

УДК 504.73:502.75:57.085

Редкие виды орхидей умеренной зоны и современные методы их эффективного сохранения в искусственных условиях

Шейко Е. А.

Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование биотехнологических методов. Данная работа посвящена разработке и совершенствованию методов культуры изолированных тканей и органов редких видов орхидных для использования в системе сохранения и воспроизводства растительных ресурсов. В результате проведенных исследований были получены каллусные культуры генеративных органов *Himantoglossum caprinum* (Bieb.) C. Koch и *Ophrys oestriifera* M. Bieb. Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов вегетативных и генеративных органов орхидных и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микроклонального размножения этих видов.

Ключевые слова: *Orchidaceae*, культура *in vitro*, эксплант, каллусогенез, фитогормоны.

Orchids rare of temperate zone and modern methods of their effective preservation in artificial conditions

Sheyko E. A.

Along with the traditional techniques of plant preservation *ex situ* biotechnological methods used for these purposes are becoming more and more important. These work investigations dealt with the development and improvement of the methods of isolated rare and disappearing orchid tissue culture in order to apply them in the system of plant resources preservation and procreation. As a result there were obtained callus cultures of generative organs of *Himantoglossum caprinum* (Bieb.) C. Koch и *Ophrys oestriifera* M. Bieb. For the first time there was found the interrelation between the callusogenesis from explants of orchid vegetative and generative organs and ratio of the phytohormonal complex components at the specific stages of the ontogenesis that must be taken into account during the development of methods of these species microclonal reproduction.

Keywords: *Orchidaceae, culture in vitro, explants, callusogenesis, phytohormones.*

Введение

Все представители семейства *Orchidaceae* Juss включены в Красную книгу Украины, а отдельные виды — в Международные документы по охране окружающей среды [1; 6]. Редкость орхидей и сокращающаяся их численность обусловлены как влиянием природных факторов (отсутствием в биотопе грибов-микоризообразователей и специфических насекомых-опылителей), так и антропогенным воздействием.

Вегетативный способ размножения орхидей хорошо известен и широко используется в практике цветоводства. С целью охраны орхидей данный способ размножения имеет преимущества над семенным, так как таким образом исключается возможность получения гибридных поколений, что особенно важно при репатриации орхидей в природу. При всей простоте и надежности основным недостатком классических приемов вегетативного размножения остается их малый коэффициент размножения. В лучшем случае от одного экземпляра можно получить десяток небольших растений из черенков. Поэтому в настоящее время актуальным является разработка методов ускоренного размножения, введения в культуру, репатриация этих видов в природные места обитания, а также создание генетических банков и коллекций для сохранения и расширения генофонда [5]. Перспективным направлением в этой области является разработка биологических подходов культивирования *in vitro* генеративных структур, таких как пыльник, завязь и семязачаток, так как они имеют высокий морфогенетический потенциал и обладают определенной автономностью от материнского растения. Суть такого процесса заключается в переключении программы развития морфогенетически компетентных клеток генеративных структур с обычного гаметофитного пути на иной путь — спорофитный, то есть образования растения-регенеранта. Для орхидей умеренной зоны этот вопрос остается малоизученным, поэтому любые исследования, связанные с изучением репродуктивных особенностей представляют значительный практический и теоретический интерес.

Целью наших исследований являлась разработка методики и введение в культуру *in vitro* редких видов орхидей умеренной зоны.

Материал и методы исследования

Материалом исследования были редкие виды орхидей — *Ophrys oestrifera* M. Bieb (рис. 1), *Himantoglossum caprinum* (Bieb.) C. Koch (рис.2).



