

УДК 581.142:581.143.6

**ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕЯНЦЕВ *DACTYLORHIZA INCARNATA* (L.) SOÓ (ORCHIDACEAE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

© 2014 г.

**А.В. Сидоров, Е.Н. Сечин, О.А. Маракаев**

Ярославский госуниверситет им. П.Г. Демидова

marakaev@uniyar.ac.ru

Поступила в редакцию 15.05.2014

Сеянцы *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro* на свету формируются мелкими и с наибольшим числом всасывающих волосков по сравнению с сеянцами в темноте. В разных условиях освещения они проходят одинаковые фазы развития, но сроки их наступления различаются. Освещение посевов через два месяца после начала культивирования может использоваться для ускорения темпов развития сеянцев.

*Ключевые слова:* *Dactylorhiza incarnata*, Orchidaceae, сеянцы, культура *in vitro*, свет, рост, развитие.

**Введение**

Одним из способов сохранения редких видов орхидных умеренного климата северного полушария является их введение в культуру *in vitro* [1, 2] с перспективой последующей реинтродукции в места естественного обитания [3]. На прорастание семян, рост и развитие сеянцев орхидных в культуре *in vitro* влияют разнообразные факторы: компоненты питательной среды, наличие микроорганизмов (бактерий и микосимбионтов), температура и др. [4, 5]. Особая роль принадлежит свету, который является одним из наиболее важных факторов, регулирующих процессы жизнедеятельности и обеспечивающих нормальное протекание онтогенеза [6, 7]. В семенах и гетеротрофных проростках существуют сформированные системы, способные воспринимать действие света и связанные с функцией фитохрома и рецепторов синего света [8]. Между тем влияние света на орхидные умеренного климата северного полушария в культуре *in vitro* до настоящего времени изучено недостаточно. Имеются данные, что свет ингибирует прорастание семян некоторых орхидных [6, 9], но необходим для начальных этапов роста и развития их сеянцев [10]. Подбор и обоснование оптимальных условий культивирования *in vitro* сеянцев редких видов орхидных может способствовать решению проблем, связанных со сложностью прорастания семян, высокой гибелью сеянцев, низкими темпами их роста и развития.

Цель данной работы – выявление роли света в процессах роста и развития сеянцев пальчатокоренника мясокрасного *Dactylorhiza incarnata*

(L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*. Представители рода *Dactylorhiza* принадлежат к тубероидным орхидным умеренного климата северного полушария [11]. Они успешно культивируются на искусственных питательных средах и часто используются в качестве модельных объектов для изучения [3, 4, 12, 13]. *D. incarnata* включен во многие региональные Красные книги и нуждается в охране [14, 15].

**Экспериментальная часть**

Сеянцы *D. incarnata* получали в условиях асимбиотической культуры *in vitro* с использованием недозрелых семян, которые высевали на модифицированную питательную среду Кнудсона с активированным углем и гуматом натрия [16]. Семена были собраны с разных экземпляров растений, произрастающих в осоково-разнотравном фитоценозе на территории Центральной России (Ярославская область). Первые два месяца посева находились на стеллажах в темноте при температуре +22...+24°C, после этого одну часть посевов начинали освещать люминесцентными лампами. Интенсивность освещения составляла 2500 лк, фотопериод – 12 ч. Вторую часть посевов продолжали культивировать в темноте.

Прорастание семян, показатели роста и развития сеянцев отмечали на 90-е, 120-е, 150-е и 180-е сутки культивирования. Выделяли следующие фазы развития: семена с увеличившимися зародышами, сеянцы с всасывающими волосками, сеянцы с апикальной почкой, сеянцы с ортотропным побегом (рис. 1). Побегом называли структуру длиной более 3 мм, развивающуюся

