

При сравнении наших данных с литературными, полученными в середине прошлого века, было выявлено, что в структуре фитопланктона обследованных рек значительно возросло видовое богатство (р. Омь) и обилие фитопланктона (реки Тара, Уй, Шиш), во всех реках в структуре фитопланктона отмечено преобладание цианобактерий и мелкоклеточных хлорококковых водорослей [4, 5]. Видовое богатство фитопланктона всех обследованных притоков возросло за счет вхождения в его состав криптофитовых, динофитовых и желто-зеленых водорослей. В фитопланктоне р. Оми отмечено массовое развитие индикаторов антропогенного эвтрофирования (*S. hantzschii*, *M. pulvereae*), в других притоках – их постоянное присутствие. В составе фитопланктона р. Оми произошло увеличение числа  $\alpha$ - и  $\beta$ -мезосапробов и появились виды-индикаторы полисапробной зоны. В других реках возросло число видов-индикаторов  $\beta$ -мезосапробной зоны, появились  $\alpha$ -мезосапробы и полисапробы.

#### Выводы

Установленные изменения структуры, таксономического состава и обилия фитопланктона указывают на то, что в настоящее время правобережные притоки Иртыша подвержены эвтрофированию и загрязнению легко окисляющимися органическими веществами. Согласно концепции

экологических модификаций В.А. Абакумова экосистема р. Оми находится в состоянии экологического напряжения, что вызывает опасения в связи с высокой возможностью её сдвига в сторону негативных изменений [6].

#### Библиографический список

1. Федоров В.Д. О методах изучения фитопланктона и его активности / В.Д. Федоров. – М.: МГУ, 1979. – 168 с.
2. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. – Л.: Гидрометеиздат, 1983. – С. 44-46.
3. Шитиков В.К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В.К. Шитиков, Г.С. Розенберг, Т.Д. Зинченко. – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. – 463 с.
4. Бобкова Г.И. Альгофлора низовьев реки Оми и ее сезонные изменения / Г.И. Бобкова // Тр. Омского мед. ин-та. – Омск, 1963. – № 37. – С. 165-177.
5. Скабичевский А.П. Фитопланктон некоторых правых притоков Иртыша / А.П. Скабичевский // Тр. Омского мед. ин-та. – Омск, 1965. – № 61. – С. 14-24.
6. Абакумов В.А. Экологические модификации и развитие биоценозов / В.А. Абакумов // Экологические модификации и критерии экологического нормирования: тр. Междунар. симпозиума. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – С. 18-40.



УДК 575:635.92

Л.И. Тихомирова

### ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ИРИСА ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

**Ключевые слова:** культура *in vitro*, зародыш, ирис, микроклональное размножение, эмбриокультура, питательные среды, растения-регенеранты, регуляторы роста, гибриды, стерилизация.

#### Введение

Название «iris» дал Гиппократ, что в переводе с древнегреческого означает «радуга». Разнообразие и богатство окрасок

цветков этих растений по праву сравнивается с красивейшим явлением природы. Римляне дали одному из городов название Флоренция (цветущая) лишь потому, что окрестности его были усыпаны ирисами. Ирисы почитались в Аравии и Древнем Египте, где их разводили еще в XV-XIV вв. до н.э.; в Японии из ирисов и померанцев для мальчиков делали магические амулеты, охраняющие от болезней и вселяю-

щие отвагу. В культуре ирисы возделываются более двух тысячелетий; их ценят не только за красоту и аромат цветов, но также и за аромат корня (вытяжки из него используются в парфюмерной промышленности, при изготовлении винно-водочных и кондитерских изделий).

У традиционных приемов создания новых форм декоративных многолетников и производства посадочного материала есть существенный недостаток – низкая эффективность, несовместимая с потребностями современного рынка. Многолетники имеют продолжительный жизненный цикл, что усложняет и затягивает процесс селекции, а на создание гибридов с ценными признаками, стабильно передающимися по наследству, может понадобиться более десяти лет. Длительность прорастания и невысокая всхожесть семян, довольно долгий виргильный период развития растений затягивают срок получения селекционного посадочного материала. Поэтому для размножения многих культур успешно используют способ регенерации растений из изолированных зиготических зародышей. При этом зародыш изолируют из семени или семязачатка, помещают в искусственные условия, замещающие эндосперм. Применение такого способа позволяет быстро получить массовое количество селекционного материала и значительно сократить срок оценки гибридизации [1, 2]. Наиболее изучен в данном аспекте *I. ensata* Thunb. В Японии ирис мечевидный культивируется более 500 лет. Это одна из популярных и любимых культур в стране. По данным Японского Общества Iris, впервые в Японии из незрелых зародышей отдаленных гибридов *I. ensata* успешно регенерированы растения в результате индукции соматического эмбриогенеза в каллусной культуре [3-5]. Разработан способ размножения *in vitro* гибридов *I. hybrida hort.*, который позволяет получить через несколько месяцев после гибридизации из одного семени до 6-8 генетически однородных растений и значительно сократить сроки получения селекционного материала [6].

