

М.О. ТВАРДОВСЬКА, В.А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143 м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO ПІВНИКІВ НИЗЬКИХ (IRIS PUMILA L.)

Описано умови для ефективного проростання насіння *Iris pumila* L. Отримано рослини *in vitro* та культуру тканин цього виду. Встановлено, що експланти кореневого походження здатні формувати калус на середовищі Мурашіге—Скуга з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину та 0,5 мг/л 2, 4-дихлорфеноксіоцтової кислоти. Підібрано умови для росту рослин *I. pumila* в умовах закритого ґрунту з метою реінтродукції в природне середовище.

Ключові слова: *Iris pumila* L., асептичні проростки, культура тканин рослин.

Півники низькі (*Iris pumila* L.) — низькоросла трав'яниста однодольна рослина роду *Iris* L., яка трапляється на сході Центральної та Південної Європи, у степовій зоні Східної Європи, Закавказзі та Західному Казахстані [15]. В Україні *I. pumila* поширені на більшій частині території, окрім Карпат, Полісся та півдня Степу [1]. У 8 областях вид перебуває під регіональною охороною і може бути кандидатом на включення до Червоної книги України [12]. Вид зростає у типчакково-ковилкових степах, на щебенюватих та кам'янистих степових схилах, піщаних терасах річкових долин [14].

I. pumila — короткочореневищний багаторічник, ксерофіт. Розмножується насінням та характеризується здатністю до вегетативного розмноження, яке відбувається внаслідок інтенсивного галуження кореневищ [3].

Цей вид, окрім декоративного значення, є важливим з фармацевтичної точки зору, оскільки накопичує ксантони [18].

Плоди у півників — нижні синкарпні коробочки. Насіння має тривалий період спокою, у деяких видів цей період становить кілька років. Згідно з М.Г. Ніколаєвою [11], це фізіологічний тип спокою. Насіння про-

ростає протягом 2-3 років, тому при введенні в культуру *in vitro* видів роду *Iris* найчастіше використовують культуру ізольованих зародків, яка має низку переваг порівняно з традиційними методами вирощування: подолання спокою насіння; звільнення від накопичених соматичних мутацій і вірусних захворювань; підтримання генетичного різноманіття півників [4, 9].

Дослідження дикорослих видів роду *Iris* та введення їх у культуру має важливе значення не лише для збагачення асортименту квітничково-декоративних багаторічників, а й для збереження генофонду зникаючих рослин, зокрема, занесених до Червоної книги України та регіональних списків. У зв'язку з цим актуальним та перспективним є поновлення природних популяцій видів шляхом реінтродукції в природне середовище посадкового матеріалу, отриманого у великій кількості в умовах *in vitro*.

Мета роботи — введення в культуру *in vitro* *Iris pumila* для отримання асептичних проростків з наступною реінтродукцією в природне середовище, а також одержання культури тканин цього виду.

Об'єкт і методи досліджень

Проростання насіння. Вихідним матеріалом для дослідження було насіння *Iris*

rumila, зібране із трьох місць зростання на території України — с. Придніпровське (Чернобаївський р-н, Черкаська обл.), с. Коларово (Жовтневий р-н, Миколаївська обл.) та с. Дмитрівка (Очаківський р-н, Миколаївська обл.).

При висаджуванні *in vitro* насіння *I. rumila* скарифікували, оскільки воно оточене твердою насінною шкіркою. Для індукції проростання насіння витримували протягом 17–18 год у розчині гіберелової кислоти (ГК₃) з концентрацією 600 мг/л [13], потім стерилізували протягом 40 хв у 15 %-му розчині перексиду водню та висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС) [19] з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2) без фітогормонів. Насіння пророщували на світлі за температури 20–22 °С і відносної вологості повітря 70–80 %. Ефективність проростання насіння визначали як відношення кількості пророслого насіння до загальної кількості насінин.

Отримання рослин *in vitro*. Отримані з насіння асептичні 1-місячні рослини висаджували у скляні посудини об'ємом 250 мл, які містили 30 мл агаризованого живильного середовища МС/2 без фітогормонів. Для кращого вкорінення отриманих проростків деякі рослини переносили на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НОК).

