

УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ГОРОДА ПЕНЗЫ
МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИМНАЗИЯ № 53» г. ПЕНЗЫ
(МБОУ «Гимназия № 53» г. Пензы)

ул. Попова, 14, г. Пенза, 440046
телефон (8-412) 54-32-03, 54-30-32 E-mail: school53@guoedu.ru
ОКПО 24020409, ОГРН 1025801443568
ИНН/КПП 5837009907/583701001

Исследовательская работа на тему:

**«Редкие виды ирисов в Пензенском ботаническом
саду им. И.И. Спрыгина»**

Автор: Богослова Варвара,

Учащаяся 9 класса МБОУ «Гимназия №53»

Научные руководители: Солдатов С.А. к.б.н., доцент
ФГБОУ ВО «ПЕНЗЕНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Федичкина В.А.,
учитель биологии МБОУ «Гимназия №53» г. Пензы

2020 г

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1. Биологические особенности растения рода ирис.....	4
1.2. Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах.....	5
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	20
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	21

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс в области современной биотехнологии растений непосредственно связан с разработкой методических приемов культивирования клеток *in vitro*. Этим методом получен ряд форм и сортов растений с ценными признаками, которые используются во многих странах мира.

Растения, выращенные в *in vitro* – это посадочный материал нового поколения, обладающий рядом неоспоримых преимуществ:

- растения свободны от фитопатогенов;
- они обладают повышенными темпами роста и развития;
- возможность размножения в неограниченных количествах гибридных форм растений, с сохранением всех ценных признаков;
- отсутствие сезонности при посадке материала;
- возможность производства больших объемов посадочного материала в сжатые сроки.

Актуальность темы. Значительная роль в деле сохранения растений отводится ботаническим садам, так как введение в культуру редких и исчезающих видов в коллекциях садов это дополнительный способ сохранения генофонда редких растений и обеспечение дальнейшей возможности их реинтродукции и репатриации.

Цель исследовательской работы: изучить особенности культивирования ирисов в условиях *in vitro* для дальнейшего роста численности редких видов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. освоить метод культивирования растений в условиях *in vitro*;
2. подобрать оптимальные условия для введения в культуру *in vitro*;
3. сделать ботаническое описание выбранных сортов ирисов;
4. подобрать способы стерилизации семян ирисов;
5. вырастить растения рода *Iris* L. в условиях *in vitro*.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биологические особенности растения рода ирис

Ирис (*Iris*), или Касатик – род многолетних корневищных растений семейства Касатиковые, или Ирисовые (*Iridaceae*). Этот род считается одним из самых богатых. Ему принадлежит примерно двести шестьдесят разнообразных по форме и цвету видов [6]. Но многие виды на данный момент являются редкими и охраняются. Для увеличения и сохранения видового разнообразия применяют метод культивирования *in vitro*.

В Пензенском ботаническом саду им. И.И. Спрыгина выращивается 6 редких видов растения рода *Iris*. 4 вида включены в Красную книгу РФ: ирис мечевидный – *Iris ensat*, ирис карликовый – *Iris pumila*, ирис безлистный – *Iris aphylla*, ирис ненастоящий – *Iris notha*; 2 вида – Красная книга Пензенской области: ирис солелюбивый – *Iris halophila* и ирис сибирский – *Iris sibirica* [6].

На Земле Ирисовые распространены очень широко. Их можно встретить и на территории Евразии, в обеих частях материка, и в Африке, и в Северной Америке.



Рисунок 1. Строение Ириса

Стебли ириса могут быть одиночными и пучками, простыми и ветвистыми. Листья также могут быть самыми разнообразными: плоскими, мечевидными, двухрядными, линейными, тонкими, с восковым налетом, собранными большей частью при основании цветоносов вееровидными пучками. Стеблевые листья чаще всего отсутствуют. Вегетативные побеги – многолетние, подземные корневища, которые погружены в почву или расположились на поверхности, состоят из отдельных годичных звеньев, которые несут пучки листьев. На нижней поверхности корневища развиваются шнуровидные или нитевидные, мочковатые придаточные корни. Генеративные побеги (цветоносы) – однолетние, могут быть одиночными, а могут располагаться пучками.

Корневая система расположена в верхнем пахотном слое.