Цель работы – разработать метод эмбриокультуры *in vitro* для 3 видов ириса (*I. hybrida*, *I. ensata*, *I. sibirica* L.) с целью ускорения селекционного процесса.

#### Объекты, методы и условия исследований

Объектами исследования являлись зародыши семян гибридных форм ириса:

для *I. sibirica* гибрид 36-38-01 х св. опыление, для *I. hybrida* гибрид Лилэс Лайн х св. опыление, для *I. ensata* гибрид 21 х св. опыление из коллекции НИИСС им. Лисавенко.

Из стерилизующих средств использовали растворы этилового спирта 96 и 0,1%, сульфохлорантина.

Питательные среды готовили по прописи Мурасиге и Скуга, с добавлением 30 г/л сахарозы. Из регуляторов роста на этапе введения ирисов в культуру изучено действие 3-5 мкМ нафтилуксусной кислоты (НУК), 0,5-1 мкМ индолилмасляной кислоты (ИМК), 1-20 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП), 100 мг/л L-глутамин и 100 мг/л аденинсульфата. Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятым методикам [7].

Растения выращивали в лабораторных условиях при искусственном освещении (2000-4000 лк) в условиях фотопериода: 16/8 ч свет/темнота и температуре 24-26°C.

В опыте использовано по 20 зародышей для каждого вида в три срока введения в культуру; всего в трех повторностях – 90 растений-регенерантов.

Учетными элементами явились: число побегов на эксплант, средняя длина побега, число корней в первых четырех пассажах. Продолжительность пассажа на одной среде составляла 25-30 суток.

#### Результаты и их обсуждение

Стерилизацию материала проводили в условиях ламинар-бокса в два этапа. На первом этапе бутоны, смоченные в 96%-ном этиловом спирте, обжигали в пламени спиртовки. Следующий этап обеззараживания проводили в 0,1%-ном растворе сульфохлорантина в течение 20 минут. Подобный способ обеспечивал на 90% стерильность материала и 100% жизнеспособность.

Для успешного введения в культуру зародышей трёх видов ириса определён оптимальный возраст эксплантов, отработана техника вычленения зародышей из семян. Для ириса характерно замедленное развитие и дифференциация зародыша [8]. Даже на 30-е сутки после опыления зародыши ириса плохо просматривались. В связи с этим попытки вычленения их из семени не дали положительных результатов. Выявлено, что оптимальным сроком изоляции зародышей является с 50-х по 80-е сутки после опыления, когда у ос-

новой массы семян их размер достигал 2-3 мм. После 80 суток развития эндосперм становится очень плотным, что также затрудняет вычленение зародыша.

Согласно классификации рода Ирис, предложенной Г.И. Родионенко, виды *I. ensata* и *I. sibirica* относятся к подроду Лимнирис, а *I. hybrida* – к подроду Ирис. Между ними нет близкого родства. Это подтверждается их нескрещиваемостью [8]. Учитывая это, для каждого вида ириса были использованы различные по содержанию фитогормонов питательные среды.

**Введение в культуру *in vitro* зародышей *I. sibirica*.** Зародыши размером 2-3 мм от свободного опыления гибрида 36-38-01 в возрасте 50-60 дней. Размеры плода и семени в этот период составляли 35x20 и 7x 4 мм соответственно. После поверхностной стерилизации плодов зародыши вычленяли из семени и помещали на поверхность искусственной питательной среды MS с различным сочетанием гормональных и не гормональных стимуляторов роста. Всего пять вариантов сред. Лучшей питательной средой для введения зародышей явился вариант пять (табл. 1).

Полученные регенеранты субкультивировали на среде с 5 мкМ БАП в течение двух пассажей, а далее чередовали среды, содержащие 5 и 1 мкМ БАП, до получения необходимого количества растен-ий-регенерантов. После чего регенеранты переносили на среду, не содержащую гормональные добавки для укоренения. Таким способом за 4 месяца культивирования от одного зародыша можно получить 35 растений-регенерантов с длиной листьев 37-45 мм, пригодных для дальнейшего укоренения и адаптации к нестерильным условиям.

