

УДК 582.594.2: 581.143.6

СЕМЕННОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КРЫМСКИХ ВИДОВ ОРХИДЕЙ В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМАМИ ИХ СОХРАНЕНИЯ

Попкова Л.Л., канд. биол. наук, Теплицкая Л.М., канд. биол. наук

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского

Ключевые слова: орхидные, симбиотическое и асимбиотическое размножение, *in vitro*

Введение

Высокая декоративность, своеобразие биологии и экологии представителей семейства Орхидные (Orchidaceae Juss) делают их весьма уязвимыми к антропогенным воздействиям, и не случайно все 47 видов орхидных природной флоры Крыма занесены в Красную книгу Украины [1,2]. Поскольку естественное воспроизводство (от прорастания семени до генеративного состояния) длится 8-12 лет и затруднено из-за тесной зависимости от наличия в биоценозах специфичных опылителей и микоризных грибов, сохранение и восстановление популяций редких видов орхидных в природе возможно с применением методов ускоренного размножения, в том числе в условиях *in vitro*.

Разработка асимбиотического семенного размножения *in vitro* тропических орхидей в начале XX века Бернардом и Бургеффом способствовала их широкому распространению в культуре. Но успехи в семенном размножении орхидных умеренной зоны были достигнуты лишь в последнее время, хотя для многих видов такие методы еще не разработаны [3-7]. Поэтому целью данной работы являлась разработка метода размножения *in vitro* некоторых крымских орхидей симбиотическим и асимбиотическим способом для сохранения редких видов с последующим восстановлением численности популяций в природе.

Материалы и методика

В качестве материала для проведения экспериментов служили семена из раскрывшихся и нераскрывшихся коробочек орхидных, проризрастающих в природных популяциях : *Comperia comperana* (Stev.) Aschers. et Graebn., *Himantoglossum caprinum* (Bieb.) C. Koch, *Ophrys taurica* (Agg.) Nevski, *O. oestrifera* Bieb., *Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb, *Goodyera repens* (L.) R.Br, *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich, *Orchis pallens* L., *O. mascula* (L.) L., *O. purpurea* Huds., *Dactylorhiza romana* (Seb. et Mauri) Soo. Эндомикоризные грибы выделялись из апикальной зоны корней у растений видов *Platanthera chlorantha*, *Orchis mascula* и культивировались методом множественных пассажей по Селиванову [8].

Для стерилизации коробочек с семенами и корней применяли 96%-ный и 70%-ный этиловый спирт, 10%-ный хлорамин, 15%-ная перекись водорода. После этого первичные экспланты помещались на агаризованные питательные среды по общепринятым в биотехнологии методикам [3-4]. Семена культивировались на средах Knudson C, Burgeff, Prasad-Mitra, при температуре 20-25⁰ С с 16 часовым фотопериодом и в термостате, в отсутствие освещения. Корни, а в дальнейшем колонии микоризных грибов культивировались на питательных средах Чапек-Docks и Воас при температуре 22-23⁰ С в термостате.

Наблюдения за изменением состояния эксплантов и субкультивирование колоний микоризных грибов проводились через 5, 10, 20, 40 и 60 суток. Все полученные цифровые экспериментальные данные статистически обрабатывались при помощи пакета прикладных программ Excel для Windows 95.

Результаты исследований

Важной задачей на начальном этапе микроразмножения *in vitro* является получение асептической культуры органов и тканей орхидей, взятых из природных условий. Поскольку поверхностное загрязнение сапрофитными бактериями и спорами грибов подземных органов существенно отличается от надземных, снижение контаминации до 5-10% было достигнуто лишь при ступенчатой стерилизации. Для корней соответственно 70%-ным этанолом (1 мин) и 15%-ной перекисью водорода (15 мин), семена стерилизовали этим же способом или 96%-ным этанолом (1 мин) и 10%-ным хлораминном (15 мин) с трех-четырёх разовой промывкой в стерильной дистиллированной воде после каждого реагента. Очень удобным являлось то, что стериленты были легкодоступными и

мягкими в действии, когда предотвращалась гибель тканей, крайне необходимых для выделения микоризных грибов.

В ходе исследований выявлены оптимальные сроки посева семян для каждого вида орхидных в зависимости от срока их созревания (количества суток с момента опыления). Как видно из таблицы 1 максимальная всхожесть семян наблюдалась при посеве в сроки 40-45 суток для *Anacamptis pyramidalis* и *Platanthera chlorantha*, 45-50 суток - для видов родов *Ophrys*, *Comperia*, 50-55 суток для *Himantoglossum caprinum*. У *Goodyera repens* количество проросших семян в течение всего срока посевов было примерно одинаковым и составляло от 49% до 68%. Из-за отсутствия глубокого покоя у семян данного вида срок посева не играет такой существенной роли.

Таблица 1 - Сравнительная оценка прорастания семян орхидных в условиях *in vitro* в зависимости от срока их созревания и генотипа растения.

