

УДК [576.5 + 576.316]:582.572.7

## ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН *IRIS ATTICA* BOISS. & HELDR. ТА *IRIS PSEUDOPUMILA* TINEO

М. О. ТВАРДОВСЬКА, І. О. АНДРЕЄВ, В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
 Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150  
 e-mail: maryana.tvardovska@gmail.com

**Мета.** Підбір умов для введення в культуру *in vitro* двох видів півників — *Iris attica* та *I. pseudopumila* для отримання асептичних проростків з наступною реінтродукцією в природне середовище, а також цитогенетичний аналіз отриманих рослин. **Методи.** Висадження *in vitro* насіння, отримання рослин *in vitro*. Цитогенетичний аналіз клітин кореневої меристеми, визначення хромосомного числа у метафазах мітозів, проведення анафазного аналізу. **Результати.** Введено в культуру *in vitro* рослини *I. attica* та *I. pseudopumila*. Отримано асептичні проростки, які активно росли на середовищі МС/2 без фітогормонів. Проведені експерименти з адаптації досліджених видів до умов закритого ґрунту виявили високий рівень приживання рослин. Встановлено хромосомне число  $2n = 16$  для рослин обох видів — *I. attica* та *I. pseudopumila*. Рослини характеризувалися міксоплоїдією, рівень якої для *I. pseudopumila* становив 10,9 %, а для *I. attica* — 30,4 %. Анафазний аналіз виявив 2,6 % клітин з хромосомними порушеннями у клітинах корінців проростків *I. pseudopumila*, у *I. attica* хромосомних перебудов не виявлено. **Висновки.** Підібрано умови введення в культуру *in vitro* півників *I. attica* та *I. pseudopumila*, а також отримання асептичних проростків з високим рівнем приживання у закритому ґрунті. Для отриманих рослин цих видів встановлено хромосомне число  $2n = 16$ . В апікальній меристемі корінців проростків виявлено міксоплоїдію, рівень якої у зразках *I. attica* втричі перевищує такий у рослин *I. pseudopumila*.

**Ключові слова:** *I. attica* Boiss. & Heldr., *I. pseudopumila* Tineo, асептичні проростки, анафазні аберації, міксоплоїдія.

**Вступ.** Півники відносять до числа найпопулярніших у квітникарстві травянистих багаторічників. Рід *Iris* L. налічує понад 300 видів, поширених у помірній і частково в субтропічній зонах усіх континентів Північної півкулі (Сикура, Шиша, 2010). Світовий сучасний асортимент культури включає більше 80000 культиварів, переважно гібридного походження, більша частина яких відноситься до бородатих півників (Lankow, 2009). Предковими формами для їхньої селекції були дикорослі види роду *Iris*, більшість з яких сьогодні знаходяться під загрозою знищення.

Садові бородаті півники найскладніші для класифікації, оскільки відрізняються широкою варіабельністю генотипових і фенотипових характеристик культиварів, що обумовлено їх складним полігібридним походженням. Цитогенетичне вивчення дозволяє визначити можливі шляхи формування сучасного асортименту даної культури, ступінь відмінностей культиварів з різних садових груп за числом та морфометричними параметрами хромосом. Дослідження каріотипів рослин дозволяє встановити спорідненість досліджуваного виду до інших, подібність каріотипів певною мірою дозволяє скласти уявлення про еволюцію виду (Бадаєва, Салина, 2013). Вивчаючи морфологію хромосом, можна розпізнати хромосомні комплекси одних видів у складі інших, більш складних поліплоїдних наборів. Також помічено, що каріотипи видів з однаковим числом хромосом відрізняються за розміром та морфологією окремих хромосом.

*I. attica* Boiss. & Heldr — багаторічний вид роду та підроду *Iris*, який походить з Балканських гір Європи та поширений на території Греції, колишньої Югославії, Туреччини та Македонії. *I. attica* часто називають підвидом *I. pumila*, але більшість дослідників класифікують його в окремий вид. Вирощують його як декоративну рослину в регіонах з помірним кліматом.

*I. pseudopumila* Tineo — багаторічник, поширений на території південної Італії, Мальти, а також деяких країн центральної Європи.

На території України поширений тетраплоїдний *I. pumila* ( $2n = 32$ ), який вважають природним гібридом цих двох середземноморських диплоїдних видів — *I. attica* ( $2n = 16$ ) та *I. pseudopumila* ( $2n = 16$ ) (Simonet, 1934; Mitra, 1956). Зокрема, цитогенетичні дослідження показали, що *I. pumila* є амфідиплоїдом (алотетраплоїдом), каріотип якого міг утворитися внаслідок комбінації хромосомних наборів цих видів. Незважаючи на подібність за зовнішнім виглядом, *I. attica* та *I. pseudopumila* відрізняються в таксономічному відношенні.