Рисунок 1 — Внешний вид и распространение на территории Украины *O. oestrifera*

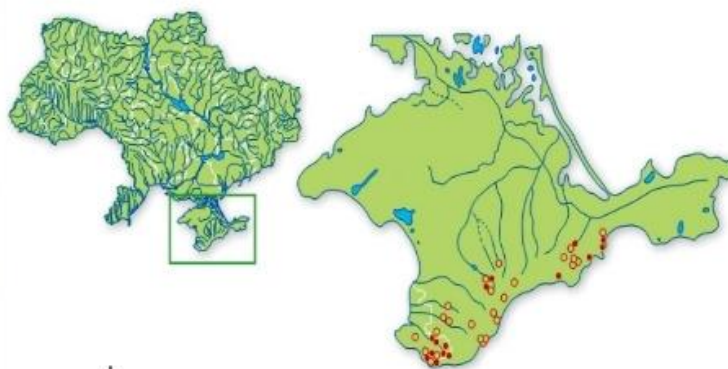


Рисунок 2 — Внешний вид и распространение на территории Украины *H. Caprinum*

O. oestrifera — реликтовый переднеазиатский вид на северной границе ареала. *H. caprinum* — эндемический крымско-кавказский вид со сложным биологическим развитием. На территории Украины эти два вида орхидей встречаются только в Крыму.

Экспедиционными исследованиями было охвачено центральный район главной горной гряды и западный район Южного берега Крыма. Для определения морфогенетического потенциала природного растительного материала в условиях *in vitro* были использованы генеративные органы орхидей: семязачатки, завязи, пыльники. Сбор материала проводился с учетом законов биоэтики в фазах цветения и плодоношения. В лабораторном эксперименте с культурой тканей экспланты культивировали на стерильных питательных средах: Мурасиге-Скуга (завязи), Нича и Нич (семязачатки и пыльники) [11]. В качестве эксплантов использовали генеративные органы орхидей, которые были отобраны в начале цветения (пыльники), и на 25-й день после опыления (завязи, семязачатки). Предварительно проводили поверхностную стерилизацию эксплантов стерилентами, подобранными для каждого типа экспланта, после чего их промывали стерильной дистиллированной водой. Для пыльников использовали двойную стерилизацию 0,8% $Ag(NO_3)_2$ и 70% C_2H_5OH в течение 2 и 1 мин соответственно, для завязей — стерилизацию 80% C_2H_5OH (1,5 мин) вместе с 15% H_2O_2 (2 мин), для стерилизации семязачатков — двойную стерилизацию 70% C_2H_5OH (2 мин) вместе с 15% H_2O_2 (3 мин). К стерилизующему раствору добавляли эмульгатор Твин-20 (одну каплю на 100 мл раствора). Для удаления фенолов в воду для промывания эксплантов добавляли 7% раствор L-цистеина, а процесс изоляции эксплантов проводили в стерильном растворе аскорбиновой кислоты на чашках Петри. Культивирование проводили в фотолуминостае ФСЛ-В (Россия) при 20—25⁰С, 16-часовом фотопериоде с освещением 1000—3000 лк и 70% относительной влажности воздуха и в термостате ВТ-120 (Польша) при температуре 25⁰С и отсутствии освещения. Для индукции роста и поддержания культур тканей использовали индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л (табл. 1).

Таблица 1 — Варианты количественного соотношения экзогенных фитогормонов в питательных средах для культивирования генеративных органов орхидей *in vitro*

Вариант питательной среды	Содержание экзогенных фитогормонов, мг/л		
	6-БАП	2,4-Д	ИМК

I	–	–	–
II	0,5	–	–
III	1,5	1,5	1,5
IV	2,0	1,5	–
V		–	2,0
VI		2,5	–
VII		3,0	–
VIII	2,5	1,5	–
IX		–	3,0
X	3,0	–	2,0
XI		–	2,5

Временные препараты с ацетокармином для цитологических исследований готовились по методике Паушевой [4]. Микроскопические исследования проводили на микроскопах МББ-1 (Россия) (увеличение x8; x20; x90), а также с помощью бинокля БМ-51-2 (Россия). Микрофотографии сделаны с помощью фотонасадки МФН-11 (Россия) на фотопленку «Kodak-200».

