

УДК 57.086.83, 582.572

В.Б. БЕЛОКУРОВА, А.И. СИКУРА, И.И. СИКУРА, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03143 г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ОХРАНЯЕМЫХ ВИДОВ КЛАССА ОДНОДОЛЬНЫХ

*Изучены возможности использования биотехнологических методов для сохранения и восстановления численности некоторых охраняемых видов растений класса однодольных на примере *Iris mandshurica* Meissn. (Iridaceae), *Juno kopetdagensis* Vved. (Iridaceae) и *Tulipa biflora* Donn. (Liliaceae). Разработаны методы введения этих видов в культуру *in vitro*, получения асептических проростков, индукции и культивирования каллусных тканей и регенерации из них растений. Подобраны составы питательных сред для индукции множественных побегов *Iris mandshurica*. Разработаны методы регенерации растений путем соматического эмбриогенеза из каллусных тканей *Juno kopetdagensis* и *Tulipa biflora*. Полученные *in vitro* растения-регенеранты перенесены в условия открытого грунта, где они хорошо прижились, цвели и формировали вегетативное и генеративное потомство.*

Методы современной биотехнологии растений открывают новые возможности сохранения растительных ресурсов путем создания банков зародышевой плазмы и коллекций культивируемых *in vitro* клеточных линий, тканей и целых растений [5]. На сегодняшний день биотехнологические методы, отработанные на модельных растениях, активно используются для видов, представляющих коммерческий интерес. Меньше внимания уделялось их применению для видов природных флор, в том числе редких и охраняемых. Ряд таких видов относится к классу однодольных, представители которого считаются трудноразмножаемыми растениями в культуре *in vitro* [1]. Целью работы была разработка методов культивирования *in vitro* некоторых редких представителей класса однодольных – *Iris mandshurica* Meissn. (Iridaceae), *Juno kopetdagensis* Vved. (Iridaceae) и *Tulipa biflora* Donn. (Liliaceae), а также изучение возможности их использования для сохранения и восстановления численности этих видов в естественных условиях обитания.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали три охраняемых вида класса однодольных: *Iris mandshurica*, редкий вид, произрастающий на Дальнем Востоке; *Juno kopetdagensis*, эндемичный представитель флоры Копет-Дага; *Tulipa biflora*, охраняемый вид флоры Украины. В качестве исходного материала для работы использовали семена из Коллекции зародышевой плазмы мировой флоры, созданной в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины.

Введение в культуру *in vitro*. Для инициации асептической культуры семена были последовательно простерилизованы в 70% этаноле (1 мин), затем в 0,5% растворе гипохлорита натрия (10 мин). После трехкратной промывки стерильной дистиллированной водой семена были перенесены на безгормональную среду Мурасиге–Скуга (MS) [8] и инкубировались при +4° С в течение различных промежутков времени (1–9 месяцев). После окончания периода стратификации семена культивировали в условиях 25° С и 16-часового фотопериода до формирования проростков.

© В.Б. БЕЛОКУРОВА, А.И. СИКУРА, И.И. СИКУРА,
Н.В. КУЧУК, 2004

Культивирование растений и индукция адвентивных побегов. Проростки культивировали на безгормональной среде MS либо на среде MS, содержащей 0,1–1 мг/л бензиламинопурина (БАП) в тех же условиях (25° С, 16-часовой фотопериод). Питательные среды, содержащие БАП, использовали для размножения материала в условиях *in vitro* путем индукции адвентивных побегов или лукович.

Индукция и поддержание каллусных тканей. В качестве эксплантов использовали первичные корешки и базальные части листовых пластинок полученных *in vitro* проростков. Каллус индуцировали на среде MS, содержащей 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-D) и 1 мг/л БАП. Культивирование проводили при 25° С и 16-часовом фотопериоде.

Регенерация растений Tulipa biflora и Juno kopetdagensis из каллусных тканей. Для индукции соматических эмбриоидов в каллусной ткани изменяли состав регуляторов роста в культуральной среде, а именно, 2,4-D заменяли на НУК (1 мг/л для *Tulipa biflora* и 0,1 мг/л для *Juno kopetdagensis*). Сформировавшиеся эмбриоиды инкубировали при 4° С (1–2 месяца), перенесли на среду MS, содержащую 0,1 мг/л БАП, и культивировали при 25° С и 16-часовом фотопериоде до формирования растений.

