

УДК 582.572.7: 581.16/57.085.2

А.Ю. Набиева
Т.В. ЕлисафенкоA.Yu. Nabieva
T.V. Elisafenko**ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ РЕДКИХ СИБИРСКИХ ВИДОВ РОДА *IRIS* L. –
I. GLAUDESCENS BUNGE И *I. BLODOWII* LEDEB. В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ****PECULIARITIES OF REPRODUCTION OF RARE SIBERIAN SPECIES OF THE GENUS *IRIS*
L. – *I. GLAUDESCENS* BUNGE И *I. BLODOWII* LEDEB. IN CULTURE**

Аннотация. Обобщены данные по изучению особенностей семенного размножения *Iris glaucescens* Bunge в естественных условиях и *I. bloudowii* Ledeb. при интродукции в ЦСБС СО РАН. Предложен альтернативный способ получения растений-регенерантов этих видов из незрелых семян в культуре *in vitro*. Показана роль регуляторов роста 2,4-Д и БАП как в реализации программ морфогенеза, так и для микроклонального размножения.

Ключевые слова: *Iris glaucescens*, *Iris bloudowii*, семенное размножение, интродукция, культура *in vitro*, регуляторы роста, микроклональное размножение.

Summary. The data concerning peculiarities of seed germination of rare Siberian species *Iris glaucescens* Bunge and *I. bloudowii* Ledeb. in nature and under introduction in CSBG SB RAS were summarized. The alternative method of plants regeneration from immature seeds in tissue culture is proposed. The role of growth regulators 2,4-D and BAP was revealed both in the morphogenetic ways of realization, and in the microclonal propagation.

Key words: *Iris glaucescens*, *Iris bloudowii*, seed propagation, introduction, tissue culture, growth regulators, microclonal propagation.

Введение. В России произрастает 40 видов и 1 разновидность рода *Iris* L. (Алексеева, 2008), из них более половины – 24 вида – в Сибири (Конспект ..., 2005). Многие виды рода *Iris* включены в Красные книги как государственного, так и регионального уровня. *Iris glaucescens* Bunge включен в Красную книгу Красноярского края (2005), Красную книгу Новосибирской области (2008) и Красную книгу Алтайского края (2006). *Iris glaucescens* и *I. bloudowii* Ledeb. вошли в список «Редкие и исчезающие растения Сибири» (1980). Они принадлежат одному подроду *Iris*, но разным секциям: *Hexapogon* (*I. bloudowii*) и *Iris* (*I. glaucescens*). Это многолетние поликарпические короткочерешковые рыхлодерновинные растения. *Iris bloudowii* – луговой вид, распространен во внутритропической полосе Азии, *I. glaucescens* – степной вид, имеет южно-сибирско-азиатский ареал. В естественных условиях оба вида приурочены к участкам, которые подвержены сильному антропогенному воздействию (выпас и пашни), что приводит к неуклонному сокращению площадей их местообитаний. В связи с этим сохранение и размножение дан-

ных видов в условиях культуры становится особенно актуальным.

Цель работы – выявить особенности размножения *I. bloudowii* и *I. glaucescens* в условиях *in vivo* и *in vitro*, определить оптимальный путь сохранения и размножения данных видов в культуре.

Объекты, методы и условия исследований. Растения изучаемых видов неоднократно интродуцировались в ЦСБС с 1973 г. (Семенова, 2001, 2007). В настоящее время в коллекции представлены интродуценты из 2 природных популяций *I. bloudowii* и из 3 популяций *I. glaucescens* (табл. 1).

Для изучения размножения *in vivo* использовали лабораторно-теплично-грунтовой метод, разработанный Г.П. Семеновой (Дюрягина, 1982) и посев в грунт. Для определения грунтовой всхожести был проведен осенний посев в 4-кратной повторности по 100 семян. При изучении семенной продуктивности использовали методику В.И. Вайнагий (1974). Плодоцветение (процент завязывания плодов) определяли как отношение числа образованных плодов к числу цветков (в %).