В фиксированных образцах определяли количество индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов (ЦТК). Фракцию гормонов выделяли 80%-ным этанолом, спирт упаривали. Водный остаток промораживали, центрифугировали при 10000 g, супернатант экстрагировали диэтиловым эфиром при pH 2,5 (ИУК и АБК) и бутанолом при pH 8 (ЦТК). Уровни связанных ИУК и АБК оценивали после химического гидролиза. Фракции ИУК и АБК очищали с помощью кислотнo-щелочной переэкстракции и ТСХ на пластинах Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) в системе растворителей хлороформ: этилацетат:уксусная кислота (70:30:5). Очистку ЦТК проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке Дауэкс 50Wx8 (H⁺ - форма, элюция аммиаком) и ТСХ в системе изопропанол:аммиак:вода (10:1:1). В качестве стандартов использовали препараты фитогормонов фирмы Sigma (США). Окончательный анализ качественного и количественного содержания фитогормонов проводился методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 В (США), колонка Eclipse XDB-C 18 2,1×150 мм, размер частиц 5 мм. Элюция проводилась в системе растворителей метанол:вода (37:63). Анализ и обработка хроматограмм проводилась с программным обеспечением Chem Station, версия В.03.01 в режиме *on line*.

Все полученные результаты обрабатывали статистически с помощью компьютерной статистической программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические и их статистические ошибки. Достоверность разницы

оценивали по критерию Стьюдента, используя 5% уровень значимости ($P \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Данные виды орхидей были выбраны в качестве объекта исследований не случайно. Повышенное внимание к орхидеям определяется не только их высокими декоративными качествами, но и уникальными особенностями биологии этих растений. Кроме этого, представители семейства почти повсеместно являются одним из уязвимых звеньев фитоценозов. Без детального изучения орхидей и организации их эффективной научно обоснованной охраны сохранить наиболее редкие их виды во многих густонаселенных областях умеренной зоны невозможно.

Метод культуры клеток, тканей и органов растений решает проблему дифференциации и морфогенеза, поскольку клетки в условиях *in vitro* лишены многих важных взаимодействий, которые контролируют эти процессы в целом организме. При этом создание разных условий культивирования *in vitro* дает возможность изучать разные уровни организации высших растений и процессы дифференциации. Успех введения в культуру того или иного вида растений зависит, в первую очередь, от правильного выбора экспланта, кроме того, на конечный результат влияет также целый комплекс внешних факторов. В качестве эксплантов использовались генеративные органы в силу своей определенной автономности по отношению к интактному растению.

Культивирование растений *in vitro* для получения каллуса и растений-регенерантов невозможно без получения асептической культуры. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию пыльников проводили 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ (5 мин), 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ (2 мин) вместе с 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 мин) и 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 мин). В результате установлено, что максимальная стерильность для получения асептических эксплантов пыльников достигается при использовании двойной стерилизации 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ и 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 2 и 1 мин соответственно. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации составляла от 52% (*H. caprinum*) до 68% (*O. oestrifera*). Не смотря на то, что при этом процент асептических эксплантов был ниже, чем при использовании двух других способов стерилизации (стерильность составляла в среднем 71% для всех эксплантов), в дальнейшей работе использовали именно эту схему стерилизации, поскольку наблюдался высокий показатель жизнеспособности эксплантов, который составлял более 50% (для двух других

способов стерилизации показатель жизнеспособности не превышал 14%).

Стерилизацию эксплантов завязей проводили с помощью 80% C_2H_5OH с экспозицией 3 мин, 80% C_2H_5OH (1,5 мин) вместе с 15% H_2O_2 (2 мин), 15% H_2O_2 с экспозицией 2 мин. Максимальной стерильности эксплантов достигли при использовании 80% C_2H_5OH в течение 3 мин. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации варьировало от 88% у *H. caprinum* до 96% для завязей *O. oestrifera*. При этом процент жизнеспособных эксплантов оставался низким и составлял в среднем 30%. Использование в качестве стерилента 15% H_2O_2 в течение 2 мин показало, что количественное соотношение асептических и жизнеспособных эксплантов совпадало (в среднем 21%), что объясняется низкой токсичностью перекиси водорода для растительных тканей. Наиболее оптимальным способом стерилизации эксплантов завязей орхидных оказалась двойная стерилизация 80% C_2H_5OH (1,5 мин) вместе с 15% H_2O_2 (2 мин), поскольку при сравнительно низком проценте асептических эксплантов (55%) количество жизнеспособных эксплантов, сравнительно с двумя другими способами стерилизации, был максимальным и составляло 50%.

