

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 **Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Разработка биотехнологических приемов сохранения и размножения ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) сем. *Iridaceae*

Вайновская И.Ф., Фоменко Т.И.

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь, e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Резюме. Разработан метод культивирования *in vitro* *Iris sibirica* L. с получением стерильного материала и сохранением максимальной всхожести. Размножение ириса сибирского в культуре *in vitro* позволяет в короткие сроки получить стерильный и оздоровленный посадочный материал. Разработаны методы ускоренного микроклонального размножения *Iris sibirica* L. с подбором субстратов для повышения адаптивности показателей растений при переводе в условия *ex vitro*.

Summary. The method of cultivating *in vitro* *Iris sibirica* L. aimed at getting sterile material and preserving maximal germinating power was elaborated. Reproduction *Iris sibirica* L. *in vitro* culture allows in shortest possible period of time to get sterile and healthy planting material. The methods of stimulating microclonal reproduction of *Iris sibirica* L. selecting substrata to raise the plants' adaptability indices when transferred of *ex vitro* conditions has been suggested.

Сохранение биоразнообразия растений является одной из актуальнейших задач ботанических садов. В последние годы для сохранения биоразнообразия растений успешно используются методы культуры ткани. Использование методов размножения *in vitro* представляет собой важную дополнительную возможность для сохранения редких и ценных видов в ботанических садах [1,2]. В Центральном ботаническом саду НАН РБ в лаборатории клеточной биотехнологии создана коллекция декоративных, хозяйственно-ценных и редких растений, сохраняемых в виде меристемных культур. Длительное сохранение *in vitro* не только способствует депонированию ценных генотипов, но и является основой для изучения процессов морфогенеза и регенерации в культуре ткани и исследований процессов адаптации микроклонов к условиям *ex vitro*.

Ирисовые – довольно большое семейство, в состав которого входят около 1800 видов, принадлежащих к 75–80 родам. Хозяйственное значение ирисовых прежде всего заключается в их высокой декоративности. Ирисы, гладиолусы и крокусы культивируют сейчас почти во всех внетропических странах.

Ирис сибирский (*Iris sibirica* L.), семейства ирисовых, или касатиковых (*Iridaceae*), в природе распространен в Европе и Азии. Этот вид занесен в Красную книгу Республики Беларусь как касатик сибирский [3]. Ирис сибирский встречается в РБ на территориях национальных парков, а также интродуцирован в Центральном ботаническом саду, выращивается на садовых и приусадебных участках. На основе дикой формы получены декоративные сорта белого, голубого и фиолетово-красного цветов. Для сохранения данного генотипа рекомендуется более широкое введение его в культуру в качестве декоративного растения. Одним из подходов сохранения ценных, редких и исчезающих генотипов растений является разработка биотехнологических методов их культивирования. В связи с этим в мировой практике при производстве посадочного материала находит широкое применение метод микроклонального размножения [4].

Целью наших исследований являлось изучение особенностей регенерационных процессов в культуре ткани ириса сибирского и разработка методов микроклонального размножения с последующей адаптацией полученных растений к условиям открытого грунта.

Процесс микроклонального размножения растений состоит из 4 этапов: эксплантация исходной ткани; собственно микроразмножение; укоренение размноженных побегов; адаптация растений к факторам внешней среды.

Введение в культуру *in vitro* проводили, используя семена из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Для стерилизации исходных эксплантов использовали несколько комбинаций стерилизующих соединений с различной концентрацией и временем экспозиции (табл. 1): I – 70%-й этанол (1 мин.) + 3 %-й раствор H_2O_2 (15 мин.); II – 70%-й этанол (1 мин.) + 0,1%-й раствор диацета (5 мин.); III – 70%-й этанол (1 мин.) + 0,1%-й раствор $AgNO_3$ (12 мин.).