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101; 630090, Новосибирск, Россия;
e-mail: bluebird@list.ru, tveli@ngs.ru
Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Zolotodolinskaya str., 101; 630090, Novosibirsk, Russia

Поступило в редакцию 18.01.2011 г.

Submitted 18.01.2011

Таблица 1

Происхождение интродукционных популяций *Iris bloudowii* и *I. glaucescens* в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск)

Вид	Природное местообитание	Год интродукции
<i>Iris bloudowii</i>	Республика Алтай, Онгудайский р-н, Семинский перевал, влажный луг	1980
	Республика Тыва, Тоджинский р-н, заповедник “Азас” г. Улуг-Даг, южный склон, каменистая степь	2000
<i>Iris glaucescens</i>	Алтайский край, Локтевский р-н, окр. дер. Устьянка, каменистая степь, склон южной экспозиции	2006
	Алтайский край, Третьяковский р-н, окр. пос. Екатерининское, каменистый склон	2007
	Новосибирская обл., Карасукский р-н, болото Надыр	2009

В качестве эксплантов были использованы семена *I. glaucescens*, собранные в Новосибирской области в 2009 г., и семена *I. bloudowii*, полученные от растений-интродуцентов из алтайской популяции, произрастающих на интродукционном участке ЦСБС с 2000 г. Семена *I. bloudowii* были введены в культуру в два срока: 1 посев – на 40–42 день и 2 посев – на 56–58 день после опыления (ДПО). Отмечено, что у большинства семян 1 посева эндосперм находился в фазе восковой спелости, тогда как во 2 посевах – в фазе полной спелости. Семена *I. glaucescens* изолировали из зеленых коробочек, эндосперм семян находился в фазе восковой спелости. У семян обоих видов, находящихся в фазе восковой спелости, семенную оболочку оставляли неповрежденной, как и у части спелых семян *I. bloudowii*, тогда как другую их часть надрезали в апикальной области. Плоды стерилизовали по следующей схеме: коробочки с семенами отмывали в 15% растворе Domestos на шейкере (20 мин.), 20 мин. – под проточной водой, затем – в асептических условиях погружали на 1 минуту в 70% раствор этанола, после чего стерилизовали 0,2% раствором сулемы (7 мин.) и четыре раза промывали стерильной водой. Семена вынимали из коробочек и помещали для прорастания на агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962). Использовали регуляторы роста: 2,4 – дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), 6-бензиламинопуридин (БАП). Для посева семян *I. bloudowii* и *I. glaucescens* были использованы следующие варианты сред: 1. MS0 – без регуляторов роста; 2. MS + 0,5 мг/л БАП; 3. MS + 1 мг/л 2,4 Д + 0,5 мг/л БАП. В каждом варианте использовали 30–40 семян. Для собственно размножения в среду MS вносили 0,25 мг/л БАП. Продолжительность одного пассажа составляла 45 дней.

Семена проращивали при температуре 22±24° С под люминесцентными лампами с фотопериодом 16/8 часов. Полученные растения культивировали в дальнейшем на свету при тех же условиях, либо помещали в световой термостат фирмы Rumed (Германия) при + 7°С сроком на 4–8 недель. Полученные регенеранты высаживали в теплицу в смесь торф : песок : перегной, взятых в равных долях.

Результаты и их обсуждение. Размножение видов *in vivo*. Семена *I. glaucescens* прорастают при температуре 18–24°С на свету, период до прорастания составляет 15–30 дней, прорастание длится 40–60 дней, всхожесть – 25–50 % (Семенова, 2007). В условиях культуры растения выпадают на 4–5 год. Ежегодное цветение у интродуцированных растений нами наблюдалось только у популяции из окр. дер. Устьянка, причем плоды не формировались. В остальных популяциях растения не цвели. Грунтовая всхожесть не определена из-за недостатка семян. В естественных условиях процент семенификации высокий (табл. 2).