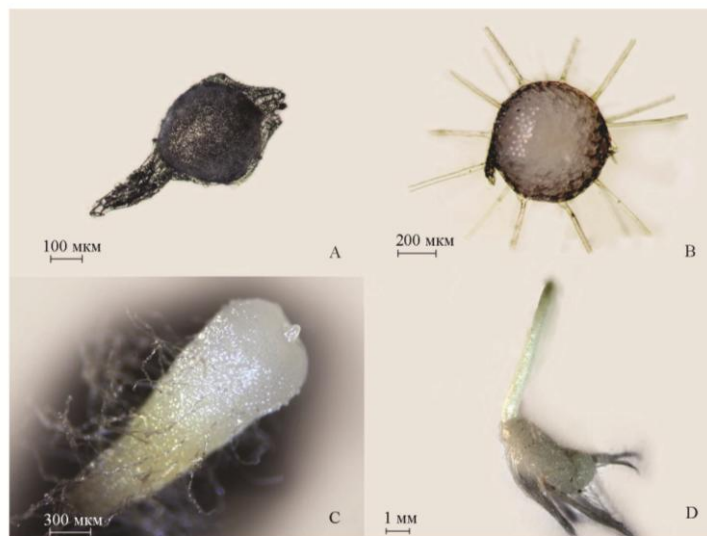


Рис. 1. Фазы развития сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro*:  
 А – увеличенный зародыш семени, В – сеянец с всасывающими волосками,  
 С – сеянец с апикальной почкой, D – сеянец с ортотропным побегом

из апикальной почки. Соотношение фаз развития вычисляли в процентах от общего числа сеянцев в каждом варианте культивирования. Для определения диаметра увеличившихся зародышей семян, длины и ширины тел сеянцев, числа и линейных размеров всасывающих волосков готовили временные препараты, которые изучали под световым микроскопом и фотографировали цифровой камерой. Последующий анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения *Altami Studio*. Длину ортотропного побега определяли под стереомикроскопом с помощью масштабной линейки. Морфометрические параметры сеянцев на каждой фазе развития были определены для 20 экземпляров, полученных при культивировании на свету и в темноте. Изучение анатомических параметров проводили у сеянцев с апикальной почкой. Поперечные и продольные срезы толщиной не более 20 мкм готовили с использованием микротомы с термоохлаждающим столиком [17]. На срезах сеянцев выделяли эпидерму, паренхиму и проводящие элементы. При помощи светового микроскопа определяли линейные размеры клеток, их форму, наличие зерен крахмала и др. Всего были исследованы 180 срезов.

Статистическую обработку полученных данных проводили по стандартным методикам [18] с использованием программы *Excel 2010*. В табл. 1, 2 приведены средние арифметические величины и их погрешности. При оценке различий между вариантами использовали критерий Стьюдента, считая до-

стоверными различия при уровне доверительной вероятности 0.95.

### Результаты и их обсуждение

Сеянцы *D. incarnata* в культуре *in vitro* освещали через 60 суток после посева семян. К этому моменту семена начинали прорастать и имели увеличившийся зародыш, диаметр которого составлял 475–547 мкм (рис. 1А). Необходимо отметить, что после 30 суток освещения были выявлены погибшие сеянцы: на свету их было 8%, в темноте – 2%. Семена с увеличившимися зародышами встречались в посевах до 120-х суток культивирования, в дальнейшем они не обнаруживались, что, по-видимому, связано с переходом сеянцев в следующую фазу развития (рис. 2). Воздействие света на прорастание семян и самые ранние фазы развития может быть обусловлено изменениями в фитогормональной регуляции метаболизма, определяющей формирование морфологических и физиологических систем [19].

Начальные этапы роста и развития растений характеризуются высокой интенсивностью большинства физиологических процессов. Так, образование всасывающих волосков сопровождается активным ростом сеянцев *D. incarnata* в длину, что наиболее выражено при их культивировании в темноте (рис. 1В, табл. 1). В этих условиях число волосков на 22%, меньше чем на свету. Их длина и диаметр достоверно не различаются у сеянцев в двух вариантах (табл. 1). Количество сеянцев с всасывающими

