

УДК 58.085:502.75

Е. Е. ХОМАНН, В. В. ЗАЯКИН, В. В. МУ-ЗА-ЧИН, Ю. А. СЕМЕНИЩЕНКОВ, И. Я. НАМ

**СОХРАНЕНИЕ РЕДКОГО В БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ ВИДА
IRIS APHYLLA L. (IRIDACEAE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Брянский государственный университет имени академика И. Г. Петровского, Брянск, Россия,
e-mail: wild.biologist@mail.ru, iyanam1@yandex.ru, viktoriamu-za-chin@yandex.ru, yuricek@yandex.ru

В 2010–2015 гг. проведен мониторинг состояния ценопопуляций *Iris aphylla* L. (Iridaceae), найденных в Брянской области, и произведена оценка их численности. Для генеративных особей отмечены основные показатели продуктивности.

Получены пробирочные растения *I. aphylla*, хорошо размножающиеся в культуре *in vitro*. Эксплантаты корневища культивировали на среде MS с содержанием 6-БАП (0,5 мг/л). Изучено влияние тидиазулона на коэффициент размножения пробирочных растений.

Ключевые слова: *Iris aphylla*, продуктивность, ценопопуляция, *in vitro*.

E. E. KHOMANN, V. V. ZAYAKIN, V. V. MU-ZA-CHIN, YU. A. SEMENISHCHENKOV, I. Y. NAM

**CONSERVATION OF THE PLANT *IRIS APHYLLA* L. (IRIDACEAE) ENDANGERED
IN THE BRYANSK REGION IN THE *IN VITRO* CULTURE**

Bryansk State University named after Academician I. G. Petrovski, Bryansk, Russia,
e-mail: wild.biologist@mail.ru, iyanam1@yandex.ru, viktoriamu-za-chin@yandex.ru, yuricek@yandex.ru

The search and monitoring of cenopopulation *Iris aphylla* L. (Iridaceae) in the Bryansk region were carried out in 2010–2015. The assessment of the number of the cenopopulations was done. The basic indicators of productivity for generative individuals were marked.

Test tube plants of *Iris aphylla*, well propagated in culture *in vitro* were obtained. Explants of rhizome and seeds were cultivated on the MS medium with the concentration of BAP 0,05 mg/l. The way thidiazuron affects the multiplication ratio was studied.

Keywords: *Iris aphylla*, productivity, coenopopulations, *in vitro*.

Введение. Важнейшим условием охраны редких и исчезающих видов растений на популяционно-видовом уровне является оценка состояния их природных популяций, позволяющая наблюдать за их динамикой. У некоторых растений размножение семенным путем в природных условиях, особенно при интенсивной антропогенной трансформации местообитаний, затруднено. Для таких видов эффективным способом сохранения является культивирование в культуре *in vitro*, ставшее доступным и возможным в последние десятилетия [1–4].

Iris aphylla L. (Iridaceae) – европейско-средиземноморский вид, приуроченный преимущественно к степной и лесостепной зонам Средней и Восточной Европы, европейской части России; занесен в Красную книгу Российской Федерации [5]. В Брянской области вид представлен у северной границы ареала и отмечен в 10 районах [6].

I. aphylla – короткорневищный криптофит (геофит), обитающий в условиях от сухостепного до влажно-лесолугового типа увлажнений и предпочитающий слабокислые и слабощелочные почвы с небольшим содержанием минерального азота. В Брянской области ценопопуляции этого вида представлены преимущественно в сообществах ксеромезофитных широколиственных лесов [7, 8]. Сокращение численности ириса происходит из-за проведения сельскохозяйственных работ, добычи мела на склонах балок и речных долин, а также из-за чрезмерного выпаса и прогона скота [6].