Отримання культури тканин. З метою індукції калусоутворення використовували

фрагменти корінців розміром 8–12 мм від асептичних проростків, які висаджували на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л 2, 4-дихлорфеноксіцтової кислоти (2, 4-Д). Відсоток калусогенезу (ВК) визначали через 4 тиж субкультивування за формулою

$$BK = \frac{N_k}{N} \cdot 100\%,$$

де N_k — кількість експлантів, на яких утворився калус; N — кількість висаджених експлантів (ураховували лише неінфіковані експланти).

Для проліферації отриманий калус відділяли від експлантів і висаджували на середовище такого самого складу. Культури інкубували в темряві за температури 23–24 °С, субкультивування проводили через кожні 4 тиж.

Отримані дані опрацьовували статистичними методами [8].

Результати та обговорення

Проростання насіння та отримання рослин *in vitro*. На динаміку проростання значний вплив справляли тип спокою насіння, спосіб обробки ГК₃, а також тривалість стратифікації і термін зберігання насіння. У результаті проведених нами досліджень встановлено, що насіння *Iris rumila* краще проростає за постійної температури 22 °С і освітлення протягом 16 год/добу. Найефективнішим способом



Рис. 1. Отримання асептичних проростків *Iris rumila* та їх перенесення у закритий ґрунт: а — проростання насіння; б — рослина *in vitro*; в — рослина в умовах закритого ґрунту

подолання спокою насіння є холодова (-20 °С) стратифікація протягом 1–2 міс, а також його скарифікація, яка полегшує доступ води та мінеральних речовин до зародку. Для підвищення ефективності проростання насіння його витримували у розчині ГК₃. За таких умов перші сходи з'являлися на 11–14-ту добу (рис. 1, а). Відсоток проростання насіння був найвищим у жовтні та лютому.

Є дані, що попередня обробка насіння *I. pumila* ГК₃ знижує відсоток його проростання з 92,15 до 79,15 %. Установлено, що стратифікація інгібує проростання насіння, яке зберігалось один рік, і значно стимулює проростання насіння, яке зберігалось два роки [4]. Для багатьох видів ірисів (*I. ensata* Thunb., *I. pseudacorus* L., *I. laevigata* Fisch., *I. setosa* Pall. ex Link, *I. sibirica* L., *I. spuria* L., *I. pumila*) виявлено, що попередня скарифікація насіння значно підвищує відсоток його проростання [2, 4].

Ефективність проростання була високою у насіння *I. pumila* з усіх трьох досліджених нами місць зростання (рис. 2). Найвищим цей показник був для насіння з популяції поблизу с. Дмитрівка — 95,6 %, дещо нижчим — для насіння з популяції поблизу с. Коларово — 83,3 % та с. Придніпровське — 77,0 %.

При висадженні насіння *I. pumila* в умови *in vitro* відзначено, що протягом одного місяця відбувається формування повноцінної рослини, яка має розвинену кореневу систему і надземний пагін із 2–3 листків.

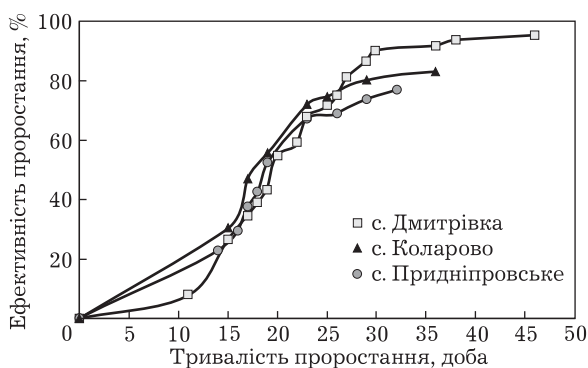


Рис. 2. Динаміка проростання насіння *Iris pumila*

Схожі результати отримано при введенні в асептичні умови *I. pseudacorus* (протягом 15–30 днів) та *I. sibirica* (протягом 30–40 днів) [10].