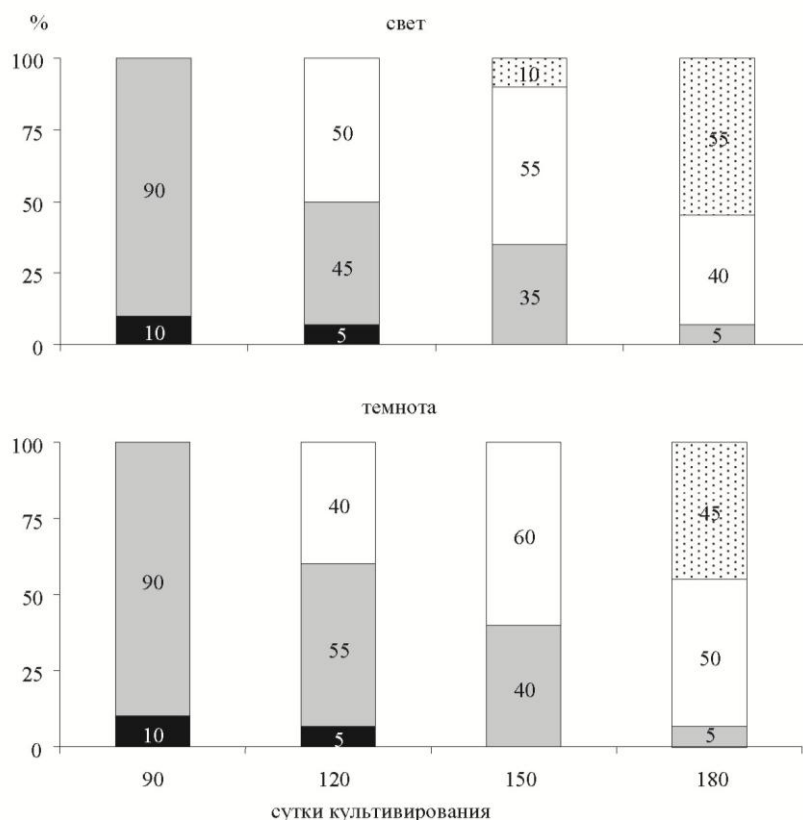


Рис. 2. Соотношение фаз развития семян *D. incarnata* в культуре *in vitro* на свету и в темноте:

- – семена с увеличившимися зародышами,
- – сеянцы с всасывающими волосками,
- – сеянцы с апикальной почкой,
- ▨ – сеянцы с ортотропным побегом

волосками преобладает через 90 суток, независимо от условий культивирования (рис. 2). Впоследствии доля таких сеянцев уменьшается, что в большей степени проявляется при их выращивании на свету.

Дальнейшее развитие *D. incarnata* в культуре *in vitro* связано с образованием апикальной почки (рис. 1С). Она формируется у сеянцев к 120-м суткам, независимо от условий культивирования (рис. 2). Однако на свету доля таких сеянцев на 10% выше, чем в темноте. Размеры сеянцев к этой фазе развития увеличиваются более чем в два раза (табл. 1). При этом в темноте они имеют меньшее количество всасывающих волосков. Достоверных различий по длине и диаметру всасывающих волосков у сеянцев с апикальной почкой в разных условиях выращивания не выявлено (табл. 1). Сеянцы *D. incarnata* при культивировании в темноте формируются более вытянутыми, чем на свету. Ранее показано, что они могут иметь разную форму – каплевидную, шаровидную, веретеновидную и эллипсовидную, которая, по-видимому,

объясняется особенностями процессов поляризации и удлинения [15]. Особенности морфогенеза сеянцев в связи с влиянием света могут быть связаны с подавлением роста одних и активацией роста других зон, а также изменением скорости деления и растяжения клеток [20].

Сеянцы *D. incarnata* с ортотропным побегом (рис. 1D) отмечены на 150-е сутки культивирования на свету и отсутствуют в темноте (рис. 2). По-видимому это следствие их ускоренного развития, связанного с действием света на фитохром и другие фоторецепторы и изменением фитогормонального статуса. На 180-е сутки доля таких сеянцев увеличивается более чем в 5 раз и превышает на 10% их количество в темноте. Размеры тела сеянцев с ортотропным побегом увеличиваются в длину в 2.7–3.5 раза, в ширину в 2.1–3.6 раза по сравнению с сеянцами с апикальной почкой (табл. 1). При этом в темноте они крупнее на 16–22%, что согласуется с данными, полученными ранее для *D. majalis* [6]. Длина ортотропных побегов сеянцев составляет 3.5–3.8 мм и достоверно не различается в раз-