Дослідження дикорослих видів роду *Iris* та введення їх у культуру має суттєве значення не лише для збагачення асортименту квітничково-декоративних багаторічників, а й для збереження та розширення його біорізноманіття *ex situ* (Мамаєва, 2008). Знання хромосомного числа виду та морфології хромосом важливе для ідентифікації виду та встановлення міжвидових зв'язків. Зважаючи на це, актуальним та перспективним є поновлення природних популяцій видів шляхом реінтродукції в природне середовище посадкового матеріалу, отриманого у великій кількості з використанням культури *in vitro*.

Мета роботи — підбір умов для введення в культуру *in vitro* *I. attica* та *I. pseudopumila* для отримання асептичних проростків з наступною реінтродукцією в природне середовище, а також проведення цитогенетичного аналізу рослин цих видів.

### Матеріали і методи

Проростання насіння. Вихідним матеріалом для дослідження слугувало насіння *I. attica*, зібране на території природного парку Prespe (Греція) та *I. pseudopumila* — з природного парку Raussio (провінція Лечче, Італія).

Висаджування насіння та отримання рослин *in vitro* було проведено згідно з раніше підібраними нами умовами для *I. pumila*, детально описаними в роботі (Твардовська, Кунах, 2013).

Насіння скарифікували. Для індукції проростання його витримували протягом 17–18 год у розчині гіберелової кислоти (ГК<sub>3</sub>) з концентрацією 600 мг/л (Полевой, 1982), потім стерилізували протягом 40 хв. у 15 %-му розчині пероксиду водню та висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2) без фітогормонів. Насіння пророщували на світлі за температури 20–22 °С і відносної вологості повітря 70–80 %. Ефективність проростання насіння визначали як відношення кількості пророслого насіння до загальної кількості насінин.

Отримання рослин *in vitro*. Отримані з насіння асептичні 1-місячні рослини висаджували у скляні посудини об'ємом 250 мл, які містили 30 мл агаризованого живильного середовища МС/2 без фітогормонів. Для кращого вкорінення отриманих проростків деякі рослини перенесли на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК). Згодом, отримані рослини висаджували у закритий ґрунт.

Цитогенетичний аналіз. Цитогенетичний аналіз проводили в клітинах кореневої меристеми проростків довжиною 0,8–1 см. Зразки фіксували у суміші етанол: льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1 протягом 1 доби. Після цього матеріал поміщали в 1 %-ий ацетоорсеїн на 3–7 днів та робили давлені препарати. Каріологічні дослідження проводили за методикою давлених препаратів (Кунах, Левенко, 1975). Визначали число хромосом, їхні морфометричні параметри та тип, а також проводили анафазний аналіз. Аналізували лише метафазні пластинки, в яких можна достовірно підрахувати кількість хромосом.

У роботі використовували мікроскоп «NU-2E Carl Zeiss» із цифровим фотоапаратом «Canon 1000D». Отримані дані опрацьовували статистично (Плохинский, 1970).

### Результати та обговорення

Проростання насіння, отримання рослин *in vitro* *I. attica* та *I. pseudopumila*.

Проведені дослідження виявили, що насіння *I. attica* та *I. pseudopumila* найкраще проростає після холодової (–20 °С) стратифікації протягом 1,5–2 місяців. Оскільки воно оточене твердою насінневою шкіркою, попередня його скарифікація полегшує доступ води та поживних речовин до зародку. Подібні дані були отримані нами раніше для *I. pumila* (Твардовська, Кунах, 2013), а також деякими авторами для багатьох

інших півників (*I. ensata* Thunb., *I. pseudacorus* L., *I. laevigata* Fisch., *I. setosa* Pall. ex Link, *I. sibirica* L., *I. spuria* L., *I. pumila*) (Болденков, 2002; Ветчинкина, 2010).

Після проростання насіння (рис.1а, б), отримані асептичні проростки переносили в скляні посудини об'ємом 250 мл на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л НОК (рис. 1в). Ми не виявили суттєвої залежності темпів росту рос-

лин досліджених видів півників від складу живильного середовища та вмісту в ньому фітогормонів. Для інших півників, наприклад, для *I. sibirica* виявлено залежність темпів росту рослин від фітогормонального складу середовища, для *I. pseudacorus* відмічено високі темпи росту на середовищі без фітогормонів (Маркова, 2011).