Для получения асептической культуры семязачатков использовали три способа стерилизации: 70% C_2H_5OH в течение 4 мин, 70% C_2H_5OH (2 мин) вместе с 15% H_2O_2 (3 мин) и 15% H_2O_2 с экспозицией 4 мин. Показано, что наиболее эффективным было использование двойного метода стерилизации 70% C_2H_5OH (2 мин) и 15% H_2O_2 (3 мин), поскольку данный метод обеспечивал получение максимального количества жизнеспособных асептических эксплантов, которое в среднем составляло 70% для исследуемых видов орхидей.

Оптимальная питательная среда, физические факторы, баланс экзогенных и нативных гормонов — условия, обязательные для получения клеток, способных к морфогенезу [9]. В ходе проведения эксперимента нами были использованы пять основных питательных сред: Мурасиге-Скуга, Кнудсона, Нича, Нича и Нич и Потата II. Состав среды был модифицирован для индукции каллусогенеза, чтобы в короткие сроки получить первичную каллусную ткань. В качестве основных дедифференцирующих факторов использовали природные фитогормоны и их синтетические аналоги: 2,4-Д, ИМК, 6-БАП [8]. Данные регуляторы роста использовались в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л.

Полученные нами данные, однако, позволили сделать вывод о том, что из всех сред наиболее пригодной для культивирования завязей изучаемых видов является среда Мурасиге-Скуга, а для культивирования пыльников

и семязачатков — среда Нича и Нич с различными концентрациями регуляторов роста. При культивировании генеративных органов на остальных средах во всех вариантах наших исследований получены отрицательные результаты.

Перед подбором оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде для культивирования эксплантов предварительно провели исследования содержания фитогормонов в интактных органах. Исследования по подбору оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде показали, что максимальная частота каллусогенеза из эксплантов завязей орхидных наблюдается на питательных средах, в которых сохраняется такое же соотношение цитокининов и ауксинов, как и для интактного органа. У *Ophrys oestrifera* максимальная частота каллусогенеза наблюдается при культивировании на питательной среде с добавлением экзогенных цитокининов и ауксинов в соотношении 1,7, что характерно для интактных органов (табл. 2). Для эксплантов завязей *H. caprinum* такое соотношение фитогормонов составило 1,5.

Таблица 2 — Зависимость каллусогенеза эксплантов завязей орхидных от соотношения эндогенных и экзогенных цитокининов и ауксинов

Цитокинины/ауксины		Частота каллусогенеза, %
Эндогенные	Экзогенные	
<i>Ophrys oestrifera</i>		
1,7	1,7	29,9 ± 1,5
1,7	1,3	1,3 ± 0,1
1,7	0,7	5,4 ± 0,3
1,7	0,5	3,0 ± 0,2
<i>Himantoglossum caprinum</i>		
1,5	1,5	34,6 ± 1,7
1,5	1,3	3,0 ± 0,1
1,5	0,7	3,8 ± 0,2
1,5	0,5	1,9 ± 0,1

Наиболее оптимальными вариантами питательных сред (см. табл. 1) для культивирования пыльников оказались: для *O. oestrifera* — VIII (28,4 ± 1,4%), для *H. caprinum* — X (36,1 ± 1,8%). Для культивирования семязачатков наиболее эффективными оказались варианты питательных сред VI (*O. oestrifera* — 20,3 ± 1,0%) и IX (*H. caprinum* — 22,7 ± 1,1%). При культивировании на питательных средах с другими количественными соотношениями фитогормонов частота каллусогенеза была значительно меньше и не превышала для всех типов эксплантов 10%.