Цветки могут быть одиночными или в соцветиях. Цветки некоторых видов обладают душистым запахом. У цветков Ирисовых очень богатая цветовая палитра. В природе встречаются белые, жёлтые, розовые, голубые, фиолетовые, и даже чёрные цветки, а также различное сочетание этих цветов [9].

1.2. Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах

При культивировании растений в условиях *in vitro* используются изолированные клетки и ткани.

Изолированные клетки и ткани (экспланты) могут успешно расти только в отсутствии микроорганизмов. Поэтому все работы проводятся в асептических условиях. Экспланты также следует подвергать стерилизации.

В настоящее время изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах, отличающихся по своему составу в зависимости от вида культуры.

Все питательные среды содержат микроэлементы: азотосодержащие вещества, фосфор, сера, кальций, сульфаты. Отсутствие микроэлементов в

питательной среде уменьшает интенсивность роста тканей, а в некоторых случаях и их гибель.

Для успешного роста культуры необходимы источники углерода. Лучший источник углерода – сахароза, используемая в концентрации 2-5 %. Реже используются другие сахара.

Ткани, культивируемые в условиях *in vitro*, способны синтезировать витамины самостоятельно, но часто только в субминимальных количествах. Поэтому в питательную среду часто добавляют витамины, например витамины группы В, биотин, кислоты: аскорбиновую, никотиновую и др.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть фитогормоны. К ним относятся ауксины, регулирующие рост и дифференцировку клеток и цитокинины, индуцирующие клеточное деление и др [5].

На рост и развитие растительных тканей и клеток *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы: свет, температура, аэрация, влажность воздуха.

В некоторых случаях свет может использоваться как фактор, обеспечивающий морфогенез или активизирующий процесс синтеза биологически активных веществ. Для освещения чаще используют люминесцентные лампы с интенсивностью светового потока 1000-1500 люкс. Оптимальная температура для успешного роста большинства культур составляет 25-27 °С, для индукции их морфогенеза требуются более низкие температуры (18-25 °С). Влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60-70 %.

Таким образом, чтобы вырастить растение в культуре *in vitro* необходимо:

- знать методы стерилизации семян и эксплантов;
- правильно приготовить питательную среду *in vitro*;
- подобрать условия для выращивания растений (свет, температуру).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – ирисы разных видов: мечевидный, сибирский, солелюбивый. Семена растений были взяты из Ботанического сада им. И.И. Спрыгина ПГУ.

Ирис мечевидный (*Iris ensata Thunb*)



Рисунок 2. Ирис мечевидный (*Iris ensata Thunb*)

Многолетнее травянистое растение, в высоту достигающее 85 см. Имеет прямостоячий листовенный стебель, в основании которого находятся волокнистые остатки старых листьев, а в середине выступают жилки серого цвета. Своё название данный вид Ирисов получил из-за прикорневых листьев, которые имеют мечевидную форму. Ширина листьев 0,5-3 см, длиннее стебля. Листочки обертки травянистые, узколанцетные, заострённые. На одном кусте 1-5 цветков, тёмно-фиолетового цвета, с жёлтой сердцевинкой, на ощупь напоминают бархат (Рис. 2). Трубка у околоцветника зелёного цвета, по форме цилиндрическая, до 2 см. в длину. Цветёт в

середине – конце лета. Плод – коробочка с выпуклыми сторонами и выемчатыми рёбрами. Произрастает на пойменных лугах, долинах рек, на разнотравно-злаковых лугах. Является вымирающим видом. Занесён в Красную книгу России. Исчезает в связи с выпасом скота, сбором на букеты [7].

Ирис сибирский (*Iris sibirica* L.)



Рисунок 3. Ирис сибирский (*Iris sibirica* L.)

Многолетнее травянистое растение с толстым ползучим корневищем. Стебель прямостоячий высотой до 80 см. Соцветие из 2-3 цветков на верхушке стебля; цветки крупные, с короткой колокольчатой трубкой и шестью продолговатыми темно-синими долями (Рис. 3). Плод – коробочка, удлинённая, продолговато-овальная, тупотрёхгранная. Обитает на сырых и заболоченных лугах, окраинах болот. Сибирские ирисы требуют минимального ухода и являются одними из самых выносливых многолетних

растений. Цветет в мае – июне, плодоносит в июле – августе. Основные факторы угрозы: антропогенные: осушительная мелиорация, хозяйственная трансформация земель, чрезмерные выпас скота и рекреационные нагрузки (сбор цветущих растений, вытаптывание). Природные: высокая сомкнутость крон древесно-кустарникового яруса, высокая задернованность мест обитания. Вид занесён в Красную книгу Пензенской области [8].