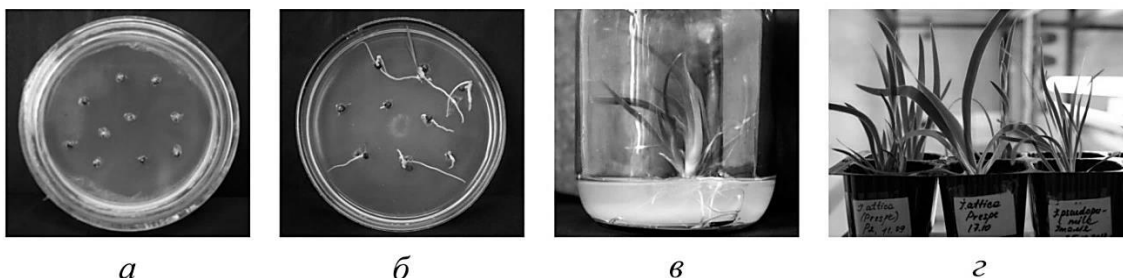


Рис. 1. Отримання рослин *in vitro* *I. attica* та *I. pseudopumila*, а також перенесення їх у закритий ґрунт: а — висаджене насіння; б — проростання насіння; в — рослина *in vitro*; г — рослина в умовах закритого ґрунту.

Отримані *in vitro* рослини висотою 9–11 см були висаджені в ґрунт в умовах теплиці (рис.1г). Тривалість адаптації рослин до зниження вологості та нестерильного субстрату становила в середньому 2–3 тижні. Рослини добре приживалися при перенесенні їх у закритий ґрунт.

Формування повноцінної рослини з розвинутою кореневою системою і надземним пагоном із 2–3 листків відбувалося протягом 30–40 днів з моменту висадження насіння в умови *in vitro*. Схожі результати отримано при введенні в асептичні умови *I. pumila* (рослини формувалися протягом місяця) (Твардовська, Кунах, 2013), *I. pseudacorus* (протягом 15–30 днів) та *I. sibirica* (протягом 30–40 днів) (Маркова, 2011).

За зовнішнім виглядом отримані рослини *I. attica* та *I. pseudopumila* дуже подібні між собою, хоча в таксономічному відношенні вони різні.

#### Цитогенетичний аналіз.

Проведений цитогенетичний аналіз рослин *I. attica* та *I. pseudopumila* показав, що для цих видів диплоїдний набір хромосом становить  $2n = 16$ , що складається з 8 пар хромосом розміром 7–14 мкм. Загальний вигляд клітин апікальної меристеми кореня показано на рисунку 2. Типові метафазні пластинки досліджених видів наведено на рис. 3 та рис. 4. Хромосомне число  $2n = 16$  було визначене й іншими авторами при дослідженні *I. attica* з території Греції (Randolph, Mitra, 1959) та *I. pseudopumila* з території Італії, Югославії та Сицилії (Randolph, Mitra, 1959).

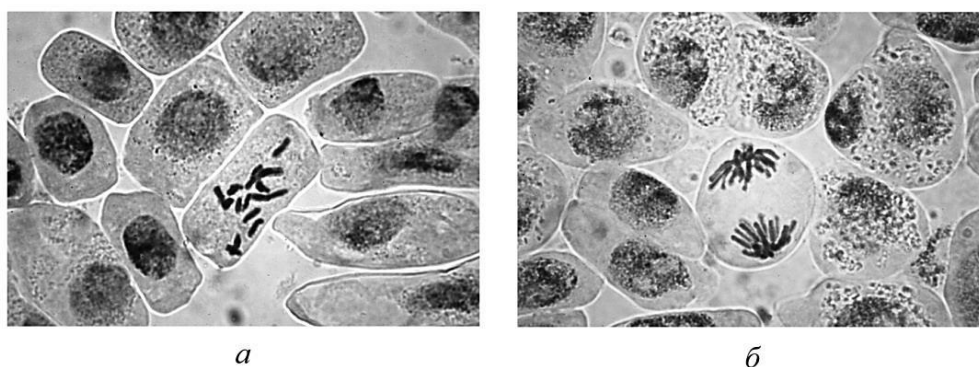


Рис. 2. Загальний вигляд під мікроскопом клітин апікальної меристеми кореня *I. attica* (а) та *I. pseudopumila* (б).