Применяемые нами комбинации по-разному влияли на жизнеспособность семян и последующее развитие проростков. Стерилизация семян по схеме I снижала их жизнеспособность по сравнению с комбинациями II и III. Максимального числа жизнеспособных и минимального числа инфицированных семян удалось достичь при последовательном выдерживании семян в 70% этаноле (1 мин.) и 0,1% растворе нитрата серебра (10–12 мин.) Использование

Таблица 1. Влияние стерилизующих соединений на жизнеспособность семян и развитие проростков *in vitro* ириса сибирского

	Стерилизующие агенты (время экспозиции, мин.)	Жизне способность, %	Инфицирован- ность, %	Средняя длина побега, мм	
				через 30 дней	через 60 дней
I	70% этанол (1 мин.) + 3% H ₂ O ₂ (15 мин.)	13,3	58,7	20,6±1,2	21,7±1,0
II	70% этанол (1 мин.) + 0,1% диацид (5 мин.)	33,0	48,0	15,5±0,8	29,4±1,1
III	70% этанол (1 мин.) + 0,1% AgNO ₃ (12 мин.)	88,1	6,0	33,1±1,4	41,1±1,9

AgNO₃ сохраняло высокую жизнеспособность семян и приводило к быстрому развитию побегов. По результатам этих исследований оптимальным стерилизующим агентом признан 0,1%-й раствор AgNO₃.

Для проращивания семян использовали агаровую безгормональную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС (рис. 1).

Для увеличения числа побегов – питательную среду МС, дополненную витаминами и 6-БАП (рис. 2). В опытах с различными концентрациями 6-БАП оптимальной была концентрация 1 мг/л [5], на этой среде микроклональное размножение шло максимальными темпами.

На этапе укоренения *in vitro* нами изучалось влияние трех ауксинов (НУК, ИМК, ИУК) в концентрациях 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 мг/л. Об эффективности судили по ряду показателей, в том числе по времени инициации этого процесса. На среде без регуляторов роста образование корней начиналось через 20–22 суток, тогда как на среде с регуляторами роста – через 7–9 суток. На процессы ризогенеза большее влияние оказывала концентрация применяемых ауксинов, чем их химическая природа (табл. 2).

Все растения укоренились и имели максимальное число корней при использовании в составе питательной среды ИМК, ИУК в концентрациях 0,3 мг/л. Использование более низких концентраций ауксинов стимулировало развитие корней не у всех растений, а число регенерированных корней на одном растении было достоверно ниже. Увеличение концентрации ауксинов до 1,0 мг/л приводило к каллусогенезу, который в этом случае преобладал над процессом ризогенеза, что также было отмечено и в работах других авторов [6]. Таким образом, для стимуляции ризогенеза применяется ИУК и ИМК в относительно небольших концентрациях (0,3 мг/л), что дает оптимальные результаты.

Адаптация микроклонально размноженных растений проходила в несколько этапов. Растения извлекали из колбы, корни отмывали от питательной среды под проточной водой и сажали в субстрат (0,2 дм³), несколько обрезав листья для уменьшения площади транспирации. Горшочки накрывали полиэтиленовой пленкой. Поддержание влажности воздуха способствовало увеличению процента выживших растений. Пересаженные в промежуточный

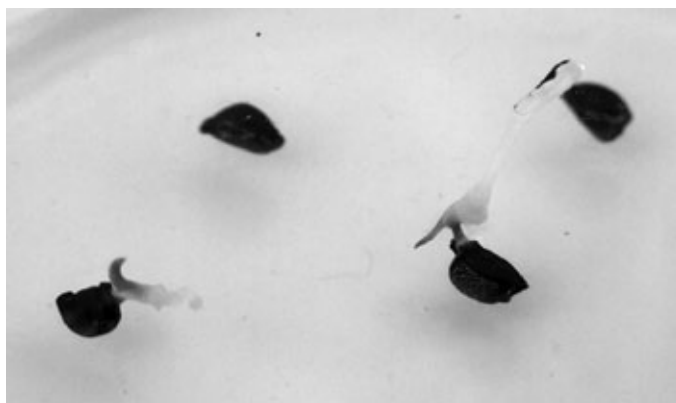
Рисунок 1. Проращивание семян ириса сибирского *in vitro*.



Рисунок 2. Микроклональное размножение ириса сибирского.

