

СПОСОБЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ ПОКОЯ СЕМЯН И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА *IRIS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Аннотация.

Актуальность и цели. Изучение природы органического покоя семян и условий его преодоления важно для культивирования многих растений. Разработка способов и технологий выращивания в условиях *in vitro* позволяет получить здоровый посадочный материал и ускоряет процесс выведения новых сортов растений, что дает возможность сохранить генетические ресурсы культурных и дикорастущих видов. Целью исследований являлось изучение особенностей преодоления покоя семян ирисов и последующее введение в культуру *in vitro* полученных проростков растений.

Материалы и методы. Семена исследуемых видов ирисов (*Iris pseudacorus* L.; *I. graminea* L.; *I. ensata* Thunb.; *I. missouriensis* Nutt.; *I. sibirica* L.; *I. Halophila* Pall.) собирались в Пензенском ботаническом саду имени И. И. Спрыгина в 2017–2018 гг. В лабораторных условиях изучали особенности прорастания семян при воздействии внешних факторов – температуры, света, скарификации. Проросшие семена были посажены в культуру *in vitro*. Экспланты культивировали в стерильных условиях. Питательная среда – среда *Murashige, Skoog* с добавлением 3-индолилуксусной кислоты (2 мг/л) и гибберелловой кислоты (2 мг/л), содержание сахарозы – 20 г/л, глюкозы – 10 г/л. Растения выращивали при естественном освещении (8000–10 000 лк) и температуре (+20–25 °С). Биологическая повторность опыта – десятикратная.

Результаты. В ходе исследования было выяснено, что лабораторная всхожесть при обычном замачивании семян, прошедших предварительную сухую холодную стратификацию, и проращивании при температуре +3 °С в условиях темноты была максимальной. Предварительное промораживание повышало их всхожесть. Отмечено, что наиболее высокие показатели фиксировались при наименьших сроках хранения семян и условии их полного созревания. Среди изученных видов ирисов наименее прихотливым оказался ирис сибирский (*I. sibirica* L.) с максимальным процентом взошедших семян. Были подобраны оптимальные условия для введения проростков ириса в культуру *in vitro*. Разработана методика введения в среду *in vitro* растений рода *Iris*, благодаря которой можно получить растения с 93 % всхожестью семян и 80 % гарантией того, что в питательной среде не будут развиваться патогенные организмы. Важными аспектами в выращивании ирисов в искусственной среде являются правильная стерилизация семян, удаление семенной кожуры и подбор подходящей питательной среды.

Выводы. Сухая холодная стратификация в течение 30 дней и проращивание при температуре +3 °С при отсутствии света нарушают глубокий физиологический покой семян у *I. pseudacorus* L., *I. graminea* L., *I. ensata* Thunb., *I. missouriensis* Nutt., *I. sibirica* L. и стимулируют их прорастание. Для нарушения

комбинированного покоя у *I. halophila* Pall. дополнительно нужна скарификация. Разработана оптимальная схема стерилизации проростков ирисов при введении в культуру *in vitro*: 0,5 % KMnO_4 (15 мин) → 1 % CuSO_4 (15 мин) → 70 % этанол (1 мин) → 3 % р-р H_2O_2 (1 мин) → многократная промывка стерильной дистиллированной водой. Подобран состав питательной среды для культивирования *in vitro* – среда *Murashige, Skoog* с добавлением 3-индолилуксусной кислоты (2 мг/л) и GA_3 (2 мг/л), содержание сахарозы – 20 г/л, глюкозы – 10 г/л.

Ключевые слова: Iris, покой семян, прорастание семян, культура *in vitro*.

S. A. Soldatov, G. A. Karpova

METHODS FOR OVERCOMING SEED DORMANCY AND FEATURES OF IRIS CULTIVATION IN *IN VITRO* CONDITIONS

Abstract.

Background. The state of organic seed dormancy is an important adaptation mechanism for the conservation of the species. However, the presence of deep dormancy makes the cultivation of many plants difficult. The development of methods and technologies for growing plants *in vitro* allows to preserve some rare species. This method allows to obtain healthy planting material and significantly speeds up the process of breeding new varieties as well as preserves the genetic resources of cultivated and wild plant species. The purpose of this research is to study the peculiarities of overcoming the dormancy of iris seeds and the subsequent introduction of seedlings into *in vitro* culture.

