

УДК 581.44:582.594.2

## АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛА ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ТУБЕРОИДНЫХ ОРХИДНЫХ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ *IN VITRO*

© 2010 г.

Л.А. Крюков, А.И. Широков, В.В. Сырова

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

aishirokov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2010

Приведены результаты анализа потенциала вегетативного размножения тубероидных орхидных (*Dactylorhiza incarnata*, *Gymnadenia conopsea*) на ранних стадиях развития под воздействием ИМК и 6-БАП *in vitro*. Установлены оптимальные концентрации и соотношения фитогормонов для максимального эффекта вегетативного размножения.

**Ключевые слова:** орхидные, протокорм, фитогормоны, *in vitro*, клонирование, редкие виды.

Орхидные (*Orchidaceae* Lindl.) – одно из самых многочисленных семейств среди цветковых растений. Сложные биоэкологические особенности, активное антропогенное воздействие на среду обитания и безжалостное изъятие растений из природных условий привело к отнесению большинства видов этого семейства к категории редких и исчезающих.

Создание эффективных методов для размножения орхидных и восстановления численности нарушенных популяций представляется весьма актуальным.

Согласно современным представлениям о начальных стадиях развития орхидных [1, 2] естественный процесс онтоморфогенеза можно разделить на следующие стадии (рис. 1): семя → протокорм → первичный корнепобег и т.д. При этом в литературе широко обсуждается, с одной стороны, вопрос о слабой способности тубероидных орхидных в природных популяциях к вегетативному размножению [3, 4], а с другой – способность активного размножения протокормов практически всех орхидных *in vitro* [1, 2, 5]. Выяснению этих вопросов и посвящена данная работа.

Объектом исследований стали тубероидные орхидные: *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo – пальчатокоренник мясокрасный и *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. – кокушник длиннорогий, которые относятся к категории редких видов флоры Нижегородской области [6]. Цель работы – выявление естественного потенциала вегетативного размножения тубероидных орхидных на ранних стадиях развития под воздействием фитогормонов *in vitro*. Ставились следующие задачи:

1. определение стадии развития для наиболее активного вегетативного размножения;
2. определение оптимальных фитогормональных условий вегетативного размножения;
3. выявление максимального эффекта вегетативного размножения протокормов.

Были заложены две серии экспериментов, связанных с разными стадиями развития исследуемых орхидей:

- анализ потенциала вегетативного размножения на стадии протокорма (на примере *Dactylorhiza incarnata*);
- анализ потенциала вегетативного размножения на стадии первичного корнепобега (на примере *Gymnadenia conopsea*).

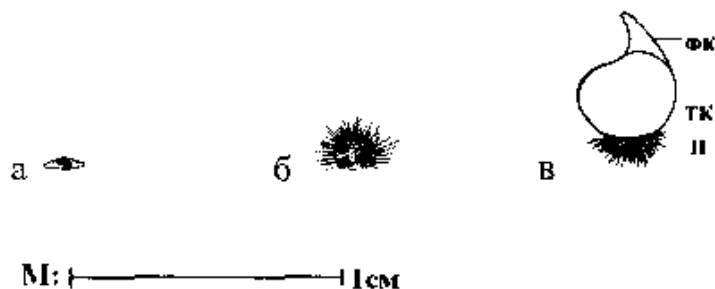


Рис. 1. Развитие и вегетативное размножение *Gymnadenia conopsea* и *Dactylorhiza incarnata* на ранних стадиях естественного процесса (ФК – фотосинтезирующая часть корнепобега; ТК – тело корнепобега; П – протокорм): а – семя; б – протокорм; в – корнепобег

### Анализ потенциала вегетативного размножения на стадии протокорма (на примере *Dactylorhiza incarnata*)

Для эксперимента использовали стерильные протокормы *Dactylorhiza incarnata*, полученные *in vitro* после высева семян, собранных из естественной популяции на территории Нижегородской области. Для исследований была выбрана агаризованная питательная среда, предложенная С. Мальмгрин [7]. Было приготовлено 9 вариантов среды с различной концентрацией фитогормонов и соотношением ауксина (ИМК) и цитокинина (6-БАП) 1:1, 1:3, 1:5, 3:1, 3:3, 3:5, 5:1, 5:3, 5:5 мг/л, по 5 повторностей каждого варианта и 5 контрольных колб с безгормональной средой (всего 50 колб). В каждую колбу помещали по 3 протокорма. Затем они содержались на затененном стеллаже на протяжении двух месяцев.