Каллус удалось получить при введении в культуру *in vitro* пыльников, завязей и семязачатков. В процессе введения этих эксплантов в культуру происходит переключение программы морфологически компетентных клеток генеративных структур с обычного гаметофитного пути на иной путь — спорофитный, то есть образования растения-регенеранта. Для характеристики каллуса, образовавшегося в культуре изолированных пыльников, предложено использовать термин «андроклиный каллус» [3]. Широко распространенный термин «андрогенный каллус» не вполне приемлем, поскольку необходимо различать понятия «андрогенез *in vitro*» и собственно «андрогенез» [2]. В целом, абсолютное большинство авторов сходится во мнении, что формирование морфогенного каллуса связано с аномальным развитием микроспор или клеток пыльцевого зерна. Отдельные авторы полагают, что симметричность или ассиметричность деления микроспоры не столь важна в «судьбе» производных этой клетки; гораздо более важную роль в формировании каллуса играют условия культивирования [2]. Таким образом, единое мнение в этом вопросе отсутствует. В полученном нами каллусе были обнаружены мелкие клетки, локализованные группами, с крупными ядрами, образующими меристематический очаг (рис. 3).

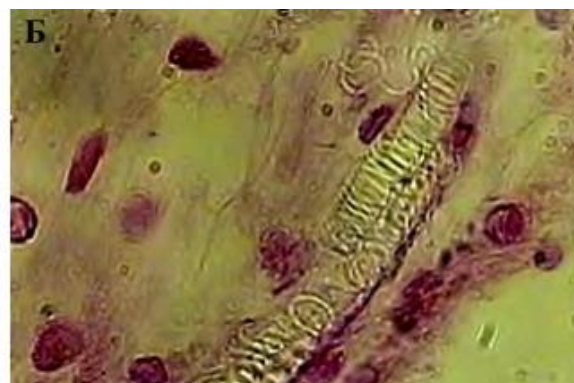
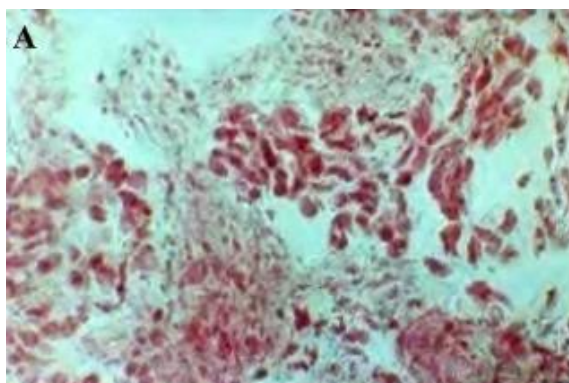


Рисунок 3 — Меристематический очаг (А) начало гистогенеза (Б) в каллусной культуре орхидных

Появление меристематических очагов означало, что в каллусной ткани начались процессы дедифференциации. Деление клеток меристематических очагов могло приводить к образованию лигнифицированных проводящих элементов сосудов и трахеид. Их образование аналогично ксилемогенезу у интактного растения и включает в себя стадии: рост клеток, вакуолезацию, отложение вторичной оболочки в условиях *in vitro*.

Другой путь морфогенеза в меристематических очагах — это спонтанный эмбриоидогенез. Каллусная клетка, ставшая на путь эмбриоидогенеза, относительно обособляется от окружающих клеток, ограничиваясь плотной оболочкой, увеличивается, сильно окрашивается. Обособившаяся клетка претерпевает строго направленные деления. В результате заложения ориентированных клеточных перегородок возникает четырехклеточная структура (тетрада), все клетки которой располагаются линейно (рис. 4).