Таблица 1

Морфометрические параметры сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro*

Фаза развития	Условия культивирования	Тело		Всасывающие волоски	
		длина, мм	ширина, мм	длина, мм	диаметр, мкм
Сеянцы с всасывающими волосками	Свет	0.7±0.07	0.6±0.07	4.2±0.51	25.1±1.49
	Темнота	0.9±0.09	0.6±0.07	4.0±0.43	22.7±1.41
Сеянцы с апикальной почкой	Свет	1.4±0.18	1.3±0.14	4.6±0.79	28.2±1.56
	Темнота	2.1±0.20	1.0±0.09	4.4±0.65	27.4±1.49
Сеянцы с ортотропным побегом	Свет	4.9±0.20	2.8±0.19	5.0±1.02	27.5±1.51
	Темнота	5.8±0.39	3.6±0.16	4.1±0.92	26.8±1.42

Таблица 2

Линейные размеры клеток сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro*\*

Условия культивирования	Длина		Ширина	
	мкм	коэффициент вариации $C_v$ , %	мкм	коэффициент вариации $C_v$ , %
Эпидерма				
Свет	60.4±5.23	22	30,3±2,97	16
Темнота	79.3±6.11	23	41,4±3,54	19
Паренхима				
Свет	101.1±8.73	47	74,8±6,93	38
Темнота	122.4±9.45	40	89,9±7,40	32

\* Сеянцы с апикальной почкой.

ных условиях. На этой фазе развития у сеянцев уменьшается количество всасывающих волосков в среднем на 20%. Эта особенность наиболее выражена при культивировании сеянцев в темноте. Длина и диаметр всасывающих волосков достоверно не различаются у сеянцев с ортотропным побегом в двух вариантах выращивания.

Особенности внутреннего строения исследовали у сеянцев *D. incarnata* с апикальной почкой. На продольных и поперечных срезах отмечены эпидерма, паренхима и начинающиеся формироваться проводящие элементы. Клеточная разнокачественность сеянцев орхидных ранее уже была показана в работах других авторов [21, 22]. Эпидерма сеянцев *D. incarnata* представлена прямоугольными клетками, плотно прилегающими друг к другу, расположенными в два слоя. Некоторые клетки верхнего слоя эпидермы образуют выросты, представляющие собой всасывающие волоски. Паренхимные клетки имеют овальную форму и содержат большое число крахмальных зерен. Последние отличаются наибольшими размерами в клетках сеянцев, культивируемых в темноте. Межклетники в паренхиме слабо выражены. У сеянцев на свету размеры эпидермальных и паренхимных клеток меньше на 20–25%, чем в темноте (табл. 2). При этом клетки эпидермы в 2 раза меньше варьируют по размерам по сравнению с клетками паренхимы. Формирующиеся проводящие элементы вытянуты вдоль тела сеянцев и

представлены мелкими клетками (26×31 мкм) округлой формы. Различий между ними у сеянцев на свету и в темноте не выявлено. Можно полагать, что формирование проводящих элементов связано с развитием структур побега. Эти процессы, протекающие в период гетеротрофного роста и развития сеянцев, готовят их к автотрофии.

### Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о сложности процессов роста и развития сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro*, обусловленных влиянием света. Их морфогенез осуществляется на основе генетической программы, реализуемой в зависимости от определенных условий, и связан с биохимическими, биофизическими и молекулярными изменениями, происходящими на каждой фазе развития. После 30 суток с момента освещения сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro* изменений в скорости их развития по сравнению с сеянцами в темноте не наблюдается. При этом процент погибших на свету сеянцев больше, чем в темноте, что, очевидно, связано с изменением условий. Культивирование *D. incarnata* на свету приводит к формированию округлых сеянцев, отличающихся меньшими размерами и большим числом всасывающих волосков по сравнению с сеянцами в темноте. Последние имеют более вытянутую форму, что можно рассматривать как адап-

тацию к условиям внешней среды. Сеянцы *D. incarnata* в разных условиях освещения проходят одинаковые фазы развития, но сроки их наступления различаются. Свет способствует ускоренному развитию, что проявляется в увеличении доли сеянцев с апикальными почками (120-е сутки) и в более раннем образовании ортотропных побегов (150-е сутки). Основой выявленных изменений, вероятно, являются активные метаболические процессы, такие как фитохромная модификация активности фитогормонов, биосинтез фенольных соединений, перестройка энергетических систем и др. [20].