субстрат растения культивировали в люминостате при температуре 23–25° С, освещенности 3 тыс. лк 16-часовом фотопериоде. Растения адаптировали к условиям окружающей среды путем проветривания, постепенного увеличивая времени закаливания, начиная с 15 минут.

При адаптации растений *ex vitro* особое внимание уделялось подбору адаптационных субстратов. Применение чистого ионитного субстрата существенно повышает приживаемость микроклонально размноженных растений [7]. Наилучшие результаты по высоте растений через 30, 60 и 90 дней культивирования были получены на субстрате Биона 112 (табл. 3).

Вариант с ионитными смолами (Биона 112) был эффективнее в 1,5 раза по показателям длины корней. Процент адаптированных растений через 90 дней на субстрате Биона 112 также был выше: 94% в сравнении с вермикулитом – 65%. Эти показатели коррелируют с результатами, полученными при микроклональном размножении других растений из нашей коллекции *in vitro*, в частности, герберы [8].

При сравнении промежуточных (адаптационных) субстратов (вермикулит, ионитный субстрат Биона 112) наилучшие результаты по среднему показателю высоты растений, количеству листьев на растении и развитию корневой системы получены на субстрате Биона 112 (рис. 3А).

Таблица 2. Влияние ауксинов на укоренение и развитие растений ириса сибирского в культуре *in vitro* (МС)

Ауксин, мг/л	Укоренение, %	Корни, шт.	Длина корней, см	Длина листа, см
ИУК				
0,1	73	10,9±0,8	6,0±0,3	10,2±0,8
0,3	86	15,0±1,1	5,2±0,2	6,6±0,6
0,6	79	14,5±0,9	4,1±0,2	7,0±0,7
1,0	77	12,5±0,9	6,8±0,4	7,3±0,5
ИМК				
0,1	83	13,6±1,0	5,2±0,3	11,1±1,1
0,3	100	16,0±0,9	7,1±0,3	8,3±0,6
0,6	90	15,1±0,7	5,9±0,2	9,8±0,7
1,0	87	14,2±0,9	5,3±0,1	7,2±0,4
НУК				
0,1	67	10,2±0,8	4,3±0,1	7,4±0,4
0,3	61	12,8±0,9	4,1±0,2	8,9±0,5
0,6	53	11,0±0,6	2,8±0,1	6,9±0,3
1,0	43	12,3±0,7	1,9±0,05	6,1±0,2

Таблица 3. Фенологические показатели развития при адаптации растений ириса сибирского на различных субстратах

Вариант субстрата	Возраст растений, дни		
	30	60	90
Высота растений, см			
Вермикулит	3,9±0,3	11,9±0,6	30,8±0,6
Биона 112	5,7±0,4	17,3±0,6	45,7±0,8
Количество адаптированных растений, %			
Вермикулит	95	73	65
Биона 112	99	95	94
Количество листьев на растении, шт.			
Вермикулит	3,8±0,2	5,1±0,2	7,5±0,4
Биона 112	3,5±0,1	8,4±0,4	12,8±0,7
Длина корней, см			
Вермикулит	4,4±0,3	7,1±0,5	10,5±0,6
Биона 112	8,2±0,5	12,7±0,7	15,7±0,9

Адаптированные растения высаживали в открытый грунт на участок коллекционных декоративных растений (рис. 3В). Растения высаживались рядами, на расстоянии 20–25 см друг от друга, в прохладную погоду. Полив на этапе адаптации в открытом грунте был обильным и частым. На зиму растения первого года укрывались с целью защиты от вымерзания. В следующем сезоне растения зацветали.

Таким образом, была разработана методика введения в культуру ткани ириса сибирского, его микроклонального размножения и адаптации к условиям открытого грунта. Показана эффективность использования искусственного субстрата Биона 112 для перевода регенерантов *ex vitro* на этапе адаптации. Полученные результаты по микроклональному размножению ириса сибирского возможно использовать для получения посадочного материала в сокращенные сроки. Исследования по культуре ткани способствуют сохранению редких генотипов, занесенных в Красную книгу.



Биона 112 вермикулит

А



В

Рисунок 3. Растения ириса сибирского, размноженные микроклонально, на этапе адаптации: А – перед высадкой в грунт из адаптационных субстратов; В – в открытом грунте на участке ЦБС НАН Беларуси.