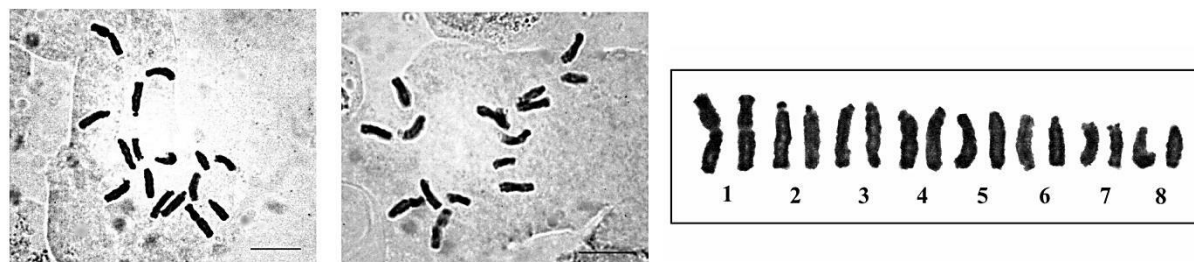


Рис. 3. Метафазні пластинки, які містять 16 хромосом, у клітинах апікальної меристеми корінців проростків *I. attica* та ідіограма хромосом цього виду. Довжина відрізка становить 10 мкм.



Рис. 4. Метафазні пластинки, які містять 16 хромосом, у клітинах апікальної меристеми корінців проростків *I. pseudopumila* та ідіограма хромосом цього виду. Довжина відрізка становить 10 мкм.

Більшість хромосом у каріотипах цих видів є акроцентричними. Як видно із наведених результатів, каріотипи *I. attica* та *I. pseudopumila* мають по 1 парі метацентричних хромосом, а також по три пари хромосом із супутниками. Решта хромосом цих видів акроцентричні. Подібні результати були отримані й іншими дослідниками при каріологічному вивченні цих видів (Randolph, Mitra, 1959). Так, автори показали, що їхні каріотипи легко можна розрізнити, оскільки довгі хромосоми в *I. attica* — субметацентричні, а в *I. pseudopumila* — метацентричні.

Проведений нами цитогенетичний аналіз показав, що модальним класом в усіх проаналі-

зованих генотипах *I. attica* та *I. pseudopumila* були диплоїдні клітини ( $2n = 16$ ). Усі досліджені рослини *I. attica* виявилися міксоплоїдними. Так, серед 15 проаналізованих корінців однієї рослини *I. attica* 6 були міксоплоїдними (табл.). Окрім диплоїдних клітин, в апікальній меристемі виявлено гаплоїдні клітини, які містили 8, а також анеуплоїдні клітини, які мали 10, 12 та 14 хромосом. Серед 8 проаналізованих корінців другої рослини *I. attica* лише один був міксоплоїдним. Разом із диплоїдними клітинами, було знайдено клітину з 32 хромосомами, що відповідає тетраплоїдному набору цього виду.

Таблиця. Кількість хромосом у клітинах кінчиках корінців асептичних проростків *I. attica* та *I. pseudopumila*

Вид	Проаналізовані рослини	Кількість досліджених корінців	Проаналізовані метафази, шт	Виявлені числа хромосом*	Модальне число хромосом
<i>I. attica</i>	№ 1	15	10	8(2), 12(5), 16(3)	12
			5	10(1), 12(2), 16(2)	12, 16
			26	8(1), 10(1), 12(11), 14(7), 16(6)	12
			8	8(2), 12(4), 14(1), 16(1)	12



Введення в культуру *in vitro* та цитогенетичний аналіз рослин *Iris attica* Boiss. & Heldr. та *Iris...*

Вид	Проаналізовані рослини	Кількість досліджених корінців	Проаналізовані метафази, шт	Виявлені числа хромосом*	Модальне число хромосом
			5	10(1), 12(2), 16(2)	12, 16
			9	8(3), 10(1), 12(3), 16(2)	8, 12
			39	16	16
			2	16	16
			34	16	16
			7	16	16
			3	16	16
			3	16	16
			28	16	16
			3	16	16
	2	16	16		
	№ 2	8	6	16 (5), 32 (1)	16
			3	16	16
			2	16	16
			3	16	16
			4	16	16
			2	16	16
			3	16	16
2			16	16	
<i>I. pseudo-pumila</i>	№ 1	9	3	16	16
			10	16	16
			3	16	16
			6	16	16
			1	16	16
			4	16	16
			2	16	16
			10	16	16
	№ 2	6	28	16	16
			3	16	16
			11	16	16
			6	16	16
			3	16	16
			3	16	16
	№ 3	4	13	16 (12), 24(1)	16
			20	16 (18), 28(1), 30(1)	16
			3	16	16
			7	16	16
	№ 4	4	8	16 (7), 20 (1)	16
			3	16	16
			10	16	16
			5	16	16
	№ 5	4	2	16	16
			5	16	16
			5	16	16
			3	16	16
	№ 6	5	10	16	16
			3	16	16
			6	16	16
			3	16	16
			2	16	16
	№ 7	4	2	16	16
3			16	16	

