 мкМ НУК, дополненную L-глутамином и аденинсульфатом в количестве 100 мг/л.

Основными показателями, определяющими эффективность размножения, служили число микропобегов (пазушных и адвентивных), образовавшихся *de novo* в течение одного пассажа, и их длина. Показателями ризогенеза были число корней, их длина и общая длина корней (произведение числа и средней длины корней). Растения выращивали в лабораторных условиях при искусственном освещении (2000-4000 лк) в условиях фотопериода 16/8 час свет/темнота и при температуре 24-26^{0}С.

Анатомическое строение эксплантов изучали на постоянных препаратах, изготовленных по общепринятой методике [4] в нашей модификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Традиционно для введения в культуру *in vitro* дикорастущих видов в качестве эксплантов используют семена [5-6]. В данной работе использованы почки вегетативных побегов, фрагменты цветка и эмбриокультура.

Определён срок введения в культуру *in vitro* для зародышей ириса − 50-80 сут. Отработан способ стерилизации растительного материала, который обеспечивал на 90% стерильность зародышей и 100% их жизнеспособность. На всех испытанных питательных средах растения ириса имели хорошо развитые листья, а иногда и корни. На среде с 6 мкМ БАП + 5 мкМ НУК, дополненной L-глутамином и аденинсульфатом в количестве 100 мг/л, у зародышей *I. sibirica* формировались адвентивные побеги. Использование вегетативных почек в качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* для *I. sibirica* неэффективно ввиду их высокой инфицированности и низкой регенерационной способности. Высоким морфогенетическим потенциалом обладали экспланты органов цветка. Формирование побегов происходило путём прямой регенерации, минуя каллусную культуру, на средах с 6-8 мкМ БАП и 3-5 мкМ НУК, где содержание цитокининов превышает содержание ауксинов в 1,2 раза и более [7].

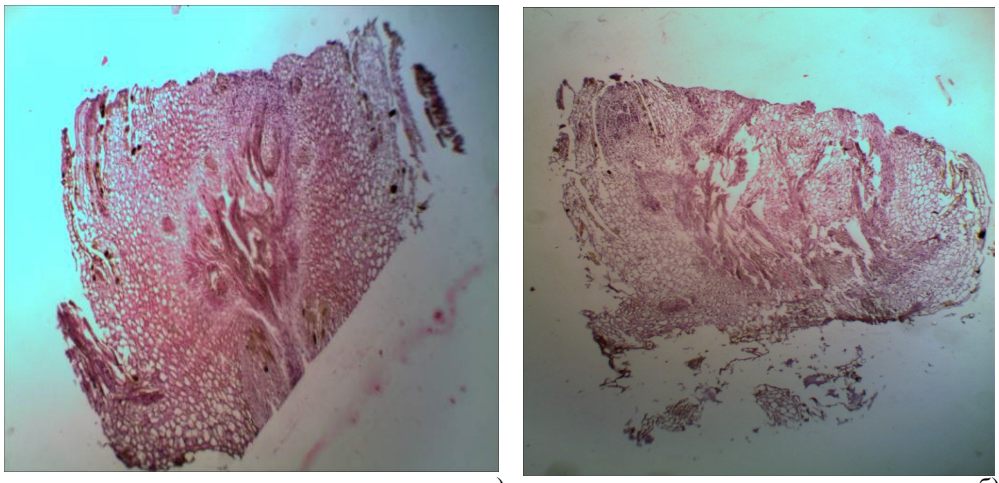
Тихомирова Людмила Ивановна, к.б.н., заведующая отделом биотехнологии Южно-Сибирского ботанического сада, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

На этапе собственно микроразмножения важным является правильный подбор и оптимальная концентрация фитогормонов. Использование БАП показало его высокую эффективность на регенерационную способность ириса сибирского. При наличии в питательной среде этого гормона в широком диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ, регенеранты характеризовались хорошим развитием. При этом БАП влиял как на коэффициент размножения, так и на длину побегов. В концентрации от 1 мкМ до 7,5 мкМ гормональный препарат влиял на число адвентивных побегов, изменяя их от 1 до 6 штук на эксплант за один пассаж. Высокие концентрации БАП (выше 10 мкМ) снижали количество образующихся побегов и вызывали их уродливость.

На всех этапах развития растений в культуре ткани основной задачей является оптимизация питательных сред и схем культивирования для создания условий роста, приближенных к естественным для данного вида. Анатомическое исследование органов регенерантов в сравнении с органами интактных растений позволяет на тканевом уровне определить состояние растений в зависимости от состава питательных сред и подобрать условия для нормального развития регенерантов.

Сравнительное изучение анатомической структуры корневища ириса в культуре *in vitro* показало, что культивирование на агаровых питательных средах приводит к сокращению площади сечения поперечного среза корневища, уменьшению объёма коровой паренхимы и увеличению доли тканей центрального цилиндра. Вероятно, это свидетельствует об усилении проводящей роли корневища в культуре *in vitro* и снижении запасающей, в связи с постоянным минеральным и гормональным составом питательной среды и отсутствием влияния сезонных природных явлений.