Использование лабораторно-теплично-грунтового метода для *I. bloudowii* показало хорошие результаты. Семена прорастают на свету при температуре 20–25° С, для них характерен длительный период до прорастания (15 дней) и прорастания (131 день), всхожесть составляет 40% (Семенова, 2007). Приживаемость растений как в тепличных условиях, так и при пересадке в грунт – высокая, до 100%. При осеннем посеве семян в грунт мы наблюдали прорастание на следующий год, грунтовая всхожесть – от 10 до 70%, среднее значение – 26%. На генеративном побеге формируется от 1 до 3 плодов. Процент плодоцветения – низкий (13–22%), процент семенификации от 11 до 92%. В условиях культуры создаются многолетние устойчивые популяции. Самосев не наблюдался.

Таблица 2

Характеристика семенной продуктивности *Iris bloudowii* (в условиях интродукции, ЦСБС, г. Новосибирск) и *I. glaucescens* (Новосибирская обл., Карасукский р-н, болото Надыр)

Вид	Популяция, дата сбора семян	Параметр	Число		Процент семенификации
			семян	семязачатков	
<i>Iris bloudowii</i>	Республика Тыва, 13.07.2009	M±m	52,77±5,09	72,85±3,28	71,50±6,26
		V, %	34,76	16,21	31,58
		диапазон значений	6-82	54-96	11,11-91,67
	Республика Алтай, 13.07.2002	M±m	37,05±3,71	67,53±2,92	53,58±4,59
		V, %	43,64	18,83	37,38
		диапазон значений	6-60	36-89	16,67-78,87
<i>Iris glaucescens</i>	Новосибирская обл., 25.06.2009	M±m	32±4,01	39±3,17	80,36±5,88
		V, %	31,37	19,93	17,91
		диапазон значений	15-42	26-47	57,69-94,87

Таким образом, при семенном размножении *I. bloudowii* можно использовать лабораторно-теплично-грунтовый метод, разработанный Г.П. Семеновой (Дюрягина, 1982) и посев семян в грунт, что подтверждает вывод Г.П. Семеновой (2007), охарактеризовавшей *I. bloudowii* как перспективный вид для интродукции. В то же время, *I. glaucescens* имеет неустойчивый феноритм, к этому виду неприменимы классические способы семенного размножения, т. к. в условиях культуры отсутствует цветение или плодоношение, в связи с чем его следует отнести к малоперспективным.

Размножение видов *in vitro*. Использование биотехнологических приемов широко применяется для сохранения редких видов ирисов как из европейской части России (Ветчинкина, 2010; Ишмуратова, 1999), так и с Дальнего Вос-

тока (Болтенков, 2002). Изученные нами виды – *I. glaucescens*, *I. bloudowii* относятся к подроду *Iris*, семена которых имеют неглубокий физиологический тип покоя (В1-2) (Николаева, 1982). Известно, что их прорастание в значительной степени ингибируется ороговением эндосперма и покровов у зрелых семян (Маркова, Конькова, 2010).

Незрелые семена *I. glaucescens*, *I. bloudowii* прорастали в течение 12–15 дней, сам период прорастания не превышал 30–40 дней, что значительно меньше сроков прорастания в культуре *in vivo*. Всхожесть семян была выше на безгормональной среде MS: для *I. glaucescens* – на 25,4%, для *I. bloudowii* – на 15,4%. У незрелых семян обоих видов на среде MS, включавшей 1 мг/л 2,4 Д и 0,5 мг/л БАП, кроме появления проростков, было отмечено также образование каллуса (табл. 3).



Рис. 1. Индукция адвентивных побегов из каллусной ткани, образовавшейся при прорастании незрелых семян *Iris glaucescens* на среде MS с добавлением 1 мг/л 2,4 Д + 0,5 мг/л БАП.

Таблица 3

Прорастание семян и каллусогенез *I. glaucescens* и *I. bloudowii* в культуре *in vitro*

Вид	Проросшие семена, % Варианты сред			Индукция каллусогенеза, % на MS +1 мг/л 2,4 Д + 0,5 мг/л БАП
	MS0	MS+0,5 БАП	MS +1 мг/л 2,4 Д + 0,5 мг/л БАП	
<i>I. glaucescens</i>	66,8	41,4	16,2	8,5
<i>I. bloudowii</i> , 1 посев	55,4	40,0	22,8	21,8
2 посев				
а) скарифиц.	32,1	55,0	7,9	13,7
б) нескариф.	11,5	9,8	0	0

Индукцированный каллусогенез был выражен в процентной доле семян, образовавших каллус, к общему числу семян. У зрелых скарифицированных семян *I. bloudowii* во 2 срок посева каллусогенез был отмечен у небольшого числа семян (7,9%) только при добавлении к MS 0,5 мг/л БАП и 1 мг/л 2,4 Д (рис. 1).