Вид	Проаналізовані рослини	Кількість досліджених корінців	Проаналізовані метафази, шт	Виявлені числа хромосом*	Модальне число хромосом
			1	16	16
			4	16	16
	№ 8	3	4	16 (3), 22 (1)	16
			4	16 (3), 22 (1)	16
			6	16	16
	№ 9	3	7	16	16
			3	16	16
			4	16	16
	№ 10	4	6	16	16
			5	16	16
			2	16	16
			6	16	16

\*Примітка. У дужках вказано кількість метафаз із даним числом хромосом.

У *I. pseudopumila* міксоплоїдію виявлено в трьох із десяти вивчених рослин. Окрім клітин з 16 хромосомами, у них знайдено анеуплоїдні клітини (мали 20, 22, 24, 28 та 30 хромосом). Слід відмітити, що анеуплоїдні клітини *I. attica* містили гіподиплоїдний, тоді як *I. pseudopumila* — гіпердиплоїдний набір хромосом.

Рівень міксоплоїдії для досліджених зразків *I. attica* становив 30,4 %, тоді як для *I. pseudopumila* цей показник був значно нижчим — 10,9 %. Цитогенетичний аналіз *I. pumila*, проведений нами раніше, показав, що у рослин з усіх досліджених локалітетів рівень міксоплоїдії був високим — 60–80 % (Twardovska et al., 2015). Подібне явище було виявлене й іншими дослідниками при проведенні цитогенетичного аналізу клітин апікальної меристеми корінців *I. pumila*, *I. setosa*, *I. ensata*, *I. oxypetata*, *I. pseudacorus*, *I. laevigata* (Козыренко и др., 2002). Число хромосом у цих видів коливалося від 6 до 60, при цьому переважали клітини з диплоїдним набором хромосом (35–60 %). Частка клітин з числом хромосом, відмінним від диплоїдного набору та рівень їх плоїдності були різними. Клітинні популяції калюсних культур зазначених вище видів роду *Iris* характеризувалися високою частотою анеуплоїдних клітин (28–54%) (Козыренко и др., 2002).

Явище міксоплоїдії описане і для багатьох інших видів рослин, зокрема, для *Plukenetia volubilis* L. (Cai et al., 2013), *Santalum album* L. (Zhang et al., 2010), багатьох видів *Brassicaceae* (Snowdon, 2007; Kunakh et al., 2008; Ockendon, 2008), для видів роду *Morus* L. (Su et al., 2000), *Bromus* L. (Joachimiak et al., 2001). У меристе-

мах різних видів рослин частка клітин з кількістю хромосом, відмінною від диплоїдного набору, може сягати 77 %.

Вважають, що міксоплоїдія може підвищувати адаптивний потенціал рослин (Кунах, 2005; Кунах, 2011). Відомо, що особини з різним числом хромосом, які спонтанно виникають у популяціях, забезпечують генетичний матеріал для виникнення нових форм, рас та навіть видів. Зміну числа хромосом (міксоплоїдію, анеуплоїдію, поліплоїдію) розглядають також як один із факторів еволюції рослин.

Анафазний аналіз, проведений паралельно із підрахунком числа хромосом, показав низький рівень аберацій у досліджених видах. Усі 355 знайдених анафаз у клітинах корінців *I. attica* були нормальними. 2 із 77 досліджених анафаз у клітинах апікальної меристеми *I. pseudopumila* були абераційними. Одна анафаза перестроєна була у вигляді кільцевої хромосоми, а інша — трьохполюсного мітозу. Анафазний аналіз клітин апікальної меристеми корінців проростків *I. pumila* показав високий для інтактних рослин рівень аберацій, який у деяких досліджених популяціях становив 9,2 % (Twardovska et al., 2015). Як відомо з літератури, рівень спонтанних анафазних аберацій хромосом в інтактних рослинах в нормі зрідка перевищує 1 % (Кунах, 2005).

Таким чином, нами відпрацьовано умови введення в культуру *in vitro* *I. attica* та *I. pseudopumila*. Показано високу ефективність проростання насіння за умов його попередньої холодової стратифікації, а також висадки скарифико-

ваного насіння на живильне середовище МС/2 без фітогормонів, яке також забезпечувало активний ріст отриманих асептичних проростків. При адаптації рослин до умов закритого ґрунту отримані рослини характеризувалися високим рівнем приживання.