Практически во всех известных ценопопуляциях в изучаемом регионе наблюдаются снижение потенциальной и реальной семенной продуктивности вида, а также слабая всхожесть семян как в естественных условиях, так и в лабораторных. В условиях склоновых местностей ирис активно размножается вегетативным путем (корневищем), однако это не способствует сохранению генетического разнообразия и омоложению ценопопуляций [9, 10], поэтому весьма актуальным становится разработка методики размножения растений *in vitro* с последующей возможной реинтродукцией в неполночленные, нуждающиеся в молодых особях популяции.

Ряд представителей рода *Iris* успешно культивируется и размножается *in vitro* [11–14]. Отмечаются и неудачные попытки введения вида в культуру [15].

Цель нашей работы – подбор условий для адаптации в культуре *in vitro* указанного вида и получение устойчиво размножающихся линий для его сохранения.

Объекты и методы исследования. В 2010–2015 гг. проведен мониторинг состояния ценопопуляций *I. aphylla*, найденных в Брянской области, и произведена оценка их численности. Для генеративных особей отмечены основные показатели продуктивности: число генеративных побегов, число бутонов, цветков и коробочек на один побег, число семян в коробочке.

В природной ценопопуляции отобран материал для введения *I. aphylla* в культуру. Эксплантами послужили апикальные и боковые почки корневищ и зрелые семена, собранные после периода диссеминации и естественной стратификации 24.04.2010 г.

Стерилизацию материала проводили с помощью спирта и 0,1 % сулемы с последующей тщательной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Экспланты помещали на среду MS [16].

Результаты и их обсуждение. *Результаты обследования ценопопуляций I. aphylla.* Исследования проведены в трех ценопопуляциях *I. aphylla* на территории Брянской области в течение 2010–2015 гг. Все ценопопуляции являлись нормальными полночленными. Их краткое описание приведено в таблице.

Реальная семенная продуктивность *Iris aphylla* на территории Брянской области

Показатель	Ценопопуляция 1			Ценопопуляция 2			Ценопопуляция 3		
	2011	2013	2015	2011	2013	2015	2011	2013	2015
Число генеративных побегов на мониторинговых площадках	126	111	84	71	32	0	159	60	6
Среднее число цветков на побег ($M \pm m$)	$3,5 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	0	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$
Среднее число коробочек на побег ($M \pm m$)	$3,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,16$	$2,5 \pm 0,17$	$2,4 \pm 0,22$	$1,6 \pm 0,27$	0	$2,2 \pm 0,33$	$1,4 \pm 0,16$	0
Среднее число зрелых семян в коробочке ($M \pm m$)	$28,6 \pm 3,64$	$29,2 \pm 3,24$	$26,4 \pm 4,14$	$27,5 \pm 3,5$	$19,9 \pm 0,6$	0	$15,5 \pm 2,9$	$13,0 \pm 1,7$	0

Ценопопуляция 1. Занимает коренной склон долины р. Десна восточной экспозиции у с. Переторги (Выгоничский р-н). На склоне на опушке ксеромезофитного березняка сформировалось сообщество остепненного луга с преобладанием термофильных лугово-опушечных видов. В отдельные годы зафиксированы пожары, вызванные палами травы, после которых отмечалось локальное разрастание *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. Число генеративных особей ириса от общего числа особей составило 17,70 % (2013 г.).

Ценопопуляция 2. Отмечена на опушке ксеромезофитного березняка с дубом на территории памятника природы «Зеленинский лес» (Севский р-н). Число генеративных особей составило 7,85 % (2013 г.).

Ценопопуляция 3. Занимает склон балки южной экспозиции у с. Дроново (Карачевский р-н). Здесь сформировалось сообщество остепненного луга с участием термофильных луговых и лугово-опушечных видов растений в соседстве с ксеромезофитной дубравой. Число генеративных особей ириса составило 5,62 % (2013 г.).