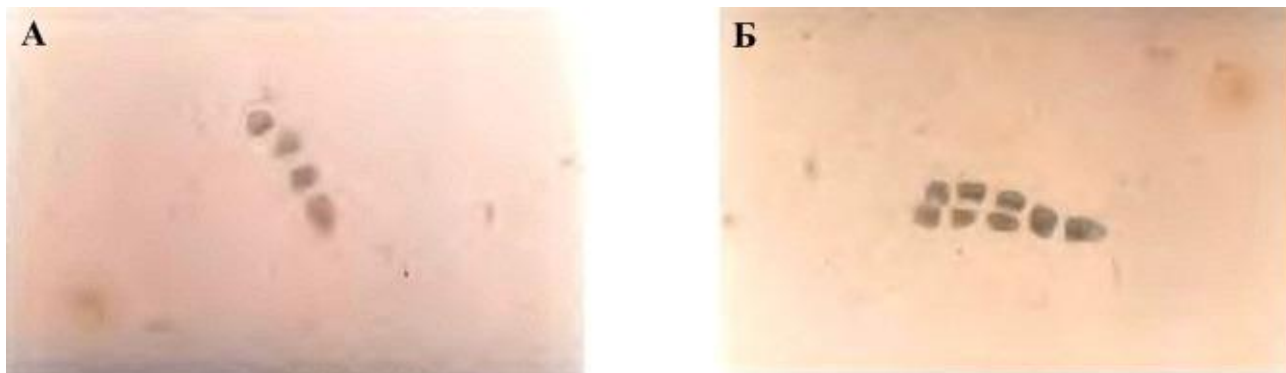


Рисунок 4 — Четырехклеточный (А) и восьмиклеточный (Б) эмбриониды в каллусной культуре орхидных

В дальнейшем формировании эмбриоида принимают участие как апикальные, так и базальные клетки, появляется многоклеточный эмбрионид. Нарушение развития эмбрионидов чаще всего выражается в неправильной ориентации клеточных перегородок при первых делениях относительно оси полярности. Часто базальная клетка делится раньше апикальной или не делится вообще. Во многих случаях наблюдается нарушение симметрии клеточных делений или асинхронность. Клеточные перегородки закладываются хаотично, во всех направлениях. Наблюдается также нарушение соотношения размеров клеток, образующих эмбрионид. Кроме того, восьмиклеточный подвесок, характерный для зародыша, обычно сильно редуцирован. Несмотря на большое количество нарушений в ходе эмбриоидогенеза, часть эмбрионидов развивается аналогично зиготическому зародышу, проходя те же стадии: предзародышевую стадию, глобулярную, торпедовидную. Таким образом, цитологический анализ каллусных культур орхидных показал ряд специфических особенностей. К ним относятся: 1) значительная структурная гетерогенность клеток, наличие различных типов образований, различающихся по морфологии; 2) связь морфологических признаков отдельных образований с их морфологическими потенциальными.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные стериленты и режимы стерилизации для получения каллусной культуры из завязей, семязачатков и пыльников *O. oestrifera*, *H. caprinum*; подобрана питательная среда и биологически активные вещества для культивирования эксплантов из генеративных органов орхидных *in vitro*. Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов генеративных органов орхидных и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микроклонального размножения этих видов. Результаты работы могут служить основой для разработки эффективных методов размножения редких орхидных в культуре *in vitro* при помощи экзогенных регуляторов роста. Кроме того, полученные данные указывают на перспективность применения методов микроклонального размножения редких и исчезающих видов растений, в частности орхидей, и могут быть использованы для сохранения генофонда орхидных Украины. Таким образом, показана возможность дальнейшего практического применения каллусных культур для возобновления и сохранения редких и исчезающих видов орхидей.

Список литературы

1. Красный список особо охраняемых редких и находящихся под угрозой исчезновения животных и растений (2-й выпуск). Часть 3.2. Семенные растения [ответ. ред. В.Е. Присяжнюк]. – М., 2004. – 360 с.
2. Круглова Н.Н. Унификация терминологии при разработке инновационной биотехнологии андроклиной гаплоидии *in vitro*: к постановке проблемы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – 41, № 6. – С. 476–486.
3. Круглова Н.Н., Дубровная О.В. Морфогенез андроклиных каллюсов злаков *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – 43, № 1. – С. 15–25.
4. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
5. Теплицкая Л.М., Попкова Л.Л., Бугара А.М., Котов С.Ф. Сохранение растительного генофонда орхидных Крыма методом культивирования *in vitro* // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – Симферополь, 2002. – Вып. 12. – С. 39 – 43.
6. Червона книга України. Рослинний світ / [за ред. Я.П. Дідуха]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
7. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология

- тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наук. думка, 2008. – 560 с.
8. Bajguz A, Piotrowska A. Conjugates of auxin and cytokinin // *Phytochemistry*. – 2009. – Vol. 70, N 8. – P. 957–969.
 9. Philip J. Kauth, Michael E. Kane, Wagner A. Vendrame. Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (*Orchidaceae*): evidence for ecotypic differentiation // *Ann. Bot.* – 2008. – N 102. – P. 783–793.