У результаті проведеного цитогенетичного аналізу встановлено хромосомне число  $2n = 16$  для рослин *I. attica* та *I. pseudopumila*. Модальним класом в усіх проаналізованих генотипах були диплоїдні клітини. Виявлено міксоплоїдію, рівень якої серед досліджених зразків був нижчим для *I. pseudopumila* — 10,9 %, тоді як для *I. attica* цей показник становив 30,4 %. У зразках *I. pseudopumila* відсоток хромосомних порушень був низьким і складав 2,6 %, тоді як у клітинах корінців проростків *I. attica* анафазних перебуток не знайдено. Можна припустити, що причинами виявлених відмінностей між дослідженими зразками можуть бути як вплив генотипу, так і різний тиск антропогенного навантаження та різні кліматичні умови зростання.

### Висновки

Підібрано умови введення в культуру *in vitro* півників *I. attica* та *I. pseudopumila*, а також отримання асептичних проростків з високим рівнем приживання у закритому ґрунті. Встановлено хромосомне число  $2n = 16$  для зазначених видів. Виявлено міксоплоїдію в апікальній меристемі корінців проростків, рівень якої у зразках *I. attica* втричі перевищував такий у рослин *I. pseudopumila*. Встановлено відмінності між дослідженими видами за часткою анеуплоїдних клітин та рівнем анафазних аберацій, причиною яких може бути вплив як генотипу, так і особливостей умов зростання.

### Подяки

Автори висловлюють глибоку вдячність пану Панкраціо Кампанья (Pancrazio Camagna) за зібране і надіслане ним насіння *I. pseudopumila*, а також д-ру Анні Цвенер за передані гербарні зразки та насіння *I. attica*.

### Перелік літератури

1. Бадаева Е. Д., Салина Е. А. Структура генома и хромосомный анализ растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1017–1042.
2. Болденков Е. В. Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов

- рода *Iris* L. (*Iridaceae*) для использования в биотехнологии: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2002. 229 с.
3. Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2010. 170 с.
4. Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Лауве Л. С., Болтенков Е. В. Анализ генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris* L. *Биотехнология*. 2002. № 4. С. 38–48.
5. Кунах В. А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи: монографія. Київ: Логос, 2005. 730 с.
6. Кунах В. А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Жебраковские чтения III. Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. Отв. ред. А. В. Кильчевский. Минск. 2011. 56 с.
7. Кунах В. А., Левенко Б. А. Модификация метода давленных препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений. *Цитология и генетика*. 1975. Т. 9, № 1. С. 56–60.
8. Мамаева Н. А. Сравнительный анализ морфологических и биологических признаков сортов садовых бородатых ирисов (секция *Iris* рода *Iris* L.): дис. ...канд. биол. наук. Москва, 2008. 152 с.
9. Маркова Е. М. Особенности размножения видов *Iris sibirica* L. и *Iris pseudacorus* L. в культуре *in vitro*. *Iris — 2011: материалы 2-го Московского международного симпозиума по ирисовой тематике*. Москва: МАКС Пресс, 2011. С. 194–198.
10. Плохинский Н. А. Биометрия: учебное пособие. Издание 2-е. Москва: Изд-во МГУ. 1970. 367 с.
11. Полевой В. В. Фитогормоны: учебное пособие. Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 248 с.
12. Сикура И. И., Шиша Е. Н. Genus *Iris* L. (*Iridaceae*) — род Касатик, Ирис (Касатиковые). Киев: Знання України, 2010. 195 с.
13. Твардовська М. О., Кунах В. А. Введення в культуру *in vitro* півників низьких (*Iris pumila* L.). *Інтродукція рослин*. 2013. № 3. С. 29–33.
14. Cai Z. Q., Zhang T., Jian H. Y. Chromosome number variation in a promising oilseed woody crop, *Plukenetia volubilis* L. (*Euphorbiaceae*). *Caryologia*. 2013. Vol. 66, No. 1. P. 54–58. doi: 10.1080/00087114.2013.780442.
15. Joachimiak A., Kula A., Sliwinska E., Sobieszczanska A. C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2001. Vol. 43. P. 105–115.
16. Kunakh V. A., Adonin V. I., Ozheredov S. P., Blume Ya. B. Mixoploidy in wild and cultivated species of *Cruciferae* capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. *Cytol. Genet.* 2008. Vol. 42, No. 3. P. 204–209. doi: 10.3103/S0095452708030079.