Как показывают наши исследования (рис. 2, табл. 1), активное вегетативное размножение у тубероидных орхидных наблюдается на начальной стадии формирования первичного

корнепобега на протокорме при содержании в питательной среде ИМК и 6-БАП. Гормоны в равном соотношении оказывали выраженный мультиплицирующий эффект. При содержании гормонов в количестве по 1 мг/л первичный протокорм образует до 8–12 шт. корнепобегов, размер их соответствует контрольному. Их поверхность плотно покрыта ризоидами. При увеличении доли гормонов в среде до 3 мг/л количество корнепобегов уменьшается до 3–5 шт., но их размер увеличивается до 2.5 мм. Тела покрыты ризоидами. При максимальной концентрации (по 5 мг/л каждого) образуется также до 3–5 шт. корнепобегов, но их размер превышает 4.0 мм. Формирующийся в этом случае корнепобег содержит лишь единичные ризоиды. В случаях преобладания в среде ИМК (3:1 и 5:1) также наблюдается слабая мультипликация корнепобегов (образуется 2–4 шт.), но они принимают корнеподобно вытянутые формы и обильно опушены ризоидами. В остальных случаях наблюдается менее выраженная мультипликация корнепобегов.

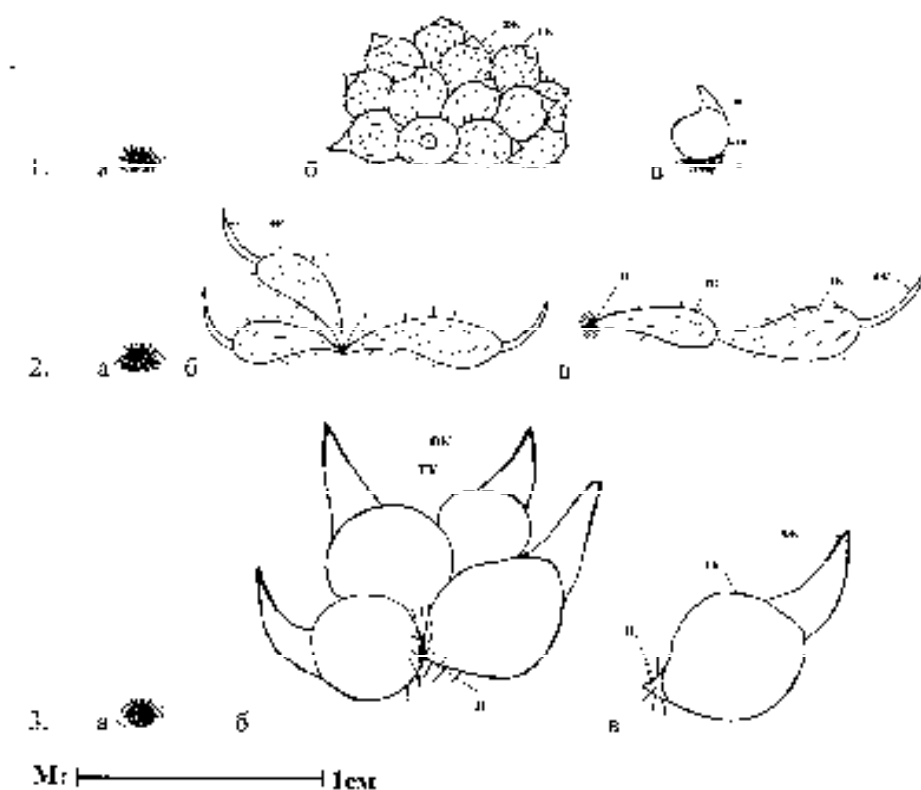


Рис. 2. Развитие и вегетативное размножение *Dactylorhiza incarnata* на ранних стадиях при различном фитогормональном режиме *in vitro* (ФК – фотосинтезирующая часть корнепобега; ТК – тело корнепобега; П – протокорм) при соотношениях ИМК:6-БАП 1:1 (1), 5:1 (2), 5:5 мг/л (3) (а – протокорм; б – образовавшаяся колония корнепобегов; в – отдельный корнепобег)

Таблица 1

Морфометрические характеристики корнепобегов *Dactylorhiza incarnata*

Вариант среды с соотношением ИМК:6-БАП (мг/л)	Морфометрические параметры ( $M \pm m$ )		
	Кол-во дочерних корнепобегов, шт.	Длина фотосинтезир. части корнепобега, мм	Диаметр корнепобега, мм
0:0 (контроль)	–	0.6±0.2	1.0±0.1
1:1	10.0±2.1	2.7±0.4	2.3±0.9
1:3	2.5±1.0	1.5±0.9	2.2±0.5
1:5	2.6±1.5	1.5±0.6	2.4±1.1
3:1	3.0±1.3	2.8±1.1	2.4±0.9
3:3	5.1±2.2	1.4±0.3	2.5 ±0.9
3:5	1.5±0.7	2.1±0.9	2.9±1.6
5:1	3.2±1.4	7.1±3.8	3.3±1.1
5:3	1.5±0.6	3.5±0.9	2.9±1.2
5:5	5.0±1.0	4.3±1.7	4.3±1.7

**Анализ потенциала вегетативного размножения на стадии первичного корнепобега (на примере *Gymnadenia conopsea*)**

Для эксперимента использовали стерильные первичные корнепобеги *Gymnadenia conopsea*, полученные *in vitro* после высева семян, собранных из естественной популяции на территории Нижегородской области. Для исследований использовалась схема опытных вариантов, аналогичная предыдущей.