Перенос растений в условия открытого грунта. Растения, регенерировавшие *in vitro* и сформировавшие хорошо развитую корневую систему, были пересажены в банки объемом 1 л на безгормональную среду MS (по 2–3 растения в каждую банку). Культивирование было продолжено в асептических условиях. После образования каждым растением мощной корневой системы и 4–5 листовых пластинок банки с растениями были перенесены в обычные условия, и крышки с банок были удалены. Через 7 суток адаптационного периода растения были перенесены в открытый грунт.

В течение недели после пересадки в почву растения притеняли.

Результаты и обсуждение

Введение в культуру in vitro и культивирование растений. Процедура проращивания *in vitro* семян и культивирования проростков, разработанная нами ранее для *Juno kopetdagensis* [9], была применена при введении в культуру *in vitro* *Iris mandshurica* и *Tulipa biflora*. Семена растений – представителей семейств Iridaceae и Liliaceae для успешного прорастания требуют стратификации низкими температурами [2], поэтому после поверхностной стерилизации и переноса на питательную среду семена всех трех исследуемых видов инкубировали при 4° С в темноте в течение различных интервалов времени (1–9 месяцев) и лишь затем, после переноса на свежую среду, культивировали при 25° С и 16-часовом фотопериоде. Эффективность прорастания оценивали как отношение числа проросших семян к общему числу семян.

Прорастание семян и развитие проростков *Iris mandshurica* и *Tulipa biflora* происходило после двухмесячного периода стратификации. Для обоих видов эффективность прорастания составила 50–60%. Для прорастания семян *Juno kopetdagensis* требовался значительно более длительный период стратификации (5–7 месяцев), и эффективность прорастания была намного ниже. Лишь 18% семян *Juno kopetdagensis* сформировали растения, у остальных развивались лишь первичные корни длиной 5–10 мм. Несмотря на то, что получить проростки из таких семян не удалось, ткани первичного корня оказались хорошими эксплантами для индукции каллусных тканей.

Культивирование проростков осуществляли на двух типах культуральных сред – безгормональной среде MS, а также среде MS, содержащей 0,1–1 мг/л БАП. В ходе культивирования на безгормональной сре-