17. Lankow G. From species irises to a family of bearded irises. March, 2009. URL: <http://www.kcis.org/kciseducation/kcispeciesstobeardeed.html>.
  18. Mitra J. Karyotype analysis of bearded iris. *Bot. Gaz.* 1956. Vol. 117. P. 265–293.
  19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, No. 13. P. 473–497.
  20. Ockendon D. J. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Annals of Applied Biology.* 2008. Vol. 113, No. 2. P. 319–325. doi: 10.1111/j.1744-7348.1988.tb03309.x.
  21. Randolph L. F., Mitra J. Karyotypes of *Iris pumila* and related species. *Am. J. Bot.* 1959. Vol. 46, No. 2. P. 93–102. doi: 10.2307/2439464.
  22. Simonet M. Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les *Iris*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 1934. Vol. 16. P. 229–383.
  23. Snowdon R. J. Cytogenetics and genome analysis in *Brassica* crops. *Chromosome Res.* 2007. Vol. 15. P. 85–95. doi: 10.1007/s10577-006-1105-y.
  24. Su C., Su L. H., Zhu G. Y., Han M. Z. The ways of bringing about and classifications of mixoploid in *Morus* L. *North Sericulture.* 2000. Vol. 21. P. 11–12.
  25. Twardovska M. O., Andreev I. O., Kunakh V. A. Intraspecific chromosomal polymorphism of *Iris pumila* L. from the territory of Ukraine. *Cytol. Genet.* 2015. Vol. 49, No. 5. P. 322–327. doi: 10.3103/S0095452715050096.
  26. Zhang Xin-Hua, Jaime A., Teixeira da Silva, Guo-Hua Ma. Karyotype analysis of *Santalum album* L. *Caryologia.* 2010. Vol. 63, No. 2. P. 142–148. doi: 10.1080/00087114.2010.10589719/
- References**
1. Badaeva E. D., Salina E. A. Структура генома і хромосомний аналіз рослин. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii.* 2013. Vol. 17, No. 4/2. P. 1017–1042. (In Russian).
  2. Boldenkov E. V. Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris* L. (*Iridaceae*) для использования в биотехнологии: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2002. 229 p. (In Russian).
  3. Vetchinkina E. M. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышевых редких видов растений: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2010. 170 p. (In Russian).
  4. Kozyrenko M. M., Artyukova E. V., Lauve L. S., Boltenkov E. V. Genetic variability of callus cultures of some *Iris* species. *Biotechnology in Russia.* 2002. No. 4. P. 30–37. (In Russian).
  5. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 724 p. (In Ukrainian).
  6. Kunakh V. A. Ontogeneticheskaya plastichnost' genoma kak osnova adaptivnosti rasteniy. Zhebrakovskiy chteniya III. Inst. Genetiki i Tsitologii NAN Belarusi. Otv. red. A. V. Kil'chevskiy. Minsk. 2011. 56 p. (In Russian).
  7. Kunakh V. A., Levenko B. A. Модификация метода давлений препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений. *Cytol. Genet. (Tsitologiya i genetika).* 1975. Vol. 9, No.1. P. 56–60. (In Russian).
  8. Mamaeva N. A. Сравнительный анализ морфологических и биологических признаков сортов садовых бородатых ирисов (секция *Iris* рода *Iris* L.): дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2008. 152 p. (In Russian).
  9. Markova E. M. Особенности размножения видов *Iris sibirica* L. и *Iris pseudacorus* L. в культуре *in vitro*. *Iris — 2011: материалы 2-го Московского международного симпозиума по ирисовой тематике.* Москва: MAKS Press, 2011. P. 194–198. (In Russian).
  10. Plokhinskij N. A. Биометрия: учебное пособие. Издание 2-е. Москва: Изд-во МГУ. 1970. 367 p. (In Russian).
  11. Polevoj V. V. Фитогормоны: учебное пособие. Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 248 p. (In Russian).
  12. Sikura I. I., Shisha E. N. Genus *Iris* L. (*Iridaceae*) — род *Kasatik*, *Iris* (*Kasatikovye*). Kiev: Znaniia Ukrainy, 2010. 195 p. (In Russian).
  13. Twardovska M. O., Kunakh V. A. *In vitro* culture initiation of *Iris pumila* L. *Plant introduction.* 2013. No. 3. P. 29–33. (In Ukrainian).
  14. Cai Z. Q., Zhang T., Jian H. Y. Chromosome number variation in a promising oilseed woody crop, *Plukenetia volubilis* L. (*Euphorbiaceae*). *Caryologia.* 2013. Vol. 66, No. 1. P. 54–58. doi: 10.1080/00087114.2013.780442.
  15. Joachimiak A., Kula A., Sliwinska E., Sobieszczanska A. C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2001. Vol. 43. P. 105–115.
  16. Kunakh V. A., Adonin V. I., Ozheredov S. P., Blume Ya. B. Mixoploidy in wild and cultivated species of *Cruciferae* capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. *Cytol. Genet.* 2008. Vol. 42, No. 3. P. 204–209. doi: 10.3103/S0095452708030079).
  17. Lankow G. From species irises to a family of bearded irises. March, 2009. URL: <http://www.kcis.org/kciseducation/kcispeciesstobeardeed.html>.
  18. Mitra J. Karyotype analysis of bearded iris. *Bot. Gaz.* 1956. Vol. 117. P. 265–293.
  19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, No. 13. P. 473–497.
  20. Ockendon D. J. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Annals of Applied Biology.* 2008. Vol. 113,