Список литературы:

1. Fay M. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods // *In vitro* Plant Cell Dev.Biol. 1992. V. 28, p. 1–4.
2. Pence V.C. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants // *Plant Conservation Biotechnology* / Ed. E.F. Benson. Chapter15. London: Taylor and Francis, 1999, p. 227–241.
3. КК
4. Ишмуратова М.М. Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris L.* / М.М. Ишмуратова // *Раст. ресурсы* – 1999. – Вып. 4, с. 46–50.
5. Болтенков Е.В. Особенности культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris L. (Iridaceae)* для использования в биотехнологии. / Е.В. Болтенков / Автореферат дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. // *Биол.-почв. ин-т ДВО РАН, Владивосток* – 2002, с. 24.
6. Особенности регенерации и размножения растений рода *Iris L. (Iridaceae) in vitro*. / Н.А. Вечернина // *Раст. ресурсы* . – 2004. – Вып. 4, с. 32–35.
7. Солдатов В.С. Ионитные почвы. / В.С. Солдатов, Н.Г. Перушкина, Р.П. Хорошко. // *Мн.* – 1978, с. 200–221.
8. Вайновская, И.Ф., Чумакова И.М. Особенности адаптации растений герберы (*Gerbera jamesonii Bolus*) к условиям *ex vitro*. / И.Ф. Вайновская, И.М. Чумакова. // *Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: сб. III Международной науч. конф. Отдела биохимии и биотехнологии растений. 14–16 мая 2008 г. Минск.* – 2008, с. 217–221.

Биотехнологические аспекты сохранения некоторых редких видов растений Липецкой области

Горягина Е.Б., Никонова Г.Н.

*Липецкий государственный педагогический университет, Россия,
e-mail: kate_biol@mail.ru*

Резюме. Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда редких растений является важнейшим достижением биотехнологии. Целью данной работы было изучение условий культивирования *in vitro* некоторых редких видов растений Липецкой области. Максимальная частота прямой регенерации (46,2%) отмечалась при культивировании семян *Dianthus arenarius* L. Наибольшее количество нормально развитых регенерантов (34%) было получено на питательной среде MS с добавлением 2 мг/л 2,4-Д.

Summary. Ability to create a bank of cultures *in vitro* for prolonged storage of the gene pool of rare plants is a major achievement of biotechnology. The aim of this study was to investigate the conditions of *in vitro* cultivation of some rare species of plants of the Lipetsk region. The maximum frequency direct regeneration (46,2%) was observed when cultured seed of *Dianthus arenarius* L. The largest number of apparently normal regenerants (34%) was obtained on MS medium supplemented with 2 mg / L 2,4-D.

В связи с ускоряющимися в последнее время темпами исчезновения многих видов растений, в том числе и на территории Липецкой области, появляется необходимость разработки методов их сохранения и размножения. Одним из подходов к решению данной проблемы является биотехнологический подход, активно разрабатываемый в последние годы. При этом используются такие методы биотехнологии, как микроклональное размножение, каллусная культура *in vitro*, эмбриокультура и другие методы. На основе нетрадиционных систем размножения растений в условиях культуры изолированных клеток, тканей и органов *in vitro* возможна разработка массового получения и тиражирования растений-регенерантов (Круглова, 2008).

Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда редких растений является важнейшим достижением биотехнологии. Использование методов размножения *in vitro* представляет собой важную дополнительную возможность для сохранения редких видов в ботанических садах. Так как при микроразмножении используются асептические условия, проблемы международного обмена растительным материалом значительно сокращены, и большинство стран принимают растения *in vitro* с фитосанитарными сертификатами без обычно требуемого для культур длительного периода карантина. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов.

В связи с этим актуальной является цель данной работы: изучение условий культивирования *in vitro* некоторых редких видов растений Липецкой области.

Исследования проводились в лаборатории физиологии растений ФГБОУ ВПО «ЛГПУ» в 2010–2012 гг. Введение эксплантов редких видов растений в стерильную культуру и микро-