Нами відзначено високі темпи росту асептичних проростків *I. pumila*, висаджених у скляні посудини на агаризоване живильне середовище МС/2 у двох варіантах — без фітогормонів та з додаванням 0,1 мг/л НОК (див. рис. 1, б). При перенесенні цих рослин у ґрунт, швидше приживалися рослини, вирощені на середовищі, доповненому НОК. Рослини *I. pumila* можуть активно рости тривалий час на середовищі без пересадок. При культивуванні півників інколи немає необхідності в підборі живильного середовища для отримання повноцінних рослин, готових до адаптації в умовах відкритого ґрунту, оскільки у них формування коренів після розвитку наземної маси рослин є закономірним процесом [10].

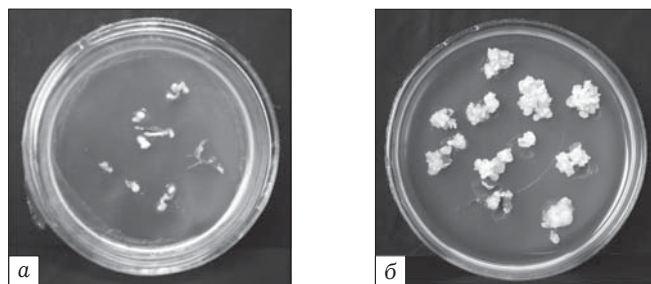


Рис. 3. Індукція калусоутворення (а) та проліферація калусу (б) *Iris pumila*

Отримані *in vitro* рослини *I. pumila* висотою 9–11 см були висаджені в ґрунт в умовах теплиці (див. рис. 1, в). Експерименти з адаптації рослин до умов закритого ґрунту виявили високий рівень приживання рослин. Тривалість адаптації рослин до сухості повітря, нестерильності субстрату становила в середньому 12–16 днів.

Отримання культури тканин. Відомо, що для регуляції процесів морфогенезу *in vitro* необхідним є використання регуляторів росту. За даними багатьох авторів [5, 16], найпоширенішим цитокініном, який використовують для культивування *in vitro* багатьох видів рослин, є БАП. Цей фітогормон також рекомендують для культивування *in vitro* насіння та зародків представників роду *Iris* [6].

Для індукції калусоутворення нами використано експланти кореневого походження *I. pumila*, які висаджували на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л БАП та 0,5 мг/л 2, 4-Д. Відсоток калусогенезу був високим — 84 %. Отриманий життєздатний та проліферативно активний калус мав жовте забарвлення, пухку консистенцію та був здатний до тривалого росту на зазначеному живильному середовищі (рис. 3).

У літературі є повідомлення про отримання культури тканин *I. pumila*. Так, калусну культуру цього виду одержали М.М. Козиренко зі співавт. та провели її цитогенетичний і молекулярно-генетичний аналіз [7]. Ембріогенний калус отримували з листків рослин *in vitro* [18]. Найвищим ВК був на середовищі МС, доповненому 1 мг/л 2, 4-Д та 1 мг/л кінетину (КІН). Розрізняли три типи ембріогенного калусу: перший — жовтий, компактний, другий — жовто-зелений, пухкий, третій — білий, пухкий. Субкультивування калусів проводили щомісяця. Отримано також суспензійну культуру цього виду на рідкому середовищі МС, доповненому 2, 4-Д та КІН [18]. Культуру тканин листового походження вдалося отримати на середовищі МС, доповненому 4,5 мг/л 2, 4-Д та 4,5 мг/л КІН [17].

Висновки

Таким чином, нами введено *Iris pumila* в культуру *in vitro*. Виявлено високу ефективність проростання насіння за умов його попередньої холодової стратифікації, а також висадки скарифікованого насіння на живильне середовище МС/2 без фітогормонів. Отримані асептичні проростки активно росли на середовищі МС/2 без фітогормонів. Проведені експерименти з адаптації рослин до умов закритого ґрунту виявили високий рівень приживання рослин. Отримано культуру тканин кореневого походження *I. pumila* на живильному середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л БАП та 0,5 мг/л 2, 4-Д.

Висловлюємо щирі вдячності с.н.с. Інституту молекулярної біології і генетики НАН України І.О. Андрееву та директору Миколаївського обласного еколого-натуралістичного центру учнівської молоді Т.Б. Троїцькій за зібраний та наданий матеріал для досліджень.

1. Байрак О.М., Шевель І.М., Грицай І.А. та ін. Ботанічний заказник «Драбинівка». — Полтава: Верстка, 2006. — 172 с.