- No. 2. P. 319–325. doi: 10.1111/j.1744-7348.1988.tb03309.x.
21. Randolph L. F., Mitra J. Karyotypes of *Iris pumila* and related species. *Am. J. Bot.* 1959. Vol. 46, No. 2. P. 93–102. doi: 10.2307/2439464.
  22. Simonet M. Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les *Iris*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 1934. Vol. 16. P. 229–383.
  23. Snowdon R. J. Cytogenetics and genome analysis in *Brassica* crops. *Chromosome Res.* 2007. Vol. 15. P. 85–95. doi: 10.1007/s10577-006-1105-y.
  24. Su C., Su L. H., Zhu G. Y., Han M. Z. The ways of bringing about and classifications of mixoploid in *Morus* L. *North Sericulture.* 2000. Vol. 21. P. 11–12.
  25. Twardovska M. O., Andreev I. O., Kunakh V. A. Intraspecific chromosomal polymorphism of *Iris pumila* L. from the territory of Ukraine. *Cytol. Genet.* 2015. Vol. 49, No. 5. P. 322–327. doi: 10.3103/S0095452715050096.
  26. Zhang Xin-Hua, Jaime A., Teixeira da Silva, Guo-Hua Ma. Karyotype analysis of *Santalum album* L. *Caryologia.* 2010. Vol. 63, No. 2. P. 142–148. doi: 10.1080/00087114.2010.10589719.

Представлено О. В. Дубровною  
Надійшла 23.11.2018

#### INTRODUCTION INTO IN VITRO CULTURE AND CYTOGENETIC ANALYSIS OF *IRIS ATTICA* BOISS. & HELDR. AND *IRIS PSEUDOPUMILA* TINEO PLANTS

M. O. Twardovska, I. O. Andreev, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics  
of the National Academy of Sciences of Ukraine  
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150  
e-mail: maryana.twardovska@gmail.com

**Aim.** The work was aimed at the development of conditions for introduction into *in vitro* culture of two species of irises, *Iris attica* and *I. pseudopumila* to obtain aseptic seedlings with subsequent reintroduction into natural environment, as well as at cytogenetic analysis of the obtained plants. **Methods.** *In vitro* seed germination and seedling cultivation. Cytogenetic analysis of cells of root meristem, determination of chromosome number and morphology in mitotic metaphase plates, anaphase analysis. **Results.** The plants of *I. attica* and *I. pseudopumila* were introduced *in vitro*. Aseptic seedlings were obtained, which were actively growing on MS/2 medium without phytohormones. The experiments on the adaptation of the plants to greenhouse conditions revealed the high survival rate for both species. The chromosome number  $2n = 16$  was established for the obtained plants of both *I. attica* and *I. pseudopumila*. Mixoploidy was detected in root meristem of some of the plants, the incidence of which was 10.9 % for *I. pseudo-*

*pumila* and 30.4 % for *I. attica*. The frequency of cells with chromosomal rearrangements revealed by anaphase analysis in root meristem of *I. pseudopumila* seedlings was 2.6 %; in *I. attica* plants, chromosome aberrations were not detected. **Conclusions.** The plants of *I. attica* and *I. pseudopumila* were introduced into *in vitro* culture, aseptic seedlings were obtained, which showed a high survival level when adapted to greenhouse conditions. Chromosome number  $2n = 16$  was established for the obtained plants of both species. The root apical meristems of the seedlings were found to be mixoploid, with the incidence of mixoploidy in *I. attica* identified as three times higher than in *I. pseudopumila* plants.

**Keywords:** *I. attica* Boiss. & Heldr., *I. pseudopumila* Tineo, aseptic seedlings, mixoploidy, anaphase aberration.