Таким образом, освещение сеянцев *D. incarnata* в культуре *in vitro* через два месяца после посева приводит к ускорению темпов их развития и может обеспечить быстрое получение автотрофных растений для последующего использования в мероприятиях по реинтродукции. Продолжение начатых исследований должно способствовать оптимизации условий культивирования орхидных *in vitro* и их сохранению.

#### Список литературы

1. Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. М.: Геос, 2012. 352 с.
2. Широков А.И., Коломейцева Г.Л., Буров А.В., Каменева Е.В. Культивирование орхидей европейской России. Н. Новгород: Центр реинтродукции редких видов и растительных сообществ, 2005. 64 с.
3. Андропова Е.В., Ивасенко Ж.В. Жизнеспособность семенного потомства разных растений *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae) после посадки из культуры *in vitro* в природные условия // Ботан. журн. 2007. Т. 92. № 10. С. 64–74.
4. Rasmussen H.N., Anderson T.F., Johansen B. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus // Plant, Cell and Environment. 1990. V. 13. P. 171–177.
5. Червченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. Киев: Наукова думка, 2008. 559 с.
6. Rasmussen H.N., Anderson T.F., Johansen B. Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) *in vitro* // Physiologia Plantarum. 1990. V. 79. P. 226–230.
7. Маракаев О.А. Экологическая физиология растений: фотосинтез и свет. Ярославль: Изд-во ЯРГУ, 2005. 95 с.
8. Casal J.J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants // Photochem. Photobiol. 2000. V. 71. № 1. P. 1–11.
9. Arditti J., Michaud J.D., Oliva A.P. Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera* // Botanical Gazette. 1981. V. 142. P. 442–453.
10. Kauth P.J., Vendrame W.A., Kane M.E. *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006. V. 85. P. 91–102.
11. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and Adjacent Countries (within the Borders of the Former USSR). Konigstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.
12. Крюков Л.А., Широков А.И., Сырова В.В. Поливариантность онтогенеза *Dactylorhiza incarnata* (L.) Соо в связи с вегетативным размножением протокормов *in vitro* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. № 6 (1). С. 144–148.
13. Сидоров А.В., Маракаев О.А. Начальные этапы роста и развития *Dactylorhiza incarnata* (L.) Соо (Orchidaceae) в культуре *in vitro* // Охрана и культивирование орхидей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. С. 361–365.
14. Красная книга Ярославской области / Под ред. Л.В. Воронина. Ярославль: Изд-во Александра Рутмана, 2004. 384 с.
15. Красная книга Московской области / Отв. ред. Т.И. Варлыгина, В.А. Зубакин, Н.А. Соболев. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 828 с.
16. Червченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. Киев: Наукова думка, 1986. 196 с.
17. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
18. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.
19. Иванова Й.А. Фитогормоны и регуляция метаболизма в онтогенезе растений // В кн.: Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 127–140.
20. Кефели В.И. Физиологические основы конструирования габитуса растений. М.: Наука, 1994. 269 с.
21. Иванников Р.В. Обусловленность морфогенеза первичного протокорма орхидных // Вестник Тверского государственного университета. Сер. Биология и экология. 2008. Вып. 9. С. 76–85.
22. Batygina T.B., Bragina E.A., Vasilyeva V.E. The reproductive system and germination in orchids // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. 2003. V. 45 (2). P. 21–34.

**THE INFLUENCE OF LIGHT ON *DACTYLORHIZA INCARNATA* (L.) SOÓ (ORCHIDACEAE) SEEDLINGS GROWTH AND DEVELOPMENT *IN VITRO***

*A.V. Sidorov, E.N. Sechin, O.A. Marakaev*

*Dactylorhiza incarnata* seedlings in culture *in vitro* under the light grow smaller and with a higher number of absorbing hairs compared to seedlings in the dark. In different lighting conditions, they go through the same stages of development, but the timing of their occurrence differs. The lighting of crops in two months after the start of cultivation can be used to accelerate the development of seedlings.

*Keywords:* *Dactylorhiza incarnata*, Orchidaceae, seedlings, *in vitro*, light, growth, development.

*References*

1. Kolomeitseva G.L., Antipina V.A., Shirokov A.I., Khomutovskii M.I., Babosha A.V., Ryabchenko A.S. Semena orkhidei: razvitie, struktura, prorastanie. M.: Geos, 2012. 352 s.
2. Shirokov A.I., Kolomeitseva G.L., Burov A.V., Kameneva E.V. Kul'tivirovanie orkhidei evropeiskoi Rossii. N. Novgorod: Tsentr reintroduktsii redkikh vidov i rastitel'nykh soobshchestv, 2005. 64 s.
3. Andronova E.V., Ivasenko Zh.V. Zhiznesposobnost' semennogo potomstva raznykh rastenii *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae) posle posadki iz kul'tury *in vitro* v prirodnye usloviya // Botan. zhurn. 2007. T. 92. № 10. S. 64–74.
4. Rasmussen H.N., Anderson T.F., Johansen B. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus // Plant, Cell and Environment. 1990. V. 13. P. 171–177.
5. Cherevchenko T.M., Lavrent'eva A.N., Ivannikov R.V. Biotekhnologiya tropicheskikh i subtropicheskikh rastenii *in vitro*. Kiev: Naukova dumka, 2008. 559 s.
6. Rasmussen H.N., Anderson T.F., Johansen B. Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) *in vitro* // Physiologia Plantarum. 1990. V. 79. P. 226–230.
7. Marakaev O.A. Ekologicheskaya fiziologiya rastenii: fotosintez i svet. Yaroslavl': Izd-vo YarGU, 2005. 95 s.
8. Casal J.J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants // Photochem. Photobiol. 2000. V. 71. № 1. P. 1–11.
9. Arditti J., Michaud J.D., Oliva A.P. Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera* // Botanical Gazette. 1981. V. 142. P. 442–453.
10. Kauth P.J., Vendrame W.A., Kane M.E. *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006. V. 85. P. 91–102.
11. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and Adjacent Countries (within the Borders of the Former USSR). Konigstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.
12. Kryukov L.A., Shirokov A.I., Syrova V.V. Polivariantnost' ontogeneza *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó v svyazi s vegetativnym razmnozheniem protokormov *in vitro* // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. 2011. № 6 (1). S. 144–148.
13. Sidorov A.V., Marakaev O.A. Nachal'nye etapy rosta i razvitiya *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) v kul'ture *in vitro* // Okhrana i kul'tivirovanie orkhidei. M.: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2011. S. 361–365.
14. Krasnaya kniga Yaroslavskoi oblasti / Pod red. L.V. Voronina. Yaroslavl': Izd-vo Aleksandra Rutmana, 2004. 384 s.
15. Krasnaya kniga Moskovskoi oblasti / Otv. red. T.I. Varlygina, V.A. Zubakin, N.A. Sobolev. M.: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2008. 828 s.
16. Cherevchenko T.M., Kushnir G.P. Orkhidei v kul'ture. Kiev: Naukova dumka, 1986. 196 s.
17. Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rastenii. M.: Agropromizdat, 1988. 271 s.
18. Zaitsev G.N. Matematicheskaya statistika v eksperimental'noi botanike. M.: Nauka, 1984. 424 s.
19. Ivanova I.A. Fitogormony i regulyatsiya metabolizma v ontogeneze rastenii // V kn.: Gormonal'naya regulyatsiya ontogeneza rastenii. M.: Nauka, 1984. S. 127–140.
20. Kefeli V.I. Fiziologicheskie osnovy konstruirovaniya gabitusa rastenii. M.: Nauka, 1994. 269 s.
21. Ivannikov R.V. Obuslovlennost' morfogeneza pervichnogo protokorma orkhidnykh // Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Biologiya i ekologiya. 2008. Vyp. 9. S. 76–85.
22. Batygina T.B., Bragina E.A., Vasilyeva V.E. The reproductive system and germination in orchids // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. 2003. V. 45 (2). P. 21–34.