Materials and methods. The seeds of the studied iris varieties (*Iris pseudacorus* L.; *I. graminea* L.; *I. ensata* Thunb.; *I. missouriensis* Nutt.; *I. sibirica* L.; *I. halophila* Pall.) were collected in 2017–2018 in Penza Botanical Garden named after I. Sprygin. In laboratory conditions were studied the features of seed germination under the influence of various factors – the change of temperature and light, scarification. Sprouted seeds were planted *in vitro*. The explants were cultured in sterile conditions on a nutrient medium *Murashige, Skoog* with the addition of phytohormones – auxin (0,5–2 mg/l) and Gibberellin GA_3 (2 mg/l), sucrose content – 20 g/l, glucose – 20 g/l. 10 seedlings of five plant species were grown under natural light and at room temperature.

Results. During the study it was found that laboratory germination of seeds after cold dry stratification reached its maximum at +3 °C. Illumination had no effect on seed germination in the studied plant species. At the same time pre-freezing increased seed germination. It was also concluded that the less the seeds were in storage, the higher their germination was. Among the studied species of irises, the Siberian iris (*I. sibirica* L.) turned out to be the least whimsical and this sort has the highest percentage of seed germination. Optimal conditions were selected for the introduction of iris seedlings *in vitro*. A scheme has been developed for the introduction of plants of Iris into the medium *in vitro*, thanks to which it is possible to obtain plants with 93 % seed germination and with an 80 % guarantee that no pathogenic organisms will grow in the nutrient medium. The important points in the cultivation of irises in an artificial environment are the correct sterilization of seeds, the removal of the seed coat and the selection of a suitable nutrient medium.

Conclusions. The influence of temperature, illumination and cold dry stratification on the germination of iris seeds disturb the deep dormancy of *I. pseudacorus* L., *I. graminea* L., *I. ensata* Thunb., *I. missouriensis* Nutt., *I. sibirica* L. seeds and pro-

mote their germination. To disturb the dormancy of *I. halophila* Pall seeds it was essential to use additional scarification. Also there was created a special way of seed sanification before planting them *in vitro*: 0,5 % KMnO₄ (15 minutes) → 1 % CuSO₄ (15 minutes) → 70 % ethanol (1 minute) → 3 % solution of H₂O₂ (1 minute) → repeated washing with sterile distilled water. The composition of the nutrient medium for *in vitro* cultivation was also selected as follows – the Murashige, Skoog medium with the addition of 3-indoleacetic acid (2 mg/l) and GA₃ (2 mg/l), the content of sucrose is 20 g/l, glucose is 10 g/l.

Keywords: Iris, seed dormancy, seed germination, *in vitro*.

Введение

Многие виды растений рода *Iris* в некоторых регионах России считаются редкими и занесены в Красную книгу [1].

Растения рода *Iris* могут размножаться двумя способами: семенами и вегетативно. В культуре наиболее распространенным является вегетативное размножение. Особенности семенного размножения на сегодняшний день мало изучены. Для всех растений, в том числе и для растений рода *Iris*, характерен покой семян, который является естественным механизмом защиты растений при неблагоприятных факторах внешней среды. Наличие покоя семян затрудняет их культивирование. Поэтому изучение органического покоя семян и условий его преодоления весьма актуально.

Методы биотехнологии растений дают новые возможности для решения проблемы сохранения редких видов. При культивировании растений в условиях *in vitro* наблюдаются различия в потребностях к минеральному составу среды, присутствию фитогормонов и других факторах. Для введения каждой новой формы в условиях *in vitro* необходимо оптимизировать состав питательной среды, совершенствовать методы размножения.

Разработка методов культивирования растений в условиях *in vitro* позволяет получить здоровый посадочный материал, значительно ускорить селекционный процесс, сохранить генетические ресурсы культурных и дикорастущих видов растений [2].

Цель данной работы – изучение особенностей преодоления покоя семян ирисов и разработка методики введения в культуру *in vitro* полученных проростков растений.

Материалы и методика

Объектами исследования были шесть видов ирисов: ирис болотный – *Iris pseudacorus* L.; ирис злаковидный – *I. graminea* L.; ирис мечевидный – *I. ensata* Thunb.; ирис миссурийский – *I. missouriensis* Nutt.; ирис сибирский – *I. sibirica* L.; ирис солелюбивый – *I. halophila* Pall. [3]. Семена исследуемых видов ирисов собирались в Пензенском ботаническом саду имени И. И. Спрыгина в 2017–2018 гг. [4].

Семена проращивали в чашках Петри, на фильтровальной бумаге в условиях термостата (ТС-1/80 СПУ). В каждую чашку Петри помещали по 20 семян ($n = 5$).

Был заложен опыт по прорастаню семян в разных температурных и световых условиях. Измерение интенсивности освещения проводили в 12 ч дня с помощью люксметра Ю-116.