Генотип	Количество проросших семян после опыления, %						
	30 сут	35 сут	40 сут	45 сут	50 сут	55 сут	70 сут
<i>Ophrys oestrifera</i>	-	-	5,4±0,3	69,1±2,5	75,1±1,9	10,5±0,5	0
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	0	8,1±1,0	53,2±2,4	62,1±1,8	5,8±0,1	0	0
<i>Platanthera chlorantha</i>	0	34,2±1,8	45,1±1,9	54,1±1,3	35,9±1,0	5,2±0,2	0
<i>Goodyera repens</i>	56,1	63,2±1,9	67,5±1,8	68,9±0,5	66,7±1,3	64,3±1,0	49
<i>Comperia comperana</i>	-	-	-	4,2±0,1	8,5±0,5	2,1±0,1	0
<i>Himantoglossum caprinum</i>	-	-	0	0	0,5±0,1	1,2±0,1	0

С целью подбора оптимальной питательной среды нами испытано три состава сред, рекомендуемых для культивирования тканей и органов культурных видов орхидных в промышленном цветоводстве: Knudson C; Burgeff; Prasad, Mitra. Наилучшей средой оказалась питательная среда Knudson C, дополненная 0,1%-ным гуматом калия. Отмечали также прорастание семян и образование протокормов на среде Knudson C без гумата (контроль). Однако в первом случае количество проросших семян и сформировавшихся протокормов достигало 50-75%, в то время как в контроле оно не превышало 10-15% (табл. 2). Исключением являлся вид *Goodyera repens*, для которого было характерно обильное прорастание (70-90%) на всех испытанных средах. Следует отметить, что всхожесть семян исследуемых видов орхидей в природе составляет всего 5%.

Таблица 2 - Интенсивность прорастания семян и формирования протокормов дикорастущих видов орхидей на различных питательных средах

Питательная среда	Количество проросших семян и сформировавшихся протокормов, %					
	<i>Ophrys oestrifera</i>	<i>Ophrys taurica</i>	<i>Platanthera chlorantha</i>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	<i>Comperia comperana</i>	<i>Himantoglossum caprinum</i>
Knudson C (контроль)	10,5±1,3	5,8±0,9	4,9±1,2	6,7±1,1	1,0±0,1	0,5±0,1
Knudson C + 2,32 мкМ кинетина + 2,46 мкМ ИУК	5,9±2,1	7,0±1,4	25,1±1,1	24,2±2,1	2,0±0,5	0
Knudson C + 0,1% гумата калия	75,1±4,2	53,4±2,8	55,8±1,9	55,0±3,1	8,1±0,4	1,0±0,1
Burgeff	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±1,0	0	0
Prasad, Mitra	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±1,0	1,0±1,0	0	0

Сроки прорастания семян и формирования первых протокормов исследуемых видов составляли 30-45 суток у *Goodyera repens*, 40-55 суток у *Platanthera chlorantha*, 45-60 суток у *Anacamptis pyramidalis*, 48-75 суток у *Ophrys oestrifera* и *Ophrys taurica* и свыше 85-150 суток у видов *Orchis pallens*, *O. mascula*, *O. purpurea*, *Dactylorhiza romana*, *Comperia comperana*, *Himantoglossum caprinum*. Хотя при посеве зрелых семян из раскрывшихся коробочек у всех видов срок прорастания увеличивался до 8-15 месяцев. Поэтому с целью изучения влияния изолированной культуры эндомикоризного гриба на процесс стимуляции прорастания высаженные зрелые семена инокулировали микоризным грибом, выделенным из корней *Orchis mascula*. Из данных, представленных в таблице 3 видно, что сроки прорастания семян сокращались в 1,5-2 раза (табл. 3). При этом формировались протокормы, но растения из них нами не были получены (исследования продолжаются).

Таблица 3 - Влияние инокулята микоризного гриба на сроки прорастания зрелых семян некоторых орхидных

Питательная среда	Сроки прорастания зрелых семян, сут		
	<i>Orchis mascula</i>	<i>Platanthera chlorantha</i>	<i>Dactylorhiza romana</i>
Knudson C (контроль)	275,1±2,4	161,8±2,1	145,2±4,5
Knudson C + 0,1% гумата калия	250,2±1,9	180,1±4,2	125,8±1,1
Knudson C + инокулят	156,7±3,1	81,9±0,1	86,0±2,4

гриба			
-------	--	--	--

Однако в асимбиотической культуре при посеве в оптимальные сроки удавалось получить полноценные растения за 1-1,5 года у быстро прорастиваемых видов *Ophrys taurica*, *O. oestrifera*, *Platanthera chlorantha*, *Goodyera repens*, *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylohriza romana*. Существенными преимуществами асимбиотического способа семенного размножения орхидных по сравнению с симбиотическим являются простота, надежность, контролируемость и воспроизводимость результатов, отсутствие проблем с поддержанием культур симбиотических грибов и колебаниями их активности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что решающими факторами успешного асимбиотического семенного размножения крымских видов орхидных являются видоспецифичный оптимальный срок посева и состав питательной среды. Симбиотическое размножение (инокулирование на питательной среде семян микоризным грибом) оказалось эффективным для труднопрорастиваемых зрелых семян, когда срок их прорастания сокращался в 1,5-2 раза.

Литература

1. Червона книга України: Рослинний світ. Відп. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко.- К.: "Українська енциклопедія" им. М.П. Бажана, 1996.- С. 336 - 403.
2. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма. - Ялта, второе издание, 1996.- 86 с.
3. Arditti J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture // *Orchid Biology. Rev. and Persp.*-1977.- V. 1.- № 5,6.- P. 159-175.
4. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре .- Киев: Наукова думка, 1986.- 197 с.
5. Fast G. Orchid seed germination and seedling culture a manual: European terrestrial orchids (symbiotic and asymbiotic methods) // J.Arditti ed *Orchid biology-reviews and perspectives*. N.Y., 1982.- Vol.2.- P.309-326.
6. Куликов П.В. Экология и репродуктивные особенности редких орхидных Урала // Автореф. дисс. ...канд. биол. наук.-Екатеринбург.-1995.- 24 с.
7. Попкова Л.Л. Редкие виды орхидных флоры Крыма, их микроразмножение и поддержание биологического разнообразия // Автореф. дисс. ...канд. биол. наук.-Ялта.- 1999.- 17 с.

8. Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. - М.: Наука, 1981. - 231 с.