2. Болденков Е.В. Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris* L. (Iridaceae) для использования в биотехнологии: Дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2002. — 229 с.

3. Верещагина И.В. Вегетативное размножение декоративных многолетников. — Барнаул: Алтайское кн. изд-во, 1977. — 112 с.

4. Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: Дис. ... канд. биол. наук. — М., 2010. — 170 с.

5. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: Дис. ... д-ра с.-х. наук. — М., 1998. — 310 с.

6. Ишмуратова М.М., Рахимова А.Ф. Использование культуры *in vitro* для размножения гибридов *Iris* L. // Раст. ресурсы. — 1999. — 35, Вып. 4. — С. 74–78.

7. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Болтенков Е.В. Анализ генетической изменчивости калусных культур некоторых видов рода *Iris* L. // Биотехнология. — 2002. — № 4. — С. 38–48.

8. Лакін Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.

9. Мамаева Н.А. Сравнительный анализ морфологических и биологических признаков сортов садовых бородатых ирисов (секция *Iris* рода *Iris* L.): Дис. ...канд. биол. наук. — М., 2008. — 152 с.

10. Маркова Е.М. Особенности размножения видов *Iris sibirica* L. и *Iris pseudacorus* L. в культуре *in vitro* // Материалы 2-го Моск. междунар. симпозиума по роду «*Iris* – 2011». — М.: МАКС Пресс, 2011. — С. 194–198.

11. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. — Л.: Наука, 1985. — 347 с.

12. Парнікоза І.Ю., Троїцька Т.Б., Троїцький М.О., Кунах В.А. Стан популяцій *Iris pumila* L. з різних регіонів Миколаївщини // Матеріали других наукових читань пам'яті Сергія Тарашука. — Миколаїв: Вид-во ЧДУ імені Петра Могили, 2011. — С. 112–115.

13. Полевой В.В. Фитогормоны. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 248 с.

14. Сикюра И.И., Шиша Е.Н. Genus *Iris* L. (Iridaceae) — род Касатик, Ирис (Касатиковые). — К.: Знання України, 2010. — 195 с.

15. Цвелев Н.Н. *Iris* L. // Флора европейской части СССР. — Л.: Наука, 1979. — Т. 4. — С. 299–307.

16. Шорников Д.Г., Янковская М.Б., Муратова С.А. Ускоренное размножение нетрадиционных садовых культур на искусственных питательных средах // Садоводство и виноградарство. — 2007. — № 5. — С. 12–14.

17. Jevremovic S., Radojevic L. Establishment of efficient regeneration protocol from leaf explant of *Iris pumila* shoots cultured *in vitro* // Scientia Hort. — 2006. — **108**, N 1. — P. 100–103.

18. Jevremovic S., Radojevic L. Plant regeneration from suspension cultures of *Iris pumila* L. // Acta Hort. — 2002. — **572**. — P. 59–65.

19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**, N 13. — P. 473–497.

Рекомендував до друку Р.В. Іванніков

М.О. Твардовська, В.А. Кунах

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України,
Україна, г. Київ

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ИРИСА НИЗКОГО (*IRIS PUMILA* L.)

Описаны условия эффективного прорастания семян *Iris pumila* L. Получены растения *in vitro* и культура тканей этого вида. Установлено, что экспланты корневого происхождения способны формировать каллус на среде Мурасиге–Скуга с половинным содержанием макро- и микросолей, дополненной 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,5 мг/л 2, 4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Подобраны условия для роста растений в закрытом грунте с целью реинтродукции в природную среду.

Ключевые слова: *Iris pumila* L., асептические проростки, культура тканей растений.

М.О. Twardovska, V.A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv

IN VITRO CULTURE INITIATION OF *IRIS PUMILA* L.

Conditions for efficient germination of *Iris pumila* L. seeds were described. Tissue culture and plants of this species were obtained *in vitro*. The explants of root origin were found to be able to produce callus on the Murashige and Skoog medium with half content of macro- and micronutrients supplemented with 0.1 mg/L 6-benzylaminopurine and 0.5 mg/L 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid. Conditions for growth of *I. pumila* plants in greenhouse with a view to their further reintroduction into natural environments were specified.

Key words: *Iris pumila* L., aseptic seedlings, plant tissue culture.