Для определения особенностей прорастивания семян ирисов в разных условиях они были подвержены следующим воздействиям:

1) часть семян каждого из исследуемых видов были предварительно заморожены в климатотермостате (KRIO-VT-01);

2) часть семян прорастивалась с семенной кожурой, а с части семян семенная кожура была удалена;

3) при различных освещенности и колебаниях температур.

Методика определения всхожести различных цветочно-декоративных культур описана в ГОСТ 24933.2–81 «Семена цветочных культур. Методы определения всхожести и энергии прорастания», в соответствии с которым нормально проросшими семенами считаются те семена, которые имеют хорошо развитые, здоровые корешки и хорошо развитые и неповрежденные гипокотиль, эпикотиль и первичные листочки [5].

Результаты исследований были подвергнуты статистической обработке. Биологическая повторность опыта – десятикратная.

Для введения растений ириса в культуру *in vitro* семена прорастивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге, при естественном освещении (8000–10 000 лк) и температуре (+20–25 °C), подвергнув предварительной стерилизации по схеме: 1 % р-р KMnO_4 (10 мин) → 70 % р-р этанола (1 мин) → 3 % р-р H_2O_2 (1 мин).

Далее проводили поэтапную стерилизацию проросших семян перед внесением в питательную среду: 0,5 % KMnO_4 (15 мин) → 1 % CuSO_4 (15 мин) → 70 % этанол (1 мин) → 3 % р-р H_2O_2 (1 мин) → многократная промывка стерильной дистиллированной водой.

Для культивирования растений использовали среду Murashige, Skoog [6]. Автоклавирование среды проводилось при 123 °C в течение 40 мин (Tuttnauer 2540 ML, AUTOCLAVE – STEAMSTERILIZER). pH среды довели до 5,8. Для этого использовали 0,1 н HCl и 0,1 н NaOH. Содержание сахарозы – 20 г/л, глюкозы – 10 г/л. В качестве экзогенных регуляторов роста использовали: 3-индолилуксусную кислоту (2 мг/л) и гибберелловую кислоту (2 мг/л). Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводились в асептическом помещении (ламинар-боксе – LAMSYSTEMS, класс II / тип А) стерильными инструментами. Растения выращивали при естественном освещении (8000–10 000 лк) и температуре (+20–25 °C).

Результаты и обсуждение

Для семян исследуемых видов ириса характерен комбинированный и физиологический покой различной глубины (A_{Φ} - B_{1-3} ; B_{1-3}). *I. sibirica* – B_3 . *I. pseudacorus* – B_3 . *I. graminea* – B_3 . *I. halophila* – A_{Φ} - B_3 . *I. ensata* – B_3 . *I. missouriensis* – B_3 [7, 8].

У всех изученных видов замораживание семян резко повышает их всхожесть. Удаление семенной кожуры не влияет на процесс прорастания у видов: *I. sibirica*, *I. pseudacorus*, *I. graminea*, *I. ensata*, *I. missouriensis*. У *I. halophila* скарификация стимулирует данный процесс, что обусловлено более плотными семенными покровами, затрудняющими поступление воды для обеспечения пусковых механизмов прорастания. К тому же у вида *I. ha-*

halophila присутствует глубокий физиологический покой в комбинации с физическим покоем.



Рис. 1. Проростки *Iris graminea* L.

Колебания температуры ($t = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $t = +20\text{ }^{\circ}\text{C}$, смена температур каждые 24 ч) снижают всхожесть и замедляют процесс прорастания семян. Оптимальной температурой для прорастания семян является температура $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Всхожесть семян, прошедших предварительную сухую холодную стратификацию в течение 30 дней и проращивание при температуре $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$, была максимальной. При этом наличие света является ингибирующим фактором для прорастания семян и развития проростков.

Таблица 1

Всхожесть семян растений рода *Iris*
при различных условиях проращивания (%)

Виды	Естественная освещенность, $t = +20\text{ }^{\circ}\text{C}$, контроль	Естественная освещенность, колебания температур	Без освещения $t = +20\text{ }^{\circ}\text{C}$	Без освещения $t = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$
Ирис болотный (<i>I. pseudacorus</i> L.)	72	50	73	76
Ирис злаковидный (<i>I. graminea</i> L.)	62	50	66	87
Ирис мечевидный (<i>I. ensata</i> Thunb.)	60	45	65	84
Ирис миссурийский (<i>I. missouriensis</i> Nutt.)	63	40	67	85
Ирис сибирский (<i>I. sibirica</i> L.)	74	56	70	93
Ирис солелюбивый (<i>I. halophila</i> Pall.)	72	52	80	85

После проращивания было целесообразным использование этих семян для изучения культивирования ирисов в условиях *in vitro*.