Как показывают результаты эксперимента (рис. 3, табл. 2), у *Gymnadenia conopsea* при влиянии гормонов в равном соотношении ИМК и 6-БАП по 1 мг/л наблюдается образование в основании первичного корнепобега (из первичного протокорма) вторичного протокорма и на нем формируется почка дочернего корнепобега. Корни развиты хорошо. При соотношении гормонов 1:3 зачаток дочернего корнепобега образуется на первичном протокорме. Периодически на нем дополнительно образуется вторичный протокорм. Корни развиты хорошо. При преобладании 6-БАП (1:5) на первичном протокорме образуется почка

дочернего корнепобега и клубневидный, плохо развитый корень. Увеличение концентрации гормонов в 3 раза при соотношении 1:1 (по 3 мг/л) ведет также к образованию на первичном протокорме почки дочернего корнепобега, но при этом корень укорочен, клубневидный (в 2–3 раза больше корнепобега). Образуются вторичные протокормы. При значительном увеличении концентрации ИМК наблюдается корневидное вытягивание тела первичного протокорма, а в его основании обильно образуются клубневидные корни. При увеличении содержания 6-БАП (3:5) вторичные протокормы отсутствуют.

В целом, основываясь на полученных данных, можно заключить следующее:

1. На ранних стадиях развития у тубероидных орхидных отмечается активное вегетативное размножение при сравнительно невысоком фитогормональном фоне питательной среды *in vitro* (повидимому, подобные закономерности можно наблюдать и в природных популяциях, так как подобный гормональный фон может формироваться в ризосфере материнских растений в результате прижизненных выделений апексов корней, деятельности ИУК-синтезирующих бактерий и т.д.).

Таблица 2

Морфометрические характеристики корнепобегов *Gymnadenia conopsea*

Вариант среды с соотношением ИМК:6-БАП (мг/л)	Морфометрические параметры ( $M \pm m$ )			
	Первичный корнепобег		Дочерние корнепобеги	
	Диаметр, мм	Длина фотосинтезир. части, мм	Количество, шт.	Диаметр, мм
0:0 (контроль)	2.6±0.5	5.0±1.9	–	–
1:1	3.4±0.7	7.9±2.1	0.4±0.1	1.7±0.2
1:3	3.9±0.7	8.1±3.0	0.3±0.1	1.8±0.5
1:5	2.9±0.6	3.9±1.7	1.1±0.4	1.6±0.3
3:1	3.4±0.6	5.8±2.0	0.5±0.2	2.1±1.0
3:3	3.4±0.5	4.8±2.3	1.6±0.5	3.6±1.4
3:5	3.5±0.9	4.6±1.5	0.6±0.1	2.6±1.6
5:1	3.1±0.8	6.5±2.6	0.5±0.3	2.1±0.6
5:3	2.9±0.5	6.7±2.9	0.3±0.2	1.7±0.8
5:5	4.1±1.5	8.6±3.1	0.2±0.1	3.8±1.2