Ирис солелюбивый (*Iris halophile* Pall.)



Рисунок 4. Ирис солелюбивый (*Iris halophile* Pall.)

Это травянистый корневищный поликарпик. Высота растения – 70-100 см. Корневище толстое, ползучее. Стебли прямостоячие, не имеющие ветвей. Прикорневые листья ланцетно-линейные, почти мечевидные, превышают стебель, до 12 мм шириной. Листья стебля меньше по размеру и количеству. Листочки обертки острые, ланцетные. Цветки ярко-желтого цвета, собраны по 3-4 на верхушках стеблей, состоят из трубки и шести лопастей венчика (Рис. 4). Трубка околоцветника по длине как завязь. Наружные доли

околоцветника по форме эллиптические, переходят в ноготок; внутренние – прямостоячие. Тычинок 3. Завязь с 6 ребрами и носиком. Плоды – шерстисто-ребристые коробочки. Распространён на юго-востоке Европы, на Северном Кавказе, в Западной Сибири, в Средней Азии. Обитает на сыроватых и солонцеватых лугах, солончаках, по солонцеватым степным и прибрежным лугам, среди солончаковатых чиевников. Лимитирующие факторы: распашка пойм и выпас скота, ограниченное число местообитаний, пригодных для произрастания; мероприятия по улучшению засоленных почв; сбор растений на букеты. Занесён в Красную книгу Пензенской области [8].

Все манипуляции с семенами и эксплантами (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводились в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами.

Экспланты культивировали в асептических условиях на питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением ауксина (0,5-2 мг/л) и гиббереллина ГА3 (2 мг/л), содержание сахарозы – 20 г/л, глюкозы – 20 г/л [1].

Растения выращивали в тепличных условиях при разном спектральном освещении (Рис. 5). Опыты проводили в 2-3 кратной повторности. Анализировали по 10-15 растений.



Рисунок 5. Теплица

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения эксперимента мы выбрали три вида ирисов: мечевидный, солелюбивый и сибирский.

Перед проращиванием семян ирисов их нужно было простерилизовать, чтобы исключить размножение бактериальных и грибковых культур в культуре *in vitro*. Основными стерилизующими агентами в наших опытах служили растворы перманганата калия 1%, перекиси водорода 3% и этилового спирта 70 % [3].

Для снижения повреждающего эффекта этилового спирта на семена и растительные экспланты мы уменьшили его концентрацию до 70 %.

Если использовать для стерилизации только 70 % раствор этилового спирта или только 3 % раствор пероксида водорода, то зараженность растительных объектов могла достигать 75 %. Заражение происходило от растительного материала (Рис. 6). Заражающим объектом была грибная микрофлора.



Рисунок 6. Семена ирисов, заражённые грибной микрофлорой

Поэтому мы стали использовать последовательную стерилизацию тремя препаратами. Нами была выбрана следующая схема стерилизации семян ирисов: 1% раствор $KMnO_4$ (15 минут) → 3% раствор H_2O_2 (7 минут) → 70% раствор этилового спирта (3 минуты) (Рис. 7).



Рисунок 7. Стерилизация семян

После выдерживания в дезинфицирующих растворах семена промывали дистиллированной водой и помещали на чашки Петри для дальнейшего проращивания.

Опыт заложили 14 сентября 2020 года. К 28 сентября семена проросли, но в чашках Петри были следы грибной микрофлоры, поэтому опыт был повторён (Рис. 6). 14 октября семена проросли и были готовы для пересадки на питательную среду.

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводили в стерильных условиях в ламинар-боксе (Рис. 8), стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. В случае нарушения стерильности на средах развивались микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Все поверхности ламинара обрабатывали 96% спиртом, простерилизованные инструменты, материалы, растительный материал

помещали на стол бокса и включали перед работой ультрафиолетовое излучение и биофильтры на 1 час 45 минут. Для работы в ламинар-боксе надевали стерильный халат, руки обрабатывали 96 % спиртом или 0,05 % раствором хлоргексидинабиглюконата. Пинцеты, скальпели и препарировальные иглы, микробиологические петли и лезвия помещали в стакан с 96 % спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигали на пламени спиртовки и остужали.