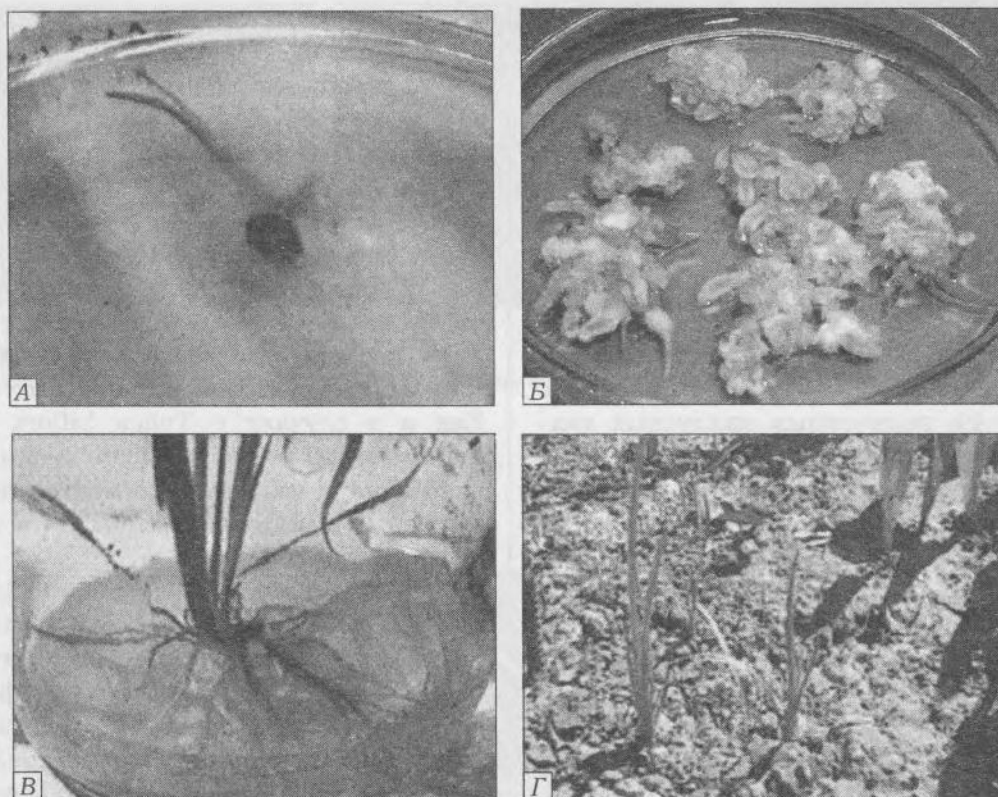


Рис 1. *Iris mandshurica* в культуре in vitro: А – проросток; Б – ризогенез в каллусной культуре; В – растение, сформировавшееся из семян; Г – регенеранты, пересаженные в почву

де растения *Iris mandshurica* нормально развивались и формировали корневище с адвентивными корнями. В то же время при культивировании на безгормональной среде растения *Juno kopetdagensis* и *Tulipa biflora* не были способны к нормальному развитию – темпы роста были низкими, формировались лишь 1–2 листа, и в дальнейшем рост прекращался. Наиболее подходящей для культивирования этих видов была среда MS, содержащая 0,1 мг/л БАП, на которой происходило не только оптимальное развитие растений, но и формирование дочерних луковиц (у *Juno kopetdagensis* и *Tulipa biflora*) или адвентивных побегов (у *Iris mandshurica*). Как правило, количество дочерних луковиц составляло 3–7 шт. на растение; при

этом каждая луковица давала начало новому растению. Таким образом, использование БАП позволило повысить коэффициент размножения *Juno kopetdagensis*, *Tulipa biflora* и *Iris mandshurica* и может быть рекомендовано для микрклонального размножения этих видов. Полученные данные согласуются с общепринятыми методиками микрклонального размножения [1, 5]. Этапы культивирования *Iris mandshurica* от прорастания семян до высадки в почву растений-регенерантов представлены на рис. 1.

Индукция каллуса и регенерация растений из каллусных тканей

Iris mandshurica. Ранее сообщалось о регенерации растений из эксплантов оснований листьев, прикрепленных к

корневищу, и из фрагментов цветков *Iris pallida* и *Iris germanica*, являющихся источником ценного масла – исходного продукта для парфюмерной промышленности [4, 6]. Регенерация растений *Iris pallida* происходила в каллусных тканях, полученных из базальных частей листьев, на среде, содержащей 0,1 мг/л ИБК и 0,1 мг/л кинетина или при наличии GA3 [4]. Каллусные ткани *Iris pallida* и *Iris germanica* были получены также из базальных частей листьев, фрагментов цветков и апексов корневища. Лишь 2–4% полученных каллусных тканей были эмбриогенными [6].

В наших экспериментах формирование каллуса *Iris mandshurica* происходило на среде MS, содержащей 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП, при 25° С и 16-часовом фотопериоде при использовании в качестве эксплантов первичных корней проростков, а не базальных частей листьев. В течение первых месяцев культивирования формировался светло-желтый плотный каллус, который, однако, не был эмбриогенным. В наших исследованиях добиться регенерации растений *Iris mandshurica* из каллусных тканей не удалось.

Tulipa biflora. Формирование каллуса *Tulipa biflora* происходило на среде MS, содержащей 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП, при культивировании в тех же условиях. После переноса на среду, содержащую 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, происходила индукция соматических эмбриоидов (рис. 2). Ранее для индукции адвентивных почек у представителей рода *Tulipa* в качестве эксплантов использовали сегменты лукович и цветочных побегов, которые культивировали в присутствии НУК и БАП [1].

Juno kopetdagensis. Процедура культивирования *in vitro* видов рода *Juno* была описана только для *Juno serulae* [1]. В этой работе в качестве эксплантов использовали ткани зачаточного побега и чешуйки лукович. Морфогенный каллус получали на среде MS с добавле-

нием 0,01–0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина. При пассировании эмбриоидов на безгормональную среду наблюдали ризогенез, а образования побегов не удалось добиться.