Прорастание семян *I. bloudowii* в фазе полного созревания затруднено (9,8–11,5%), если не была проведена их скарификация. Кроме того, нескарифицированные семена данного вида ириса прорастали в течение 1,5–2,5 месяцев в культуре *in vitro*. Скарификация в апикальной части позволила увеличить всхожесть семян *I. bloudowii* в фазе полной спелости семян (56–58 ДПО) с 20,6 до 45,2% по сравнению с неповрежденными семенами. Внесение в среду MS 0,5 мг/л БАП способствовало увеличению всхожести зрелых семян *I. bloudowii* на 22,9% по сравнению с их прорастанием на среде без регуляторов роста.

Стадия проростка начинается с появлением первого листа, заканчивается вступлением в ювенильную стадию развития растения, характеризующуюся образованием 4–5 листьев. В культуре *in vitro* проростки *I. glaucescens* и

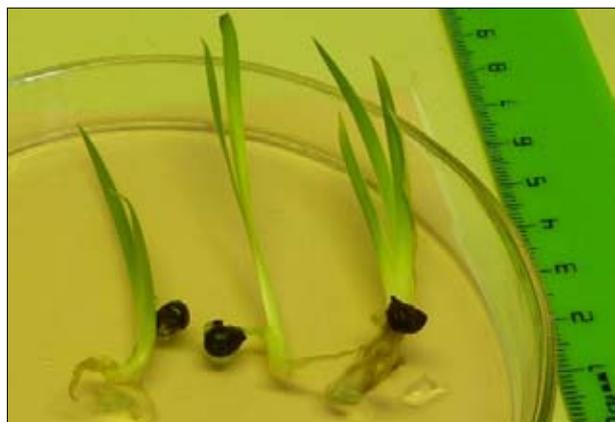


Рис. 2. Ювенильные растения *Iris bloudowii* через 6 недель культивирования *in vitro*.

I. bloudowii, полученные из семян восковой спелости, на 40–50 день культивирования переходили к ювенильной стадии, в то время как проростки *I. bloudowii*, полученные из скарифицированных спелых семян, образовывали до 5 листьев, в среднем, на 90 день (рис. 2).

Полученные растения-регенеранты уже к концу третьего месяца культивирования находились в иматурной стадии, характеризующейся активным образованием вегетативных органов, наличием хорошо развитой корневой системы, образованием адвентивных побегов (рис. 3).

Вторым этапом культивирования после получения побегов являлась их мультипликация под воздействием цитокинина БАП. При переносе на среду собственно размножения (MS + 0,25 мг/л БАП) практически у всех регенерантов *I. glaucescens* и *I. bloudowii* происходило появление множественных побегов через 1–1,5 месяца. Образование побегов происходило путем заложения адвентивных почек у основания побега растения, полученного из семени, причем появление новых побегов было отмечено как прямым путем, так и непрямым – из каллуса (рис. 1). Процесс адвентивного побегообразования приводил к активной кластеризации побегов, в среднем кластер состоял не менее чем из 6 побегов.

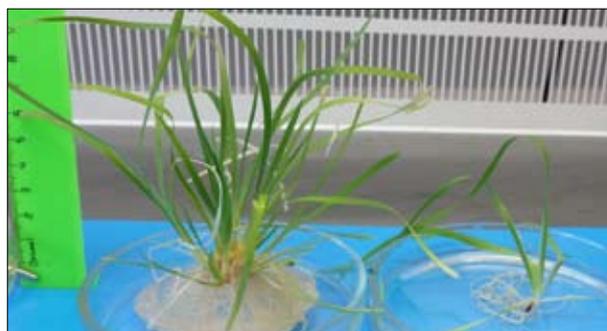


Рис. 3. а) Иматурное растение *Iris glaucescens* (15 недель культивирования *in vitro*); б) Растение-регенерант *I. glaucescens*, выделенное из кластера побегов для пересадки *ex vitro*.