В период с 2010 по 2015 г. наблюдалось ежегодное сокращение числа цветущих и плодоносящих особей в ценопопуляциях 2 и 3 и относительное постоянство в первой ценопопуляции

(см. таблицу). Это может быть объяснено ослаблением растений вследствие нетипично продолжительного жаркого и засушливого сезона в 2010 г., ежегодными палами травы в местах произрастания ириса, повреждением незрелых коробочек и семян фитофагами из рода *Ceutorhynchus*, бутон и цветков – представителями рода *Cetonia*, а также ослаблением растений гетероспориозом (*Heterosporium gracile* Sacc.). При сильном развитии гетероспориоза листья засыхают на 15–20 дней раньше конца вегетационного периода, наблюдаются поверхностные повреждения коробочек и, вероятно, инфицируются семена. Заболевание не распространяется на корневище, однако сказывается на накоплении биомассы и репродуктивном усилии вида.

Культивирование и размножение *I. aphylla* in vitro. Отбор материала для культивирования произведен в апреле 2010 г. в ценопопуляции 1.

При использовании в качестве эксплантов фрагментов корневищ ириса безлистного в присутствии цитокинина (БАП 0,5 мг/л) наблюдалось пробуждение спящих почек, из которых сформировались пробирочные растения. В культуру *in vitro* было помещено 28 эксплантов, часть из которых имела внутритканевую инфекцию, а некоторые погибли при культивировании даже без признаков инфекции. Пробуждение выживших почек и адаптация их к условиям культивирования происходили медленно. Через год из оставшихся эксплантов было получено 12 пробирочных растений, которые были использованы для размножения и дальнейших исследований. К этому времени наблюдались первые признаки появления аддитивных побегов.

При использовании для введения в культуру *in vitro* семян часть их оказалась инфицированной, остальные проявили высокую гетерогенность. Скорость прорастания семян была низкой: за первый месяц проросло только два семени, в целом прорастание растянулось примерно на полгода.

Для прорастания семян использовали два варианта среды – безгормональную и содержащую 0,5 мг/л БАП. Цитокинин заметно не влиял на скорость прорастания, не вызывал образования дополнительных побегов или эмбриоидов, но подавлял рост зародышевого корешка.

Влияние тидиазулона на коэффициент размножения *Iris aphylla*. При размножении ириса безлистного на среде MS с БАП 0,5 и 1 мг/л наблюдалось эпизодическое появление дополнительных побегов в некоторых пробирках, размножения почти не происходило, хотя исходные экспланты продолжали нормально расти, занимая по высоте всю биологическую пробирку. На поздних этапах самопроизвольно, без специальной гормональной стимуляции образовывались корни.

Для ускорения размножения была предпринята попытка использовать цитокинин структурного ряда дифенилмочевин – тидиазурон (TDZ). Побеги пробирочных растений, полученных из корневищ, помещали на питательные среды с различными концентрациями TDZ: 0,2; 0,1 и 0,05 мг/л. Максимальное количество и высота побегов (с листьями) были получены на среде с 0,05 мг/л TDZ (рис. 1, 2). Растения на средах с 0,1 и 0,2 мг/л TDZ значительно отставали по количеству побегов.

Замечено, что наименьшие концентрации TDZ сильнее всего стимулируют побегообразование, однако показатели коэффициента размножения остаются невысокими, примерно 2, 4. При максимальных концентрациях TDZ в некоторых пробирках появляются признаки витрификации тканей.

Для стимуляции размножения полученные из семян проростки также помещали на среды с TDZ. Корни при этом удаляли примерно на уровне корневой шейки. Часть проростков погибла, но в двух пробирках сформировался морфогенный каллус, в котором самопроизвольно образовались конгломераты почек. При их пересадке на безгормональную среду формировались нормальные побеги, которые затем самопроизвольно укоренялись.

На средах с низкими концентрациями TDZ эти побеги размножались при больших коэффициентах (около 4–5), чем у растений, полученных из корневищных эксплантов.