Ранее нами сообщалось об индукции растений *Juno kopetdagensis* из семян, длительное время хранящихся в банке зародышевой плазмы [9]. В последующей работе корни и базальные части листьев проростков *Juno kopetdagensis* исследовали как экспланты для получения каллусных линий. Как и в случаях с *Tulipa biflora* и *Iris mandshurica*, оказалось возможным получить каллус только из сегментов первичных корней, которые развивались в ходе прорастания семян.

Каллусные ткани *Juno kopetdagensis* были получены на среде MS с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП при культивировании в условиях 16-часового фотопериода. Формировался очень плотный, зернистый, ярко-желтый каллус. Через 2 месяца культивирования каллусы перенесли на среду, содержащую 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, и культивировали в тех же условиях. После 2–3-месячного культивирования на среде такого состава начиналось формирование соматических эмбриоидов. Соматические эмбриоиды развивались после короткого периода инкубации при пониженных температурах (4° С) и формировали растения на среде MS, содержащей 0,1 мг/л БАП (рис. 3). Общие результаты, полученные при исследовании регенерации трех изученных видов, представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы, использование 2,4-Д и БАП для индукции каллусной ткани из эксплантов первичных корней было эффективным для всех трех изученных видов. Замена 2,4-Д на НУК позволила индуцировать соматический эмбриогенез у *Tulipa biflora* и *Juno kopetdagensis*, но не у *Iris mandshurica*. Использование комбинации 2,4-Д и БАП для индукции эмбриогенного каллуса, а в после-

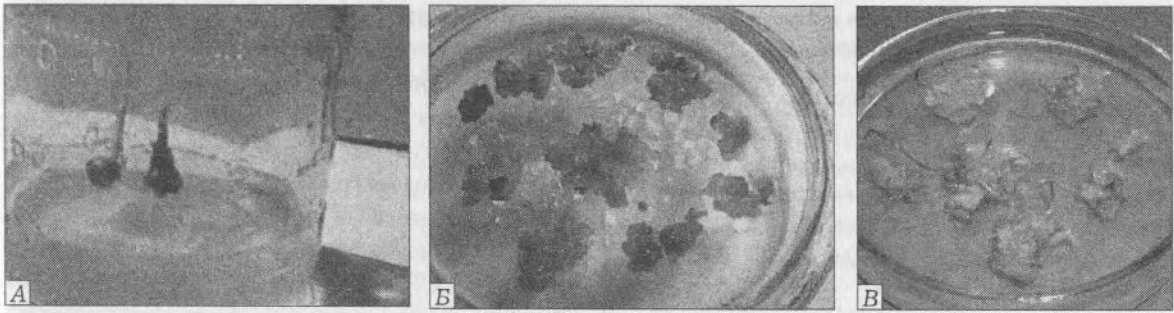


Рис. 2. Культивирование *in vitro* *Tulipa biflora*:

А – луковицы на питательной среде; Б – формирование каллусной ткани; В – регенерация побегов