Рисунок 8. Ламинар-бокс гигиенической безопасности (LAMSYSTEMS, класс II / тип A)

Стерилизация питательной среды осуществлялась в автоклаве (Рис. 9) при температуре 123 °С и давлении 1 атм. в течение 40 мин. Выше температуру использовать нельзя, т. к. при этом разрушаются фитогормоны. Уменьшение времени стерилизации до 30 минут приводило к тому, что часть пробирок с питательной средой оказывалась зараженной еще до посадки объекта.



*Рисунок 9. Автоклав Tuttnauer 2540 ML, AUTOCLAVE – STEAM
STERILIZER*

Стерилизацию эксплантов (зародышей растений) проводили в асептических условиях. Изначально была проведена поверхностная стерилизация. Семена, из которых был извлечен зародыш, обрабатывали раствором пероксида водорода (3%) и снимали семенную кожуру. Затем зародыши в стерильных условиях последовательно обрабатывали следующими дезинфицирующими растворами: 1% раствором перманганата калия и перекисью водорода по 1 мин. Далее пересаживали экспланты на питательную среду.

Мы установили, что для ирисов удобнее использовать твердые (агаризированные) питательные среды. Приживаемость зародышей приближалась к 100 %. На таких средах удобно производить различные манипуляции с объектами, например, частую пересадку растений. Для длительного культивирования растений питательная среда разливалась в пробирки большого объема (47 мл). Пробирки заполнялись питательной средой на $\frac{1}{4}$ от общего объема [4].

Для культивирования растений мы использовали среду Мурасиге-Скуга (Рис. 10; Табл. 1).



Рисунок 10. Приготовленная питательная среда Мурасиге-Скуга

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы – витамины группы В (В1, В6, В12), РР (никотиновую кислоту), фолиевую кислоту, мезоинозит.

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития – фитогормоны. При культивировании растений мы использовали следующие фитогормоны: гиббереллин ГА3 (2 мг/л) и ауксин (2 мг/л). Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами [2].

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования ирисов.

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-НСl	1 мг/л

Пиридоксин-НСl	1 мг/л
Витамин В ₁₂	0,015 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Аденин	40 мг/л
ПантотенатСа	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
рН 5,7-5,8	

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

Проросшие семена в ламинар-боксе мы очистили от кожуры и 16 октября 2020 года посадили зародыши в большие пробирки с питательной средой [3].

Растения росли довольно быстро. Спустя 10 дней побеги ириса мечевидный достигли высоты 6 миллиметров, но в пробирках со средой обнаружили следы бактериальных культур (Рис. 11). Из-за этого растения росли плохо. Заражение могло произойти при пересадке эксплантов в питательную среду.

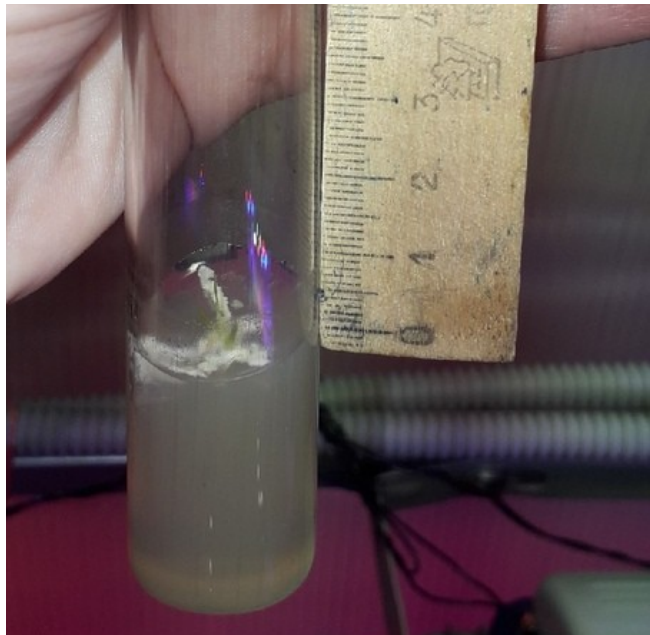


Рисунок 11. Ирис мечевидный

После 5 дней выращивания побеги ириса сибирский достигли 45 миллиметров в высоту (Рис. 12).



Рисунок 12. Ирис сибирский

После 33 дней выращивания ирисов вида солелюбивый высота их побегов составила 80 миллиметров (Рис. 13).