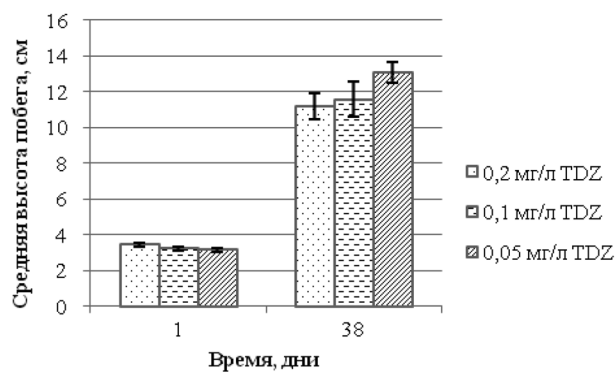


Рис. 1. Влияние различных концентраций TDZ на длину побегов до кончиков листьев (1-й и 38-й дни)

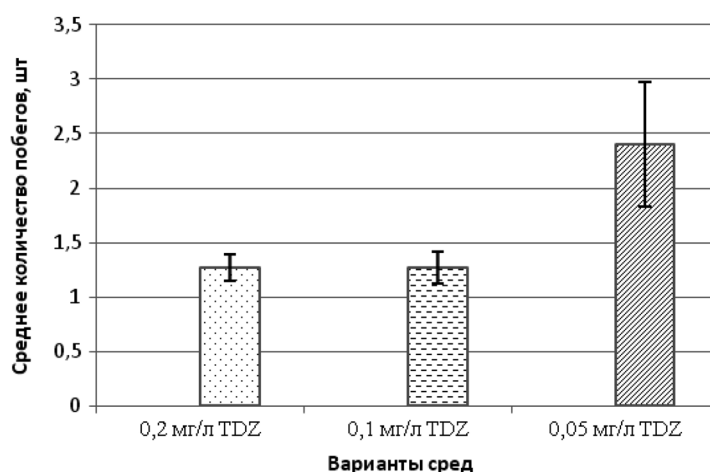


Рис. 2. Влияние различных концентраций TDZ на побегообразование (через 38 дней)

При размножении фрагментами эмбрионного каллуса коэффициент размножения не учитывался, но из одной пробирки в итоге можно получить более сотни растений.

Таким образом, предпринятая нами попытка введения *I. aphylla* в культуру *in vitro* оказалась более успешной, чем результаты, полученные румынскими исследователями [16]. В этой публикации, посвященной культивированию *I. aphylla* в условиях *in vitro*, не было получено стабильно размножающихся линий пробирочных растений. Авторы отмечали постепенную гибель первичных эксплантов.

Следует отметить, что пробирочные растения ириса безлистного обладают четко выраженным периодом покоя в условиях *in vitro*, несмотря на относительное постоянство условий в лаборатории. В осенне-зимний период наблюдается пожелтение и полное отмирание листьев, но точки роста и корни остаются полностью жизнеспособными. Длительное выдерживание на среде без пересадки также способствует переходу в состояние покоя. Последующий перенос на свежую среду стимулирует постепенный выход из покоя. Ускорить этот процесс и сделать его более синхронным можно путем выдерживания растений в течение 2–3 недель в холодильнике. Эти особенности приходится учитывать при проведении исследований.

Заключение. Таким образом, проведено успешное введение в культуру *in vitro* ириса безлистного как с помощью эксплантов корневищ, так и с помощью проростков, полученных из семенного материала. В последнем случае с помощью тидиазулона удалось получить эмбрионные ткани и линии пробирочных растений ириса безлистного, хорошо размножающиеся в культуре *in vitro*. К настоящему времени они поддерживаются в пробирочной культуре уже более 4 лет. Полученные материалы могут быть использованы для последующих экспериментов по внедрению молодых особей ириса в ценопопуляции, утратившие способность к самоподдержанию семенным путем, а также для выращивания этого вида в качестве декоративного растения.