При изучении анатомического строения побегов *I. sibirica,* выращенных на питательных средах с разной концентрацией фитогормона, были отмечены особенности, связанные с культивированием в условиях *in vitro* и содержанием сред. Большое влияние на развитие побегов оказывали концентрация БАП в питательной среде. У побегов, выросших на средах с минимальной концентрацией БАП 1,0 мкМ, цитоплазма клеток была более интенсивно окрашена, плотная, центральный цилиндр занимал ½ часть побега. Регенерационная деятельность слабая, в основном присутствовало корнеобразование. У побегов, выросших на средах с максимальным содержанием БАП (10,0 мкМ), клетки паренхимы были слабо окрашены, геммогенез отмечался в слабой степени, центральный цилиндр занимал 2/3 части побега (рис. 1).



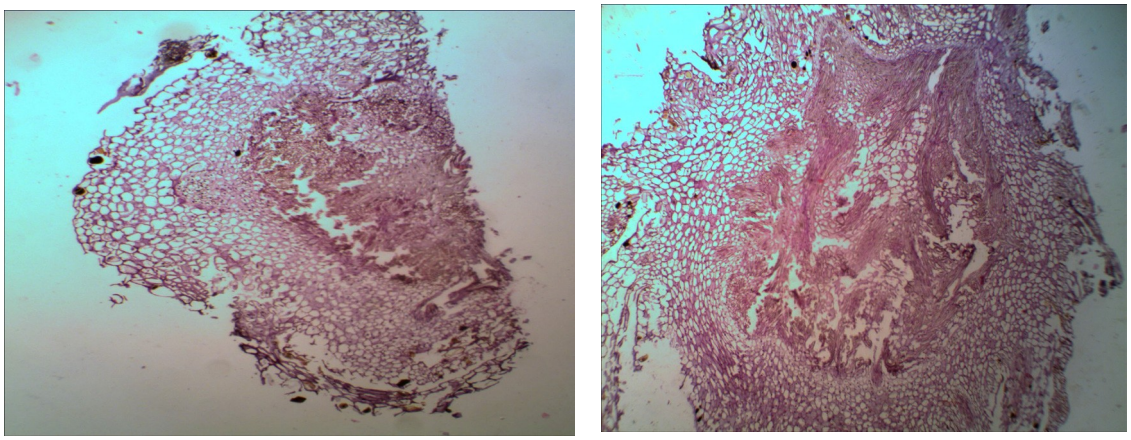
а) б)

Рис. 1. Внутреннее строение побега *I. sibirica* (продольный срез) на питательной среде MS, содержащей: а) 1,0 мкМ, б) 10,0 мкМ БАП. Увел. ×100

Активный геммогенез можно было наблюдать, если для культивирования микропобегов *I. sibirica* использовали схему с чередованием сред с высокой и низкой концентрацией цитокинина (БАП). Введение в среды высоких концентраций цитокинина вызывало массовое появление полиад (группы делящихся клеток под общей оболочкой) в центральном цилиндре побега. В том случае, если гормональная нагрузка оставалась на прежнем уровне, полиады, по-видимому, разрушались и формирования меристематических комплексов не происходило. Снижение концентрации БАП до 1,0 мкМ в последующем пассаже не приводило к его накоплению в тканях выше физиологической нормы. Растительный организм имел время для инактивации и разрушения гормона, это давало возможность полиадам приступить к образованию массива меристематических клеток, из которого впоследствии дифференцировались многочисленные побеги. Одновременно с этим материнский побег формировал свою проводящую систему, обеспечивающую в необходимой мере дочерние побеги питанием. Анатомическое строение материнских побегов при чередовании сред значительно отличалось от строения побегов, выращенных без чередования.

При гистологическом анализе побегов, вырос-

ших при чередовании сред, было отмечено: эпидермальные клетки плотно сомкнуты, таблитчатой формы. Внешняя поверхность побега неровная, на поперечном срезе располагалась в виде извилистой линии. В первичной коре паренхимные клетки располагались плотно. Склеренхима просматривалась отдельными фрагментами. Отмечали массу делящихся клеток в районе перицикла и в центральном цилиндре. Практически во всех пазухах листьев закладывались почки и развивались побеги (рис. 2).



а) б)

Рис. 2. Внутреннее строение побега *I. sibirica* на питательной среде MS, содержащей 10,0 мкМ БАП: а) без чередования сред, б) с чередованием сред. Увел. ×100

Снятие гормональной нагрузки цитокинина в процессе чередования сред положительно влияло в дальнейшем на укоренение побегов. Было отмечено, что высота у этих растений при укоренении увеличилась на 28,6%, число корней – на 71,6%, длина корней – на 24,4%, а суммарная длина корней увеличилась вдвое (рис. 3). Также было выявлено, что на эффективность процесса ризогенеза на этапе адаптации оказывают влияние концентрации цитокинина, присутствующие в питательных средах на этапе собственно микроразмножения. Для *I. sibirica* максимальные значения числа корней, их длины и соответственно общей длины корней определяли при концентрации БАП 2,5 мкМ. На средах с более высокой (5,0–10,0 мкМ) концентрацией цитокинина эти показатели были значительно ниже (табл.).