Растения-регенеранты, имеющие корни, выделяли из подобных кластеров и помещали на срок до двух месяцев на среду MS без регуляторов роста в световой термостат при + 7°. Данный прием позволил им в дальнейшем успешно адаптироваться к условиям *ex vitro*.

Заключение. Таким образом, наибольшее количество проростков *I. glaucescens* и *I. bloudowii* было получено из незрелых семян данных видов в асептической культуре на среде MS без регуляторов роста. Изучение особенностей прорастания семян *I. glaucescens* и *I. bloudowii* в культуре *in vitro* показало, что наиболее целесообразно применение семян в стадии восковой спелости эндосперма, позволяющее получить растения-регенеранты, находящиеся в иматурном состоянии, в более короткие сроки по сравнению со стандартными методами проращивания семян. Для размножения данных

видов эффективно использование цитокинина БАП в концентрации 0,25–0,5 мг/л. Заложение множественных побегов под действием данного регулятора роста возможно как на самом экспланте, так и через каллусную ткань. При проращивании незрелых семян *I. glaucescens* и *I. bloudowii* спустя 4–5 месяцев культивирования были получены растения-регенеранты, находящиеся в иматурном состоянии (рис. 4).

Увеличение коэффициента размножения с помощью биотехнологических приемов особенно актуально для *I. glaucescens*, но так же важно и для *I. bloudowii*, который имеет невысокую грунтовую всхожесть (26%) и низкий процент плодоцветения (13–22%).

Исследования выполнены при поддержке гранта № 23 Президиума РАН «Биологическое разнообразие) и Интеграционного проекта СО РАН № 28.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Н.Б.** Род *Iris* L. (Iridaceae) в России // Turczaninowia, 2008. – Т. 11, № 2. – С. 5–68.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.** Прикладные аспекты эмбриологии. Автономность зародыша и эмбриокультура цветковых растений // Бот. журн., 1987. – Т. 72, № 2. – С. 55–61.
- Болтенков Е.В.** Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris* L. (Iridaceae) для использования в биотехнологии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2002. – 24 с.
- Вайнагий В.И.** О методике изучения семенной продуктивности растений // Бот. журн., 1974. – Т. 59, № 6. – С. 826–831.
- Ветчинкина Е.М.** Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 20 с.
- Дюрягина Г.П.** К методике интродукции редких и исчезающих растений // Бот. журн., 1982. – Т. 67, № 5. – С. 679–687.
- Ишмуратова М.М.** Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris* L. // Раст. ресурсы, 1999. – Т. 35, вып. 4. – С. 67–73.
- Ишмуратова М.И., Ткаченко К.Г.** Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro*. – Уфа: Гилем, 2009. – 116 с.
- Конспект флоры Сибири. Сосудистые растения. – Новосибирск: Наука, 2005. – 362 с.
- Красная книга Красноярского края. Растения и грибы. – Красноярск: Поликом, 2005. – 369 с.
- Красная книга Новосибирской области: Животные, растения и грибы. – Новосибирск: Арта, 2008. – 528 с.
- Красная книга Алтайского края. Растения. – Барнаул: ОАО «ИПП Алтай», 2009. – 262 с.
- Маркова Е.М., Конькова Л.И.** Развитие особей двух видов рода *Iris* L. в культуре *in vitro* // Вестн. Удмуртск. ун-та, 2010. – Вып. 4. – С. 69–73.
- Редкие и исчезающие растения Сибири. – Новосибирск: Наука, 1980. – 223 с.
- Семенова Г.П.** Интродукция редких и исчезающих растений Сибири. – Новосибирск: Наука, 2001. – 132 с.
- Семенова Г.П.** Редкие и исчезающие виды флоры Сибири: биология, охрана. – Новосибирск: Гео, 2007. – 408 с.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant, 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.