На основе проведенных исследований была разработана схема культивирования различных видов растений рода *Iris*: стерилизация семян в дезинфицирующих растворах → проращивание в чашках Петри на дистиллирован-

ной воде при комнатной температуре и естественном освещении → удаление семенной кожуры → стерилизация проростков в дезинфицирующих растворах → пересев проростков в культуру *in vitro*. Данная схема при введении в культуру оказалась удачной. Предварительная стерилизация семян и проростков, а также удаление семенной кожуры привели к снижению зараженности до 20 %.

Всего исследовалось шесть видов растений. Анализировали по 10 проростков каждого вида. Все исследуемые виды ириса в среде росли примерно с одинаковой скоростью, побеги длиной 2 см удалось получить через 7–8 дней, а побеги 6 см через 15–17 дней после введения проростков в среду культивирования.

В 80 % случаев пробирки со средой не были заражены бактериями или грибной микрофлорой.

На интенсивный рост растений оказывали влияние такие факторы, как:

- состав питательной среды (различные соли, витамины, органические кислоты, которые создают растениям комфортные условия для питания и развития);

- фитогормоны, такие как 3-индолилуксусная кислота (2 мг/л) и гибберелловая кислота (2 мг/л), которые вызывают резкое ускорение роста зеленой массы растений.

Таким образом, подбор оптимальных условий культивирования (состав питательной среды, концентрации витаминов и фитогормонов, режим освещения, температура) влияет на рост и развитие растений. Соблюдение стерильности – одно из основных условий работы с растениями в условиях *in vitro*.

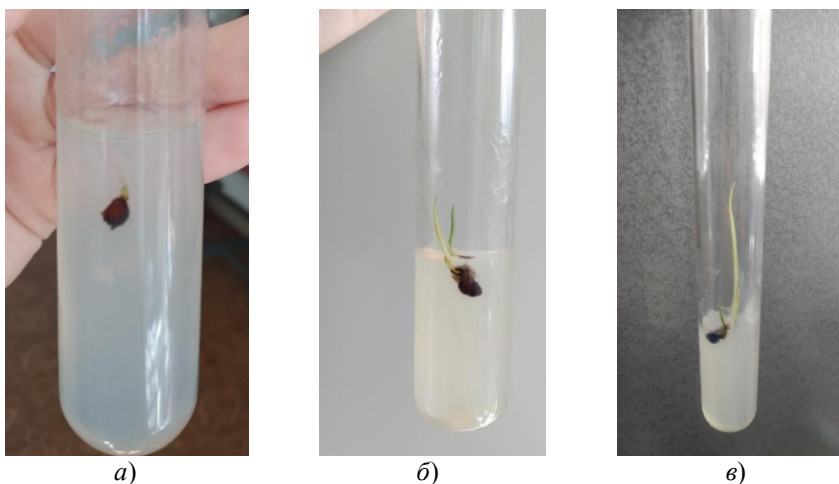


Рис. 2. Проростки *Iris sibirica* L. сразу после внесения в питательную среду (а), через 7 дней после внесения в питательную среду (б), через 15 дней после внесения в питательную среду (в)

Закключение

Установлена оптимальная температура для прорастания семян растений рода *Iris*: +3 °С. При данной температуре всхожесть семян разных видов ирисов возрастала на 5,6–40,3 % по сравнению с контролем. Колебания тем-

пературы ($t = +3$ °С и $t = +20$ °С, смена температур каждые 24 ч) снижает всхожесть и замедляет процесс прорастания семян на 19,4–30,5 % по сравнению с контролем. Предварительное промораживание повышает всхожесть семян.

Свет является ингибирующим фактором для всхожести семян и прорастания проростков у большинства изученных видов ириса. Всхожесть семян снизилась на 1,4–11,1 % по сравнению с контролем. У ириса сибирского всхожесть семян при наличии света оказалась выше на 5,4 % по сравнению с вариантом без освещения.

Разработана схема введения в среду *in vitro* растений рода *Iris*: стерилизация семян в дезинфицирующих растворах → проращивание в чашках Петри на дистиллированной воде при комнатной температуре и естественном освещении → удаление семенной кожуры → стерилизация проростков в дезинфицирующих растворах → пересев проростков в культуру *in vitro* на питательную среду Murashige, Skoog. Оптимизирован гормональный состав питательной среды и содержание сахаров для культивирования растений рода *Iris*: сахароза – 20 г/л, глюкоза – 10 г/л, 3-индолилуксусная кислота (2 мг/л) и гибберелловая кислота (2 мг/л).