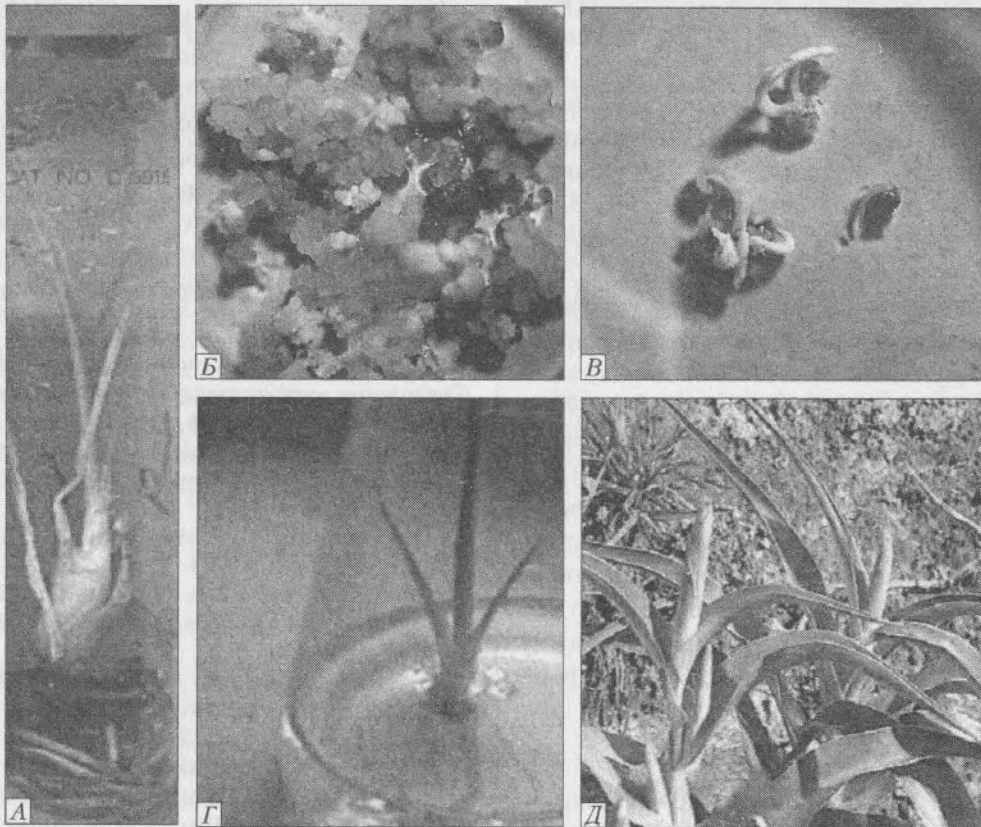


Рис. 3. Этапы культивирования *Juno kopetdagensis*:

А – луковица, сформировавшаяся *in vitro*; Б – индукция эмбриогенеза в каллусной ткани; В – начальные этапы формирования растений из соматических эмбрионидов; Г – растение-регенерант на питательной среде; Д – регенеранты в условиях открытого грунта

Состав регуляторов роста для культивирования каллуса и регенерации растений

Вид	Регуляторы роста, мг/л		
	Формирование каллуса	Индукция соматических эмбрионидов	Формирование растений из соматических эмбрионидов
<i>Iris mandshurica</i>	1 мг/л 2,4-Д + +1 мг/л БАП	Не получено	Не получено
<i>Tulipa biflora</i>	1 мг/л 2,4-Д + +1 мг/л БАП	1 мг/л НУК+ +1 мг/л БАП	0,1 мг/л БАП
<i>Juno kopetdagensis</i>	1 мг/л 2,4-Д + +1 мг/л БАП	0,1 мг/л НУК+ +1 мг/л БАП	0,1 мг/л БАП

дующем – комбинации НУК и БАП для индукции соматических эмбрионидов является часто используемым методическим приемом для целого ряда видов растений, в том числе однодольных [3].

Высадка в почву и выращивание в естественных условиях. Растения-регенеранты культивировали на среде MS, содержащей 0,1 мг/л БАП, в условиях культуральной комнаты. Они все формировали нормально развитую корневую систему и мощные листовые пластинки. Адаптация к условиям открытого грунта была успешной. Эффективность приживаемости *Iris mandshurica* составила 83%, *Juno kopetdagensis* – 75%, *Tulipa biflora* – 100%. Все растения *J. kopetdagensis* и *I. mandshurica* на следующий год после их переноса из асептической культуры в почву сформировали цветочные почки и цветки. Через год после высадки в почву цвели только 25% растений *T. biflora*, но все высаженные в почву растения размножаются вегетативно (образуют луковички) и формируют семена.

Заключение

В результате проведенной работы разработаны методы культивирования и размножения *in vitro* с последующей пересадкой в почву трех видов растений класса однодольных – *Iris mandshurica*, *Juno kopetdagensis* и *Tulipa biflora*. В отличие от процитированных публикаций [1, 4, 6] в

нашей работе в качестве исходного материала были использованы семена, хранящиеся в генетическом банке, а не отдельные органы вегетирующих в условиях *in vivo* растений. Использование живых тканей вегетирующих растений далеко не всегда приемлемо, особенно когда речь идет о редких, эндемичных или охраняемых видах. Кроме того, существует зависимость морфогенетической активности эксплантов от физиологического состояния материнского растения [1]. Результаты наших исследований показывают, что в качестве исходного материала можно с успехом использовать семена, длительное время хранящиеся в генетическом банке. Применение биотехнологических методов, в частности методов культуры *in vitro*, дает возможность получать значительное количество растительного материала даже из минимального числа семян. Проведенные исследования могут рассматриваться как пример реализации возможностей биотехнологии растений для восстановления охраняемых, редких или исчезающих видов в естественной среде обитания.