**Введение в культуру *in vitro* зародышей ириса *I. hybrida*.** Зародыши ириса *I. hybrida* изолировали в возрасте 60-80 сут. Размеры плода и семени в этот период составляли 45 x 18 и 9 x 8 мм соответственно. Было испытано четыре варианта питательных сред. Полученные регенеранты субкультивировали на средах с 1 мкМ БАП, а далее – чередуя среды, содержащие 2,5 и 1 мкМ БАП до получения необходимого количества растений-регенерантов. Лучшими питательными средами для введения зародышей явились варианты один и четыре (табл. 2).

Таблица 1

Влияние питательной среды на развитие зародышей *I. sibirica* гибрида 36-38-01 х св. опыление в культуре *in vitro*

мкМ	0-й пассаж			1-й пассаж 5 мкМ БАП			2-й пассаж 5 мкМ БАП			3-й пассаж 1 мкМ БАП		
	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.
1. 1 БАП + 1 ИМК	1	5	1	1	10	0	1	20	0	3	15	0
2. 2,5 БАП	1	7	0	1	11	0	4	18	0	10	13	0
3. 2,5БАП + 0,5 ИМК	1	25	0	1	60	0	1	80	0	3	40	0
4. 5 БАП + 0,5 ИМК	1	8	1	1	15	0	2	20	0	7	20	0
5. 6 БАП +5 НУК + I-г + а.с. 100 мг/л	1+ Ад.п.	12	1	5	15	0	10	20	0	35	37	0

Примечание. Ч.п. – число побегов на один эксплант; д.р. – средняя длина растения; ч.к. – среднее число корней; I-г – L-глутамин; а.с. – аденинсульфат; Ад.п. – адвентивные побеги.

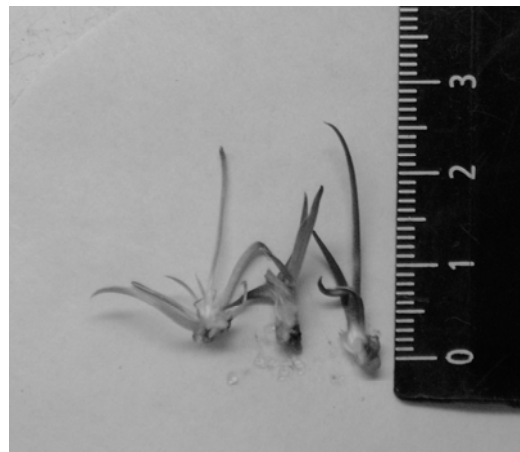


Рис. 1. Регенерация побегов из ткани зародыша *I. sibirica* гибрида 36-38-01 х св. опыление в культуре *in vitro* па питательной среде с 6 БАП + 5 НУК + I-г + а.с. 100 мг/л



Рис. 2. Регенерация побегов из ткани зародыша *I. hybrida* гибрида Лил эс Лайн х св. опыление в культуре *in vitro* на питательной среде с 6 БАП + 5 НУК + I-г + а.с. 100 мг/л

Размноженные регенеранты переносили на среду, не содержащую гормональные добавки для укоренения. Таким образом, за 4 месяца культивирования от одного зародыша можно получить 37 растений-регенерантов с длиной листьев 50 мм, пригодных для дальнейшего укоренения и адаптации к нестерильным условиям.

**Введение в культуру *in vitro* зародышей ириса *I. ensata*.** Зародыши ириса *I. ensata* изолировали в возрасте 50 суток. Размеры плода и семени в этот период составляли 30 x 20 и 8 x 4мм соответственно. В этот период развития эндосперм мягкий, иногда гелеобразный, зародыш хорошо оформлен, легко вычленяется. Было испытано четыре варианта питательных сред. На всех средах жизнеспособность зародышей была достаточно высокой и составляла 50-100%. Полученные регенеранты субкультивировали на средах с 20 мкМ БАП и 1 ИМК, а далее снижали содержание БАП до 1 мкМ в течение следующих двух пассажей до получения необходимого количества растений-регенерантов. Лучшими питательными средами для введения зародышей явились варианты 2, 3 и 4 (табл. 3).

Размноженные регенеранты переносили на среду, не содержащую гормональные добавки для укоренения. Таким образом, за 4 месяца культивирования от одного зародыша можно получить 13 растений-регенерантов с длиной листьев 43 мм, пригодных для дальнейшего укоренения и адаптации к нестерильным условиям.

Таблица 2

Влияние питательной среды на развитие зародышей *I. hybrida* гибрида Лилэс Лайн х св. опыление в культуре *in vitro*

мкМ	0-й пассаж			1-й пассаж 1 мкМ БАП			2-й пассаж 2,5 мкМ БАП			3-й пассаж 1 мкМ БАП		
	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.
1. 1 БАП	1	10	0	5	14	0	11	31	3	24	25	0
2. 1 БАП + 1 ИМК	1	10	1	1	45	0	1	60	0	1	112	0
3. 5 БАП + 0,5 ИМК	1	40	0	1	80	0	1	80	0	2	40	0
4. 6 БАП +5 НУК + I-г + а.с. 100 мг/л	1 + Ад.п.	5	0	9	1	0	16	20	0	37	50	0

Примечание. Ч.п. – число побегов на один эксплант; д.р. – средняя длина растения; ч.к. – среднее число корней; I-г – L-глутамин; а.с. – аденинсульфат; Ад.п. – адвентивные побеги.