Библиографический список

1. **Набиева, А. Ю.** Микрклональное размножение некоторых редких видов рода *Iris* L. / А. Ю. Набиева // Труды Томского государственного университета. Сер.: Биология: Ботанические сады. Проблемы интродукции. – Томск, 2010. – С. 270, 271.
2. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / В. Б. Белокурова, Е. В. Листван, П. Д. Майстров, Й. Й. Сикура, Ю. Ю. Глеба, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41–51.
3. Плантариум. Определитель растений on-line. – URL: <http://www.plantarium.ru/> (дата обращения: 10.09.2020).
4. Ботанический сад. – URL: <https://botsad.pnzgu.ru> (дата обращения: 10.09.2020).
5. ГОСТ 24933.2–81. Семена цветочных культур. Методы определения всхожести и энергии прорастания. – URL: <http://vsegost.com/Catalog/13/13865.html> (дата обращения: 10.09.2020).
6. **Широков, А. И.** Основы биотехнологии растений : электронное учеб.-метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Нижний Новгород : Нижегородский государственный ун-т, 2012. – 49 с.
7. **Николаева, М. Г.** Биология семян / М. Г. Николаева, И. В. Лянгузова, Л. М. Поздова. – Санкт-Петербург, 1999. – 231 с.
8. **Николаева, М. Г.** Справочник по проращиванию покоящихся семян / М. Г. Николаева, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова. – Ленинград : Наука, 1985. – 347 с.

References

1. Nabieva A. Yu. *Trudy Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser.: Biologiya: Botanicheskie sady. Problemy introduktsii* [Proceedings of Tomsk State University. Series: Biology. Botanical garden. Induction issues]. Tomsk, 2010, pp. 270, 271. [In Russian]
2. Belokurova V. B., Listvan E. V., Maystrov P. D., Sikura Y. Y., Gleba Yu. Yu., Kuchuk N. V. *Tsitologiya i genetika* [Cytology and genetics]. 2005, no. 1, pp. 41–51. [In Russian]
3. *Plantarium. Opredelitel' rasteniy on-line* [Plantarium. On-line plants determinant]. Available at: <http://www.plantarium.ru/> (accessed Sept. 10, 2020). [In Russian]

4. *Botanicheskiy sad* [Botanical garden]. Available at: <https://botsad.pnzgu.ru> (accessed Sept. 10, 2020). [In Russian]
5. GOST 24933.2–81. *Semena tsvetochnykh kul'tur. Metody opredeleniya vskhozhesti i energii prorastaniya* [Flower seeds. Methods for determining germination and germination energy]. Available at: <http://vsegost.com/Catalog/13/13865.html> (accessed Sept. 10, 2020). [In Russian]
6. Shirokov A. I., Kryukov L. A. *Osnovy biotekhnologii rasteniy: elektronnoe ucheb.-metod. posobie* [Fundamentals of plant biotechnology: e-learning methodological allowance]. Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskiy gosudarstvennyy un-t, 2012, 49 p. [In Russian]
7. Nikolaeva M. G., Lyanguzova I. V., Pozdova L. M. *Biologiya semyan* [Seed biology]. Saint-Petersburg, 1999, 231 p. [In Russian]
8. Nikolaeva M. G., Razumova M. V., Gladkova V. N. *Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchikhsya semyan* [Dormant seed germination guide]. Leningrad: Nauka, 1985, 347 p. [In Russian]

Солдатов Сергей Александрович

кандидат биологических наук, доцент,
кафедра общей биологии и биохимии,
Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: soldatov_sa@mail.ru

Soldatov Sergey Aleksandrovich

Candidate of biological sciences, associate
professor, sub-department of general
biology and biochemistry, Penza State
University (40 Krasnaya street, Penza,
Russia)

Карпова Галина Алексеевна

доктор сельскохозяйственных наук,
доцент, заведующий кафедрой общей
биологии и биохимии, Пензенский
государственный университет (Россия,
г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: pollylina@mail.ru

Karpova Galina Alekseevna

Doctor of agricultural sciences, associate
professor, head of the sub-department
of general biology and biochemistry, Penza
State University (40 Krasnaya street,
Penza, Russia)

Образец цитирования:

Солдатов, С. А. Способы преодоления покоя семян и особенности культивирования растений рода *Iris* в условиях *in vitro* / С. А. Солдатов, Г. А. Карпова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2020. – № 4 (32). – С. 24–31. – DOI 10.21685/2307-9150-2020-4-3.