1. Калинин Ф.Л., Кушинир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 228 с.

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

3. Ammirato P.V. Embryogenesis // Handbook of plant cell culture. V. I. Techniques for propagation and breeding / Eds. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada. – New York: Macmillan, 1983. – P. 82–123.

4. Gozu Y., Yokoyama M., Nakamura M. et al. *In vitro* propagation of *Iris pallida* // Plant Cell Reports. – 1993. – Vol. 13. – P. 12–16.

5. Hussey G. Vegetative propagation of plants by tissue culture // Plant cell culture technology / Ed. M.M. Yeoman. – Blackwell Scientific Publications, 1986. – P. 29–66.

6. Jehan H., Courtois D., Ehret C., Lerch K., Petiard V. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers // Plant Cell Reports. – 1994. – Vol. 13. – P. 671–675.

7. Kuckuck H., Kobabe G., Wenzel G. Safeguarding and utilization of natural genetic diversity // Fundamentals of plant breeding – Springer-Verlag, 1991. – P. 220–230.

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

9. Szikura A., Belokurova V. Comparative study of in vivo and in vitro ontogenesis of *Juno Tratt.* species (Iridaceae) of the flora of Central Asia and Kazakhstan // *Proc. Int. Conf. "Plant Genefund Accumulation, Evaluation and Protection in the Botanical Gardens"* (Vilnius, 1–2 July 1999). – Vilnius, 1999. – P. 141–142.

Рекомендовала к печати А.Н. Лаврентьева

В.Б. Белокурова, А.Й. Сікура,
Й.Й. Сікура, М.В. Кучук

Інститут клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України,
Україна, м. Київ

РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ ЧИСЕЛЬНОСТІ ДЕЯКИХ ВИДІВ КЛАСУ ОДНОДОЛЬНИХ, ЩО ПОТРЕБУЮТЬ ОХОРОНИ

Вивчено можливості використання біотехнологічних методів для збереження та відновлення чисельності деяких видів рослин класу однодольних, що потребують охорони, на прикладі *Iris mandshurica* Meissn. (Iridaceae), *Juno kopetdagensis* Vved. (Iridaceae) та *Tulipa biflora* Donn. (Liliaceae). Розроблено методи введення цих видів в культуру *in vitro*, отримання асептичних проростків, індукції та культивування калусних тканин і регене-

рації з них рослин. Підібрано склади поживних середовищ для індукції множинних пагонів *Iris mandshurica*. Розроблено методи регенерації рослин шляхом соматичного ембріогенезу з калусних тканин *Juno kopetdagensis* та *Tulipa biflora*. Отримані *in vitro* рослини-регенеранти були перенесені в умови відкритого ґрунту, де вони добре прижилися, цвіли і формували вегетативне і генеративне потомство.

V.B. Belokurova, A.J. Szikura,
J.J. Szikura, N.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv

ELABORATION OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR RESTORATION OF QUANTITY OF SOME PRESERVED MONOCOTYLEDONOUS SPECIES

The possibility to use biotechnological methods for preservation and restoration of quantity of some preserved monocotyledonous species was studied by the example of *Iris mandshurica* Meissn. (Iridaceae), *Juno kopetdagensis* Vved. (Iridaceae) and *Tulipa biflora* Donn. (Liliaceae). The methods of introduction of these species into *in vitro* culture, formation of aseptic seedlings, of induction and cultivation of callus tissues and plant regeneration have been elaborated. Culture media compositions were established for obtaining of *Iris mandshurica* multiple shoots. The methods of plant regeneration via somatic embryogenesis from callus cultures of *Juno kopetdagensis* and *Tulipa biflora* have been created. Regenerated *in vitro* plants rooted in field conditions, formed flowers and seeds as well as vegetative progeny.