Рисунок 13. Ирис солелюбивый

В 70 % случаев пробирки со средой не были заражены бактериями или грибной микрофлорой. Но в некоторых пробирках (30 % от общего числа) мы наблюдали розовые и белые пятна, что свидетельствовало о наличии в пробирках бактериальных культур. Заражение питательной среды могло произойти при посадке зародышей в пробирки.

На интенсивный рост растений влияли многие факторы:

- в состав питательной среды входят различные соли, витамины, кислоты, которые создают растениям комфортные условия для питания и развития;
- в состав питательной среды входят фитогормоны, такие как ауксин (0,5-2 мг/л) и гиббереллин ГА3 (2 мг/л), которые вызывают резкое ускорение роста зелёной массы растений;
- растения выращивались в тепличных условиях под действием разного спектрального освещения, что благоприятно сказывается на росте и развитии растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время одной из приоритетных проблем биологии является сохранение исчезающих видов животных и растений. В данной работе были рассмотрены растения рода *Iris* L., занесенные в Красную книгу РФ и Красную книгу Пензенской области.

Целенаправленное разведение этих видов в культуре способствует созданию резервных фондов растений с целью их дальнейшей реинтродукции в естественные места обитания и является, таким образом, наиболее надежным способом сохранения *ex-situ*. Кроме того, введение в культуру редких видов, имеющих хозяйственное значение и в силу этого особенно подвергающихся истреблению (пищевые, лекарственные, декоративные растения), позволит существенно снизить антропогенное воздействие на их природные популяции и эффективно сохранить эти виды в естественных ценозах.

Культивирование растений в условиях *in vitro* является одним из ведущих методов восстановления видового разнообразия исчезающих видов. Данный метод позволяет в короткие сроки получить большое количество посевного материала, способствующего восстановлению популяции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабилова, А. В. Растение как объект биотехнологии / А. В. Бабилова, Т. Ю. Горпенченко, Ю. Н. Журавлев // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. LV. – С. 184-211.
2. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Викторов, Д. П. Практикум по физиологии растений / Д. П. Викторов. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. – 160 с.
4. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учеб. пособие / Составители: И. К. Сорокина, Н. И. Старичкова, Т. Б. Решетникова, Н. А. Гринь. – Саратов: Изд-во СГУ им.Н. Г. Чернышевского, 2002. – 45 с.
5. Широков, А. И. Основы биотехнологии растений: Электронное учебно-методическое пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
6. Ботанический сад [Офиц. сайт]. URL: <https://botsad.pnzgu.ru>. (Дата обращения: 21.11.2020).
7. Красная книга РФ. Растения. URL: <https://redbookrf.ru/rasteniya> (Дата обращения: 2.12.2020).
8. Растения Пензенской области. URL: <https://penza-flora.okis.ru/kkpo.html> (Дата обращения: 2.12.2020)
9. Энциклопедия декоративных садовых растений [Офиц. сайт]. URL: <http://www.packagile.ru/lukov/belamcanda.html> (Дата обращения: 17.11.2020).

Рецензия на работу «Редкие виды ирисов в Пензенском ботаническом саду им. И.И.Спрыгина»

**Автор: учащаяся 9 класса МБОУ «Гимназия № 53» г. Пензы
Богослова Варвара**

Работа Богословой Варвары посвящена актуальной теме изучения особенности культивирования ирисов в условиях *in vitro* для дальнейшего роста численности редких видов.

В Пензе есть ботанический сад им. И.И. Спрыгина. В коллекции этого сада находятся такие виды рода *Iris* L, которые занесены в Красную книгу Пензенской области. Данные виды обладают статусом уязвимых. Исследования биологии этих видов весьма актуально и является необходимым условием для размножения этих растений.

Практическая часть была посвящена изучению ирисов в Ботаническом саду им. И.И.Спрыгина, типов покоя семян растений данного рода, исследованию особенностей процессов прорастания семян рода *Iris* L.

На мой взгляд, рецензируемая работа является законченной и имеет хорошие перспективы для дальнейшего развития. Несомненно, работа может быть представлена на научно-практической конференции школьников г. Пенза.

Руководитель МО учителей
естественного цикла МБОУ
«Гимназия №53»

Подпись В.Ю.Туровцевой заверяю директор гимназии

Туровцева В.Ю.

Р.В.Наумова