Таблица 3

Влияние питательной среды на развитие зародышей *I. ensata* гибрида 21 х св. опыление в культуре *in vitro*

мкМ	0-й пассаж			1-й пассаж 20 мкМ БАП + 1 ИМК			2-й пассаж 5 мкМ БАП			3-й пассаж 1 мкМ БАП		
	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.	ч.п.	д.р., мм	ч.к.
1. 1 БАП + 1 ИМК	1	20	1	1	35	1	1	80	0	1	115	0
2. 5 БАП	1	10	1	2	15	0	6	9	0	11	40	0
3. 6 БАП + 5 НУК + I-г + а.с. 100 мг/л	1	19	1	1	25	0	10	12	0	13	43	0
4. 20 БАП + 1 ИМК	1	15	1	1	10	0	6	11	0	8	45	0

Примечание. Ч.п. – число побегов на один эксплант; д.р. – средняя длина растения; ч.к. – среднее число корней; I-г – L-глутамин; а.с. – аденинсульфат.

Довольно часто при переносе зародыша на искусственную питательную среду из одного зародыша развивается только одно растение. Однако на определённых питательных средах у зародыша можно индуцировать образование пазушных меристем прямым путём, это увеличивает коэффициент размножения в несколько раз и ускоряет сам процесс размножения гибридного растения. Главную роль в этом процессе играют компоненты питательной среды на этапе введения в культуру. Влияние этих компонентов прослеживается до 4 месяцев культивирования зародышей. На всех испытанных питательных средах регенеранты зародышей трёх видов 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, из зародышей *I. hybrida*, *I. sibirica* наряду с основным формировались адвентивные побеги в нулевом пассаже. У *I. ensata* на этой среде в нулевом пассаже развивался один побег, но в последующих наблюдалась тенденция к размножению с наибольшим коэффициентом.

#### Выводы

1. Определён срок введения в культуру *in vitro* для зародышей ириса *I. hybrida*, *I. ensata*, *I. sibirica* – 50–80 суток.

2. Отработан способ стерилизации растительного материала, который обеспечивал на 90% стерильность зародышей и 100% их жизнеспособность.

3. На всех испытанных питательных средах регенеранты зародышей трёх видов ириса имели хорошо развитые листья, а иногда и корни. На среде с 6 мкМ БАП + 5 мкМ МНУК, дополненной L-глутамином и аденинсульфатом в количестве 100 мг/л, из зародышей *I. hybrida*, *I. sibirica* формировались адвентивные побеги, у

*I. ensata* в последующих пассажах увеличивался коэффициент размножения.

#### Библиографический список

1. Ишмуратова М.М. Использование культуры *in vitro* для размножения гибридов *Iris L.* / М.М. Ишмуратова, Ф.Ф. Рахимова // Растительные ресурсы. – 1999. – Вып 4. – С. 74-78.

2. Бибикина А.В. Растения как объект биотехнологии / А.В. Бибикина, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлёв // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. IV. – С. 184-211.

3. Kawase K. Shoot formation on floral organs of Japanese iris *in vitro* / K. Kawase, H. Mizutani, M. Yoshioka, S. Fukuda // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 64. – 1995. – P. 143-8.

4. Yabuva T. Embryo Growth and Cultural and Conditions in *Iris-Ensata* / T. Yabuva, H. Yamagata // Japanese Journal of Breeding 31. – 1981. – P. 377-82.

5. Yabuva T. Amphidiploids between *Iris-Laevigata* and *Iris-Ensata* Induced through *in-Vitro* Culture of Embryos treated with Colchicine / T. Yabuva // Japanese Journal of Breeding 35. – 1985. – P. 136-44.

6. Ветчинкина Е.М. Некоторые аспекты использования культуры семян и зародышей *in vitro* для изучения и сохранения биоразнообразия рода *Iris L.* / Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева // Биоразнообразие природных и антропогенных экосистем: сб. ст. 3-го Молодежного научного семинара (г. Екатеринбург, 25-28 окт. 2004 г.). – Екатеринбург, 2005. – С. 21-25.

7. Калинин Ф.А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.А. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев, 1980. – 488 с.

8. Родионенко Г.И. Ирис / Г.И. Родионенко. – М.: Минкомхоз РСФСР, 1961. – 60 с.