Список использованной литературы

1. Костюкова, Е. Е. Молекулярно-генетический анализ редких видов орхидных Брянской области / Е. Е. Костюкова, В. В. Заякин, И. Я. Нам // Бюллетень Брянского отделения русского ботанического общества. – 2013. – № 1 (1). – С. 51–55.
2. Набиева, А. Ю. Особенности размножения редких сибирских видов рода *Iris* L. – *I. glaucescens* Bunge и *I. bloudowii* Ledeb. в условиях культуры / А. Ю. Набиева, Т. В. Елисафенко // Turczaninowia. – 2012. – Т. 15, №1. – С. 80–84.
3. Новикова, Т. И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада / Т. И. Новикова, А. Ю. Набиева, Т. В. Полубоярова // Вестн. ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564–572.
4. Набиева, А. Ю. Сохранение и размножение в культуре *in vitro* генотипов редких видов лилий азиатской части России: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / А. Ю. Набиева. – Новосибирск, 2008. – 162 л.
5. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / редкол.: Ю. П. Трутнев [и др.]; сост.: Р. В. Камелин [и др.]. – М.: КМК, 2008. – 855 с.

6. Красная книга Брянской области. Растения. Грибы / редкол.: Ю. П. Федотов (отв. ред); сост.: О. И. Евстигнеев [и др.]. – Брянск: Изд-во «Читай-город», 2004. – 272 с.
7. Семенищенков, Ю. А. Мониторинг редких видов растений в сообществах мезоксеротермных дубрав предполесских ландшафтов в Брянской области / Ю. А. Семенищенков, В. В. Му-За-Чин // Флора и растительность Центрального Черноземья – 2010: материалы науч. конф., Курск, 25 марта 2010 г. / Курск. гос. ун-т; редкол.: А. В. Полуянов (отв. ред.) [и др.]. – Курск, 2010. – С. 120–122.
8. Семенищенков, Ю. А. Сообщества ксеромезофитных широколиственных лесов у границы Брянской и Орловской областей и их природоохранное значение / Ю. А. Семенищенков, Д. А. Кобозев, В. В. Му-За-Чин // Ежегодник НИИ фунда. и прикл. исслед. за 2014 г. – 2015. – С. 54–60.
9. Му-За-Чин, В. В. Мониторинг состояния ценопопуляции *Iris aphylla* L. (*Iridaceae*) в Брянской области / В. В. Му-За-Чин // Актуальность идей В. Н. Хитрово в исследовании биоразнообразия России: материалы всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 135-летию со дня рожд. проф. В. Н. Хитрово, Орел, 18–20 сентября 2014 г. / Орловск. гос. ун-т; редкол.: Т. И. Пузина (гл. ред.) [и др.]. – Орел, 2014. – С. 110–113.
10. Му-За-Чин, В. В. Мониторинг ценопопуляций редких и нуждающихся в охране видов семейств *Liliaceae* Juss. и *Iridaceae* Juss. в Брянской области / В. В. Му-За-Чин, Ю. А. Семенищенков // Изучение и охрана биологического разнообразия Брянской области: материалы по ведению Красной книги Брянской области / редкол.: В. В. Ишуткин, А. Д. Булохов, Н. Н. Панасенко. – Брянск, 2010. – Вып. 5. – С. 95–107.
11. Plant regeneration of southern adriatic iris by somatic embryogenesis / S. Jevremović [et al.] // Arch. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 61 (3). – P. 413–418.
12. *In vitro* regeneration of the croatian endemic species *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić / S. Kereša [et al.] // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 2009. – Vol. 51 (2). – P. 7–12.
13. Callus induction and plant regeneration of *Iris dichotoma* Pall. in endangered species / K. Bae [et al.] // J. Plant Biotechnol. – 2012. – Vol. 39. – P. 182–188.
14. Al-Gabbiesh, A. *In vitro* propagation of endangered *Iris* species / A. Al-Gabbiesh, D. S. Hassawi, F. U. Afifi // J. of Biol. Sci. – 2006. – Vol. 6 (6). – P. 1035–1040.
15. Marinescu, M. V. Preliminary results on the *in vitro* propagation by leaf explants and axillary buds of *Iris aphylla* L. / M. V. Marinescu, A. Teodorescu, N. A. Şuţan // J. of Horticulture, Forestry and Biotechnol. – 2013. – Vol. 17 (1). – P. 279–282.
16. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Поступила в редакцию 21.12.2015