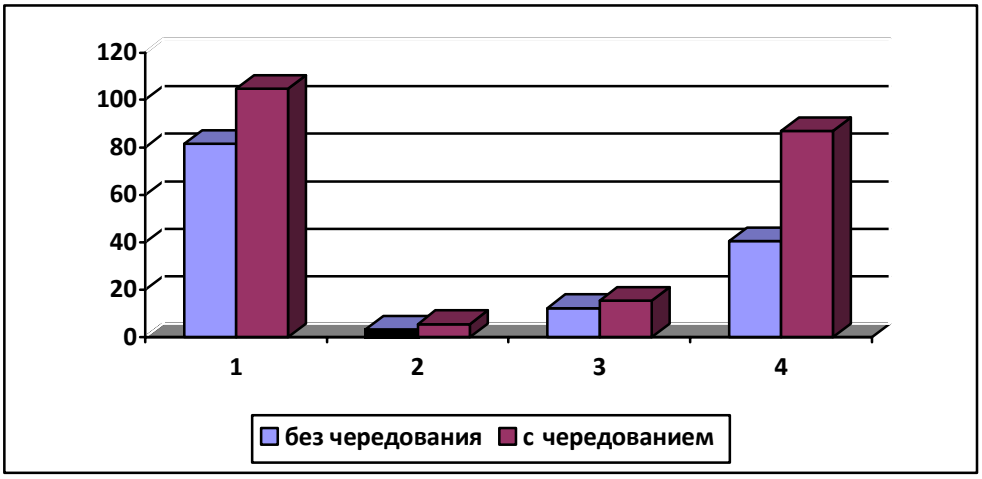


Рис. 3. Влияние чередования сред с низким и высоким содержанием БАП на этапе размножения *I. sibirica* на процесс ризогенеза. 1. – высота растений при укоренении (мм), 2. – число корней, 3. – длина коней (мм), 4. – суммарная длина корней (мм)

Таблица. Влияние концентрации БАП на этапе собственно микроразмножения на прирост корней на этапе адаптации *у I. sibirica*

БАП *мкМ*, этапа собственно микроразмножения	До адаптации			После адаптации			% прироста корней
	число корней	длина корней		число корней	длина корней		
		средняя, *мм*	общая, *мм*		средняя, *мм*	общая, *мм*	
2,5	4,0±0,43	10,71±0,82	42,84	4,83±0,25	12,92±1,0	62,4	31,34
5,0	2,4±0,51	9,08±1,81	21,79	2,6±0,55	10,6±1,71	27,56	20,94
7,5	2,0±0,25	8,91±0,18	17,82	2,0±0,15	11,5±2,37	23,0	22,52
10,0	2,0±0,21	4,5±0,86	9,0	2,0±0,19	5,0±0,19	10,0	10,0

Разработаны элементы биотехнологии для сохранения и размножения *I. sibirica* L.: подобраны оптимальные типы эксплантов, определены концентрации БАП на этапе собственно микроразмножения. На основании гистологического анализа доказана необходимость чередования высоких и низких содержаний БАП в питательных средах в процессе микроклонального размножения *I. sibirica.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алексеева Н.Б.* Виды рода *Iris* во флоре России. Проблемы охраны в природе и интродукции: Автореф. дис. … канд. биол. наук. СПб., 2005. 23 с.
2. *Калинин Ф.А., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. 488 с.
3. *Murashige T., Skoog F.* A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 4. P. 473.
4. *Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др.* Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ, 2004. 312 с.
5. *Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А.* Некоторые аспекты использования культуры семян и зародышей *in vitro* для изучения и сохранения биоразнообразия рода *Iris* L. // Биоразнообразие природных и антропогенных экосистем: Сб. статей 3 молод. научн. семинара. Екатеринбург, 2005. С. 21-25.
6. *Вайновская И.Ф., Фоменко Т.И.* Разработка биотехнологических приёмов сохранения и размножения ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) сем. Iridaceae // Мат. междунар. конф., посв. 80-летию ЦБС НАН Беларуси. Т. 2. Минск, 2012. С. 384-388.
7. *Тихомирова Л.И.* Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // Turczaninowia. 2010. № 13 (3). С. 147-151.

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF RARE SPECIES KEEPING ON THE EXAMPLE OF *IRIS SIBIRICA* L.

©2013 L.I. Tikhomirova

Altai State University, Barnaul

Application of biotechnological methods for keeping of *Iris sibirica* L. has been discussed. This species is included in regional Red books in the Altai and Stavropol Territories, Omsk, Tver, Tyumen regions as a rare, distributed very rarely, species.

***Key words**: tissue culture, biotechnologies, rare species, microclonal propagation.*

Lyudmila Tikhomirova, Candidate of Biology, head of biotechnology department, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru