

УДК 582.52+581.3+58.086

ГЕНЕРАТИВНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ АВТООПЫЛЯЕМЫХ ОРАНЖЕРЕЙНЫХ ОРХИДНЫХ

© 2014 г. *Г.Л. Коломейцева, В.А. Антипина, А.В. Бабоша, А.С. Рябченко*

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва

kmimail@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2014

Рассмотрены особенности автоопыления и семенного размножения тропических орхидей в Фондовой оранжерее Главного ботанического сада РАН. Показано, что наиболее эффективными моделями автоопыления являются разрастание тканей рыльца, редукция ростеллума, развитие дополнительных пыльников и преобразование сегментов околоцветника. Выявлены 14 автоопыляемых видов орхидных, среди которых 4 вида регулярно прорастают симбиотически в оранжерейных условиях. На примере *Cranichis muscosa* изучен полный цикл онтогенеза, включая эмбриогенез и симбиотрофное прорастание.

Ключевые слова: автоопыление, тропические орхидеи, оранжерейное культивирование, онтогенез, опыление, эмбриогенез, симбиотрофизм.

Введение

Под действием пролонгированных климатических и антропогенных стрессоров адапциоморфозы орхидей могут выражаться в значительных преобразованиях морфоструктур, в том числе на уровне архитектурных моделей, отдельных побегов или генеративных органов.

Одним из адапциоморфозов генеративных органов у орхидных является преобразование структур цветка для самоопыления в процессе развития. Это явление называется автоопылением. При автоопылении околоцветник и генеративные структуры цветка могут видоизменяться несколькими способами, позволяя пыльце (пол-

линиям) перемещаться на рыльцевую поверхность (стигму), минуя специализированную преграду колонки (ростеллум) (рис. 1). Эволюционный смысл автоопыления – преодоление зависимости от опылителей-посредников, что бывает очень важно в экстремальных условиях расселения в новых местах обитания или при исчезновении опылителя. По-видимому, в семействе орхидных автоопыление возникло на позднем этапе становления генеративной репродукции, автоопыляемые популяции и особи происходят от перекрестноопыляемых родителей. В определенных условиях такая адаптация служит надежным гарантом выживания вида.

Для успешного семенного размножения орхидей в оранжерейных условиях необходимо сочетание двух факторов – способности к самоопылению и завязыванию полноценных семян и наличия подходящих микоризообразователей в искусственно приготовленном субстрате. Обычно эти проблемы преодолеваются посредством искусственного опыления и проращивания семян в культуре *in vitro*, но расширение генетической репрезентативности коллекций тропических орхидей возможно и с помощью самоопыляемых клонов, способных вступать в симбиотические отношения с оранжерейными грибами.

Цель данного исследования – выявление эффективности автоопыления и особенностей онтогенеза автоопыляемых орхидных в оранжерейных условиях.

Задачи исследования:

- анализ механизмов автоопыления у оранжерейных орхидных и подтверждение эф-

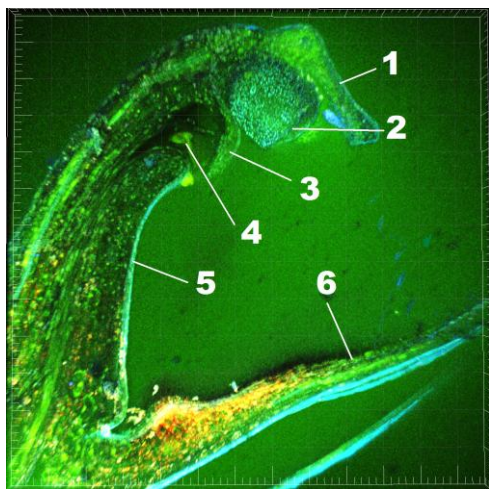


Рис. 1. Строение цветка автоопыляемой орхидеи *Liparis caespitosa* (1 – чашечка пыльника, 2 – поллиний, 3 – ростеллум, 4 – стигма (рыльце), 5 – колонка, 6 – губа)

Таблица

Способы и эффективность автоопыления у орхидейных

Индекс модели автоопыления [1]	Изменение органов цветка	Эффективность автоопыления
1	Увеличение секреции стигмы	<i>Goodyera procera</i> (Ker Gawl.) Hook. <i>Eria boniana</i> (Gagnep.) Tang & Wang (42±35%) <i>E. corneri</i> Rchb.f. (20%)
2	Участие сегментов околоцветника	<i>Heterotaxis sessilis</i> (Sw.) F. Barros (100%)
3	Изменение структуры стигмы	
3a	сжимание отростков стигмы	<i>Arundina graminifolia</i> (Don) Hochr.
3b	разрастание ткани стигмы	<i>Phaius pictus</i> T.E. Hunt
4	Движение поллиниев или поллинаривов	
4a	опускание рыхлого поллиния	<i>Serapias lingua</i> L.
4b	опускание или скольжение цельного поллиния	<i>Cranichis muscosa</i> Sw. (40±15%) <i>Liparis viridiflora</i> (Blume) Lindl.
4c	вращение цельного поллинарива	<i>Liparis loeselii</i> (L.) Rich. <i>Malaxis latifolia</i> J.E. Sm. (68±12%)
4d	изгибание каудикеры, текулы или пыльцевой массы	<i>Oeceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl.
5	Структурные модификации колонки	
5a	ростеллум отсутствует или редуцируется	<i>Guarianthe aurantiaca</i> (Batem.ex Lindl.) Dressler & W.E. Higgins (100%) <i>Epidendrum nocturnum</i> Jacq. (100%) <i>E. rigidum</i> Jacq. (100%) <i>Liparis balansae</i> Gagnep. (46±11%) <i>L. caespitosa</i> (Lam.) Lindl. (21±19%) <i>L. nigra</i> Seidenf. (60±27%) <i>L. stricklandiana</i> Rchb.f. (10±2%) <i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay et Sweet (8±3%)
5b	ростеллум развивается в специализированную ткань стигмы	<i>Epipactis helleborine</i> (L.) Crantz
5c	развитие дополнительных пыльников и их контакт со стигмой	<i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins (100%) <i>Phaius tankervilleae</i> (Banks) Blume
5d	изгибание и изменение длины отростков стигмы	<i>Paphiopedilum lowii</i> (Lindl.) Stein

Примечание: жирным шрифтом выделены виды, завязывающие полноценные семена в Фондовой оранжерее Главного ботанического сада (ГБС) РАН.

эффективности завязывания плодов при разных способах автоопыления;

- изучение особенностей эмбриогенеза и начальных стадий прорастания автоопыляемых орхидейных в условиях защищенного грунта на примере *Cranichis muscosa*.

Экспериментальная часть

Модели автоопыления определяли согласно классификации П. Катлинга [1], типы эмбриогенеза классифицировали по методике М. Клементса [2], типификацию семян проводили по методике В. Бартлоута и Б. Циглера [3]. Морфоструктуру цветков изучали с помощью бинокулярной лупы МБС-2. Подсчитывали число цветков в соцветиях, число цветков, завязавших плоды; эффективность автоопыления выражали в процентах. Эмбриогенез *Cranichis muscosa* изучали с помощью конфокального микроскопа.

Срезы завязей и отделенных семязачатков помещали в раствор 10 мг/мл дипиридамола

(dipyridamole (2,2',2'',2'''-{(4,8-dipiperidinyl)pyrimido[5,4-d]pyrimidine-2,6-diyl)dinitrilo}tetraethanol) в 5%-ной уксусной кислоте и накрывали покровным стеклом. После инкубации в течение 10–15 мин образцы под стеклом промывали 100–200 мкл дистиллированной воды, затем дополнительно окрашивали водным раствором калькофлуора (10–15 мин, 5 мг/мл) с последующей промывкой дистиллированной водой. Препараты просматривали на конфокальном микроскопе Olympus FV1000D при возбуждении светом 405, 473 и 560 нм и регистрации сигнала в синем (425–460 нм), зеленом (485–530 нм) и красном (560–660 нм) каналах, что соответствовало флуоресценции стандартных красителей: соответственно DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), Alexa fluor и Rhodamine.

По нашим наблюдениям, пыльцевые трубки, зародышевые мешки и зародыши практически не обладали автофлуоресценцией. Калькофлуор обеспечивал сигнал в синем канале, окрашивая клеточные стенки клеток интегументов и пыль-

цевых трубок. Флуоресценция мембранных структур в широком диапазоне длин волн была связана с их окраской дипиридамолом. Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам.

Среди исследованных нами 1100 коллекционных видов орхидных явление автоопыления было выявлено у 14 видов (таблица).

Из таблицы видно, что наиболее эффективными способами автоопыления являются участие околоцветника (модель 2) и редукция ростеллума (модель 5а).

Движение частей околоцветника (чашелистиков, лепестков или губы) чаще всего наблюдали при старении не полностью раскрывшегося цветка, его сегменты при высыхании способны изгибаться таким образом, что приводят поллинии и стигму в контакт. У *Heterotaxis sessilis* (синоним *Maxillaria crassifolia*) из подтрибы *Maxillariinae* губа подсыхала внутри нераскрытого цветка, поллиний упирался в ее неподвижный край и смещался вниз к ростеллumu. Цветок при этом оставался практически закрытым [4].

Увеличение секреции стигмы приближает ее липкую поверхность к поллиниям, «стягивая» их из ямки клинандрия. Наиболее эффективное опыление этим способом наблюдали у вьетнамской орхидеи *Eria boniana* (42±35%). Интересным вариантом структурной модификации колонки явилось развитие дополнительных пыльников и их контакт со стигмой у *Prosthechea cochleata* (синоним *Encyclia cochleata*) из подтрибы *Laeliinae*.

Автоопыляемые образцы всех перечисленных видов орхидей в условиях Фондовой оранжереи ежегодно развивают полноценные плоды со зрелыми семенами. Однако дальнейшее развитие проростков было отмечено только у 5 представителей подсемейства *Epidendroideae* (*Calanthe sylvatica*, *Eria boniana*, *E. corneri*, *Malaxis latifolia*, *Liparis balansae*) и 2 представителей подсемейства *Orchidoideae* (*Cranichis muscosa*, *Habenaria* sp.), которые прорастали микосимбиотрофно.

Онтогенез «от семени до семени» изучали на примере *Cranichis muscosa*. Эта наземная орхидея обитает в низинных заболоченных лесах Центральной и Южной Америки, Кубы, Пуэрто-Рико, Флориды. Растения из большинства природных популяций склонны к автоопылению. В коллекции Фондовой оранжереи содержится с 2004 г., материнский образец привезен из Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко НАН Украины (Киев). Вид относится к подсемейству *Orchidoideae*, трибе *Cranichideae*,

подтрибе *Cranichidinae*, представлен многолетними бескорневищными наземными растениями с утолщенными запасными корнями, спиральным листорасположением и верхушечным соцветием. Развивается по архитектурной модели Tomlinson-1 [5]. Каждое соцветие несет от 10 до 75 цветков. Цветки мелкие, белые, не ресупинантные, с зелеными точками на повернутой вверх губе. Колонка мясистая, короткая, прямостоячая, без ножки, с волнистой оторочкой. Стигма овальная, плоская, скобковидная по краю, на терминальном конце колонки. Ростеллум прямостоячий, тупой. Пыльник спинной, прямой, продолговатый. Поллинии 4 – продолговато-булавовидные, порошоквидные, присоединены к маленькому шаровидному висцидиуму. Автоопыление происходит благодаря опусканию поллиний на поверхность стигмы.

Семязачатки битегмальные, антропные. Пыльцевые трубки входят в микропиле, образованное обоими интегументами, во время развития семязачатка внешний интегумент истончается и удлиняется (рис. 2). Эффективность опыления – менее 50%. После опыления в зародышевом мешке образуется крупный эндосперм, который постепенно элиминируется во время эмбриогенеза. Три первых деления зиготы происходят в поперечном направлении, затем апикальная клетка делится продольно. Последующие деления клеток зародыша происходят только в продольном направлении. В результате образуется продолговатый малоклеточный зародыш, вдоль оси состоящий всего из 4 клеток. По толщине в наиболее широком месте зародыш также имеет только 4 клетки, в целом тело зародыша состоит менее чем из 20 клеток (рис. 3). Согласно нашим наблюдениям, семена *C. muscosa* относятся к *Goodyera*-типу по классификации В. Бартлота и Б. Циглера [3], семенная оболочка вытянутая, около 800 мкм длиной, с хорошо выраженными межклетниками и широким микропилярным отверстием [6]. Протяженный период диссеминации в оранжерейных условиях наблюдается с конца зимы до поздней осени, семена легко прорастают с помощью оранжерейных грибов. Характерной особенностью данного вида является способность проростков к быстрому развитию и подавлению растений-конкурентов.

Протосомы *Cranichis muscosa* обычно хорошо развиваются вблизи поверхности на субстратах других оранжерейных орхидных, быстро достигают длины 2–3 мм. На субстратах из сосновой коры и сфагнома хорошо развитые первичные побеги образуются уже в течение

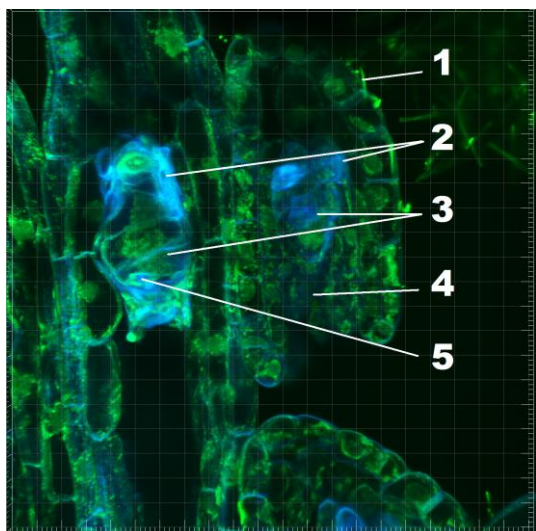


Рис. 2. Два семязачатка *Cranichis muscosa* на начальных стадиях эмбриогенеза (1 – клетки наружного интегумента с живой протоплазмой, 2 – пыльцевые трубки в зародышевом мешке, 3 – зародышевый мешок на стадии внедрения пыльцевых трубок, 4 – микропиллярное отверстие, 5 – зародыш)

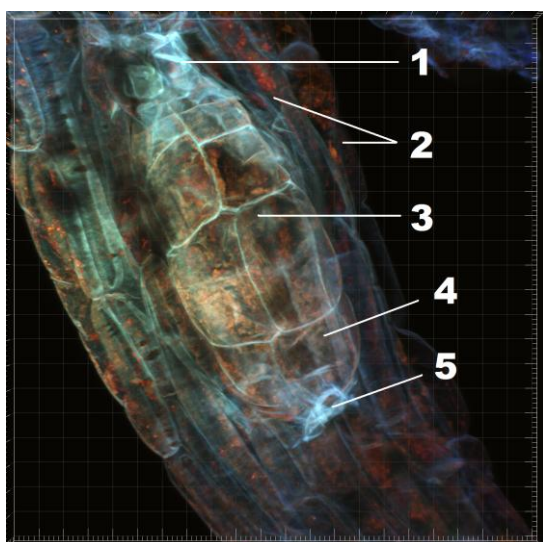


Рис. 3. Зародыш *Cranichis muscosa* на стадии четвертой клеточной генерации (1 – халазальный конец зародышевого мешка, 2 – наружный и внутренний интегументы с живыми клетками, 3 – зародыш, 4 – микропиллярный конец зародышевого мешка, 5 – остаток суспензора)

первого года после диссеминации (рис. 4), в генеративную фазу растения вступают на второй-третий год.

Результаты и их обсуждение

Основной отрицательной чертой автоопыления считается отсутствие генетической вариативности, в результате чего снижаются адап-



Рис. 4. Проростки *Cranichis muscosa* на начальных стадиях онтоморфогенеза (1 – ювенильный побег с протосомой и первым листом, 2 – ювенильный побег на стадии образования первого корня, 3 – ювенильный побег с протосомой и хорошо развитым корнем, 4 – побег на стадии развития 7-го листа с хорошо развитыми корнями и сохранившейся протосомой)

тационные способности вида. Однако некоторые автоопыляемые группы орхидных в природных местах обитания имеют довольно длительные периоды генеративного размножения без опылителей-посредников и, тем не менее, генетическая вариативность сохраняется даже в таких инбридинговых популяциях.

Процент автоопыляемых видов орхидных увеличивается при географической изоляции популяций [7, 8], при подъеме в горы [9], на северных пределах распространения [10].

Самоопыление у орхидных можно разделить на облигатное и факультативное. Облигатные самоопылители завязывают семена с помощью автоопыления или другой формы гомоклинного опыления регулярно, а факультативные самоопылители перемежают автоопыление с другими формами опыления. Некоторые факультативные автоопыляемые виды орхидей географически более широко расселены, чем перекрестноопыляемые виды [1]. Например, эволюция опыления у орхидных умеренных широт, особенно в популяциях крайнего севера, привела к изменению систем скрещивания и переходу от аллогамии к автогамии. Это обеспечило более высокий процент плодообразования у автоопыляемых особей *Goodyera repens* (L.) R.Br. (модель автоопыления 4a), *Neottia ovata* (L.) Bluff & Fingerh. (синоним *Listera ovata* (L.) R.Br.) (модель автоопыления 4a), *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (модель автоопыления 4d) и сократило время, необходимое для завершения их полного сезонного цикла развития за счет уменьшения продолжительности цветения [9, 11].

Не менее широко известны примеры расселения автоопыляемых орхидных в антропогенно нарушенных вторичных растительных сообществах (первые стадии экологических сукцессий, постоянно открытые пространства пустынь, возделываемые поля, насыпи, обочины дорог, карьеры и т.п.), а также в эпифитных и литофитных местообитаниях. На северо-востоке Северной Америки такие места обитания занимают именно автоопыляемые орхидные, в том числе *Platanthera hyperborea* (L.) Lindl. (4a, 4b, 4d), *P. clavellata* (Michx.) Luer (4a) и *Liparis loeselii* (L.) Rich. (4c) [1].

При определенных условиях автоопыляемые орхидные могут становиться инвазионными растениями. Это, например, *Oeceoclades maculata* – пантропическая наземная орхидея, встречающаяся в Америке, Африке и на Мадагаскаре, которая в настоящее время входит в список инвазионных видов Флориды. В последнее время *O. maculata* активно занимает подходящие местообитания в тропиках американского континента, вытесняя оттуда природные виды [12]. Вместе с тем, уровень генетической дивергенции этого вида чрезвычайно низок. И хотя число семян в одном плоде сравнительно невелико, такие черты репродуктивной биологии *O. maculata* как самоопыление и прорастание семян с помощью широкого спектра грибных симбионтов определяют его предрасположенность к инвазионности в некоторых тропических регионах мира.

По результатам работы можно сделать следующие выводы:

– в Фондовой оранжерее ГБС РАН часть коллекции орхидных представлена автоопыляемыми образцами, способными развивать полноценные семена, но вступают в симбиотические отношения с оранжерейными грибами и прорастают только единичные виды;

– наиболее эффективными моделями автоопыления являются редукция ростеллума, развитие дополнительных пыльников, а также участие сегментов околоцветника, не дающих цветку полностью раскрыться; у видов, представленных одновременно автоопыляемыми и энтомофильными клонами, преобразования цветков, как правило, связаны с изменениями структуры стигмы и способом движения поллиниариев или поллиниев;

– благодаря автоопылению и микосимбиотрофному прорастанию, растения *S. muscosa* способны к регулярному семенному возобновлению, что расширяет возможность гене-

тического отбора в оранжерейных условиях. Несмотря на высокий процент нежизнеспособных семязачатков, в каждом плоде развивается более половины жизнеспособных семян.

Исследования проведены при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» (2012–2014 гг.).

Список литературы

1. Catling P.M. Auto-pollination in the Orchidaceae / Orchid biology – reviews and perspectives / Ed. J. Arditti. Portland, Oregon: Timber Press, 1990. V. 5. P. 121–158.
2. Clements M.A. Embryology / In: Genera Orchidacearum. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae / Eds. A.M. Pridgeon, J.C. Cribb, M.W. Chase, F.N. Rasmussen. New York: Oxford University Press, 1999. V. 1. P. 38–58.
3. Barthlott W., Ziegler B. Morphologie der Samenschalen systematische Merkmal bei orchideen // Bericht der deutschen botanische gesellschaft. 1981. Bd. 94. S. 267–273.
4. Коломейцева Г.Л. Способы автоопыления у оранжерейных орхидных // Материалы междунар. науч. конф. «Сохранение биоразнообразия тропических и субтропических растений», Харьков, 2013. С. 36–41.
5. Коломейцева Г.Л. Морфо-экологические особенности адаптации тропических орхидных при интродукции: Диссертация ... д-ра биол. наук. М.: ГБС РАН, 2006. 377 с.
6. 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.
7. Catling P.M. Breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay sensu lato in South Florida // Ann. Missouri Bot. Gard. 1986. № 74. P. 58–68.
8. Mehrhoff L.A. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae) // Amer. J. Bot. 1983. V. 70. № 10. P. 1444–1453.
9. Bates R. Pollination of orchids. Part 9 // J. Native Orchid Soc. S. Austral. 1978. V. 2. № 8. P. 7–8.
10. Блинова И.В. Биология орхидных на северо-востоке Фенноскандии и стратегии их выживания на северной границе распространения. Диссертация ... д-ра биол. наук. М.: ГБС РАН, 2010. 552 с.
11. Аверьянов Л.В. Род *Dactylorhiza* Nevski (Orchidaceae) в СССР. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Л.: БИН РАН, 1983. 24 с.
12. Cohen I.M., Ackerman J.D. *Oeceoclades maculata*, an alien tropical orchid in a rainforest // Annals of Botany. 2009. V. 104. P. 557–563.

GENERATIVE PROPAGATION OF AUTO-POLLINATED HOTHOUSE ORCHIDS

G.L. Kolomeitseva, V.A. Antipina, A.V. Babosha, A.S. Ryabchenko

Ways of auto-pollination and seed propagation of hothouse orchids are discussed. It is shown that the most effective models of auto-pollination are rostellum reduction, development of additional anthers, and also transformation of perianth segments. 14 auto-pollinated species of orchids are revealed, including four species that regularly germinate symbiotically in hothouse conditions. The full cycle of ontogeny, including embryogenesis and symbiotrophic germination, is studied on the example of *Cranichis muscosa*.

Keywords: auto-pollination, tropical orchids, hothouse cultivation, ontogeny, pollination, embryogenesis, symbiotrophy.

References

1. Catling P.M. Auto-pollination in the Orchidaceae / Orchid biology – reviews and perspectives / Ed. J. Arditti. Portland, Oregon: Timber Press, 1990. V. 5. P. 121–158.
2. Clements M.A. Embryology / In: Genera Orchidacearum. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae / Eds. A.M. Pridgeon, J.C. Cribb, M.W. Chase, F.N. Rasmussen. New York: Oxford University Press, 1999. V. 1. P. 38–58.
3. Barthlott W., Ziegler B. Morphologie der Samenschalen systematische Merkmal bei orchideen // Berichfe deutsche botanische gesell-schaff. 1981. Bd. 94. S. 267–273.
4. Kolomeitseva G.L. Sposoby avtoopylenija u oranzherejnyh orhidnyh // Materialy mezhdunarod. nauch. konf. «Sohranenie bioraznoobrazija tropicheskikh i subtropicheskikh rastenij», Har'kov, 2013. S. 36–41.
5. Kolomeitseva G.L. Morfo-jekologicheskie osobennosti adaptacii tropicheskikh orhidnyh pri introdukcii: Dissertacija ... d-ra biol. nauk. M.: GBS RAN, 2006. 377 s.
6. Kolomeitseva G.L., Antipina V.A., Shirokov A.I., Homutovskij M.I., Babosha A.V., Rjabchenko A.S. Semena orhidej: razvitie, struktura, prorastanie. M.: GEOS, 2012. 352 s.
7. Catling P.M. Breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay sensu lato in South Florida // Ann. Missouri Bot. Gard. 1986. № 74. P. 58–68.
8. Mehrhoff L.A. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae) // Amer. J. Bot. 1983. V. 70. № 10. P. 1444–1453.
9. Bates R. Pollination of orchids. Part 9 // J. Native Orchid Soc. S. Austral. 1978. V. 2. № 8. P. 7–8.
10. Blinova I.V. Biologija orhidnyh na severo-vostoke Fennoskandii i strategii ih vyzhivanija na severnoj granice rasprostranenija. Dissertacija ... d-ra biol. nauk. M.: GBS RAN, 2010. 552 s.
11. Aver'janov L.V. Rod *Dactylorhiza* Nevski (Orchidaceae) v SSSR. Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. L.: BIN RAN, 1983. 24 s.
12. Cohen I.M., Ackerman J.D. *Oeceoclades maculata*, an alien tropical orchid in a rainforest // Annals of Botany. 2009. V. 104. P. 557–563.