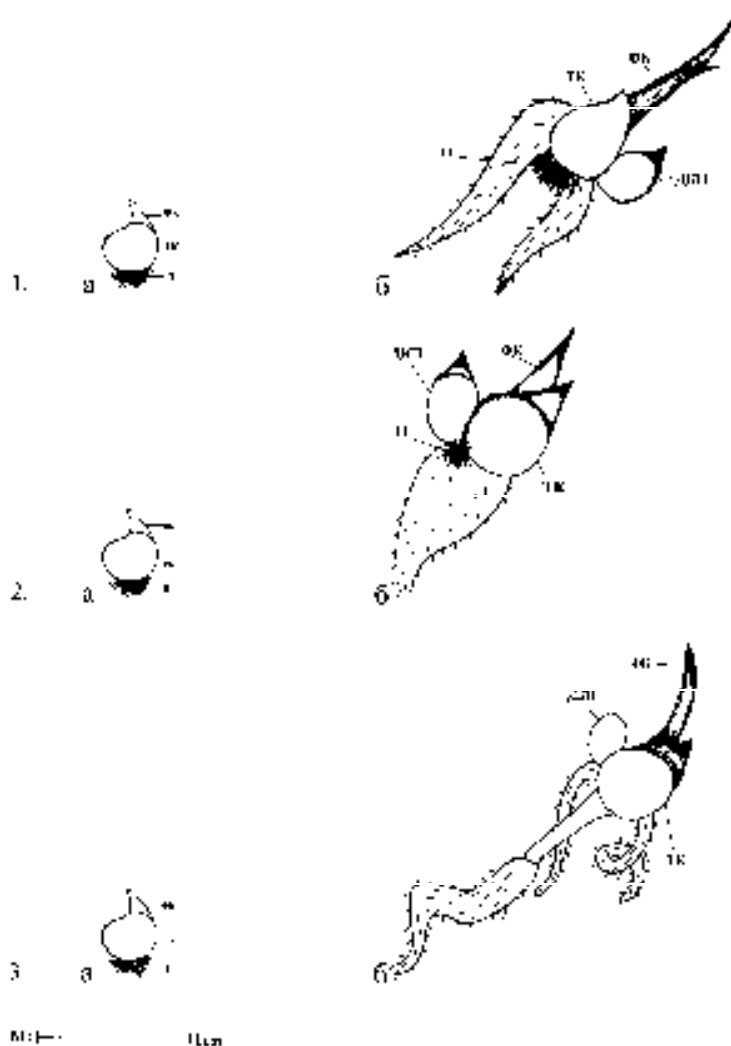


Рис. 3. Развитие и морфогенез корнепобега *Gymnadenia conopsea* на ранних стадиях при различном фитогормональном режиме *in vitro* (ДКП – дочерний корнепобег) при соотношениях ИМК:6-БАП 1:3 (1), 3:3 (2), 5:1 мг/л (3) (а – исходный корнепобег; б – корнепобег после воздействия гормонов)

2. Наиболее эффективно вегетативное размножение происходит на начальной стадии формирования на протокоме первичного корнепобега, посредством массовой закладки дочерних корнепобегов. Образование последних в небольшом количестве возможно и на стадии первичного корнепобега. Однако в этом случае формирование дочерних корнепобегов осуществляется посредством закладки в основании корнепобега вторичных протокомов.

3. Максимальный эффект мультипликации корнепобегов наблюдается на питательной среде с равным содержанием ауксина и цитокинина в количестве по 1 мг/л, и при этом развитие растения идет без морфологических отклонений (в отличие от вариантов с преобладанием одного из гормонов).

4. В результате наблюдений выявлено, что каждый протоком способен сформировать (за двухмесячный экспериментальный период) до 12 хорошо развитых корнепобегов, что и характеризует высокий потенциал вегетативного размножения.

5. Основываясь на полученных данных, можно констатировать, что при различном фитогормональном режиме (как при равных соотношениях ауксина и цитокинина, так и при преобладании одного из них) органогенез идет в различных направлениях. В одних случаях активно развивается первичный корень (при соотношении фитогормонов с явным преобладанием ауксина). В других – наблюдается активный рост и гипертрофирование размеров тела первичного корнепобега и корня (при высоком содержании цитокинина).

## Список литературы

1. Коломейцева Г.Л., Широков А.И. Особенности начальных стадий онтоморфогенеза у представителей семейства *Orchidaceae* Juss. // Биологический вестник. Харьков, 2008. Т. 12. № 2. С. 88–91.
2. Rasmussen H.N. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, 1995. 433 p.
3. Вахрамеева М.Г., Денисова Л.В., Никитина С.В., Самсонова С.К. Орхидеи нашей страны. М.: Наука, 1991. 224 с.
4. Татаренко И.В. Орхидные России: жизненные формы, биология, вопросы охраны. М.: Аргус, 1996. 208 с.
5. Батыгина Т.Б., Шевцова Г.Г. Метаморфоз в онтогенезе орхидных (на примере *Cymbidium hybridum*, *Orchidaceae*) // Ботанический журнал. 1985. Т. 70. № 12. С. 1614–1621.
6. Красная Книга Нижегородской области. Т. 2. Н. Новгород: Изд-во ОАО «Чебоксарская типография № 1», 2005. 360 с.
7. Malmgren S. *Orchid propagation: theory and practice*. North American Native Terrestrial Orchids «Propagation and Production». Conference proceedings. Washington, 1996. P. 63–71.

**THE ANALYSIS OF VEGETATIVE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF TUBEROID ORCHIDS  
AT EARLY DEVELOPMENT STAGES *IN VITRO***

*L.A. Kryukov, A.I. Shirokov, V.V. Syrova*

The results are presented of the vegetative reproductive potential analysis of tuberoid orchids (*Dactylorhiza incarnata*, *Gymnadenia conopsea*) at early development stages under the action of IBA and 6-BAP *in vitro*. Optimum concentrations and phytohormone ratios for the maximum effect of vegetative reproduction have been established.

*Keywords:* orchids, protocorm, phytohormones, *in vitro*, cloning, rare species.