

УДК 581.44:582.594.2

**ПОЛИВАРИАНТНОСТЬ ОНТОГЕНЕЗА *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo
В СВЯЗИ С ВЕГЕТАТИВНЫМ РАЗМНОЖЕНИЕМ ПРОТОКОРМОВ *IN VITRO***

© 2011 г.

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

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

aishirokov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2011

Определена и изучена поливариантность онтогенеза *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo. в связи с вегетативным размножением протокормов на начальных стадиях развития под воздействием фитогормонов *in vitro*. Установлены оптимальные концентрации и соотношения фитогормонов для максимального эффекта вегетативного размножения.

Ключевые слова: вегетативное размножение, клонирование, культивирование, орхидные, онтогенез, поливариантность, протокорм, редкие виды, фитогормоны, *in vitro*.

Пальчатокоренник мясокрасный – *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó является представителем семейства *Orchidaceae*. По классификации И.В. Татаренко [1] данный вид относится к вегетативным однолетникам с пальчатораздельным стеблеклубневым тубероидом. Пальчатокоренник мясокрасный распространен по всей Европе и характеризуется как Евроазиатский (палеоарктический) вид. В Азии ареал охватывает территорию, включающую Малую Азию, Иран, Северный Кавказ, Сибирь, Монголию, Северо-Западный Китай. В России встречается в европейской части от Карелии до Волжско-Донского района, Нижней Волги, Заволжья и Предкавказья, в Западной и Восточной Сибири до Якутии [2]. В экологическом плане пальчатокоренник мясокрасный характеризуется как лугово-болотный вид. Он встречается преимущественно на сырых участках сырых и пойменных лугов, по берегам водоемов, на низинных и переходных болотах. Может заходить в лесостепные районы, расти на горных лугах, приморских дюнах, иногда даже на засоленных почвах. Вид занесен в Красную книгу Нижегородской области.

К настоящему времени накоплен значительный опыт по выращиванию орхидных умеренной зоны *in vitro* из семян с целью изучения особенностей их развития, охраны и введения в культуру [3–11]. Согласно современным представлениям о начальных стадиях развития орхидных [9, 10], естественный процесс онтоморфогенеза можно разделить на следующие стадии: семя → протокорм → первичный побег (проросток) и т. д. В литературе широко обсуждается, с одной стороны, вопрос о слабой спо-

собности взрослых особей тубероидных орхидных в природных популяциях к вегетативному размножению [1, 12], а с другой – способность активного размножения протокормов практически всех орхидных *in vitro* [4–6, 9, 10].

Изучение начальных стадий онтогенеза *Dactylorhiza incarnata* осуществлялось на базе учебно-научной биотехнологической лаборатории микрклонального размножения растений Ботанического сада Нижегородского госуниверситета. Для высева на стерильные агаризованные питательные среды *in vitro* использовались семена, собранные из естественной популяции на территории Н. Новгорода. Посев производился недозрелыми семенами [8], собранными в период с 5 по 10 июля 2009 и 2010 гг. Для постановки экспериментов была выбрана агаризованная питательная среда, предложенная С. Мальмгрин [11], которая характеризуется отсутствием неорганического азота, а в качестве ее основы выступает комплекс 16-ти аминокислот. Она идеально моделирует условия микотрофного питания проростков. Среда разливалась в колбы объемом 100 мл по 20 мл в каждую колбу, после чего стерилизовалась в автоклаве. Семена высевались из стерилизованных коробочек (каждая коробочка содержалась 2–3 минуты в 96%-ном спирте, а затем прожигалась в пламене горелки) на поверхность среды в стерильном ламинарном шкафу, затем колбы запечатывались фольгой. Посевы содержались в темноте в условиях кондиционируемой камеры при температуре 20⁰С.

При изучении онтогенеза ставилась цель – выявление естественного потенциала вегетативного размножения *Dactylorhiza incarnata* in

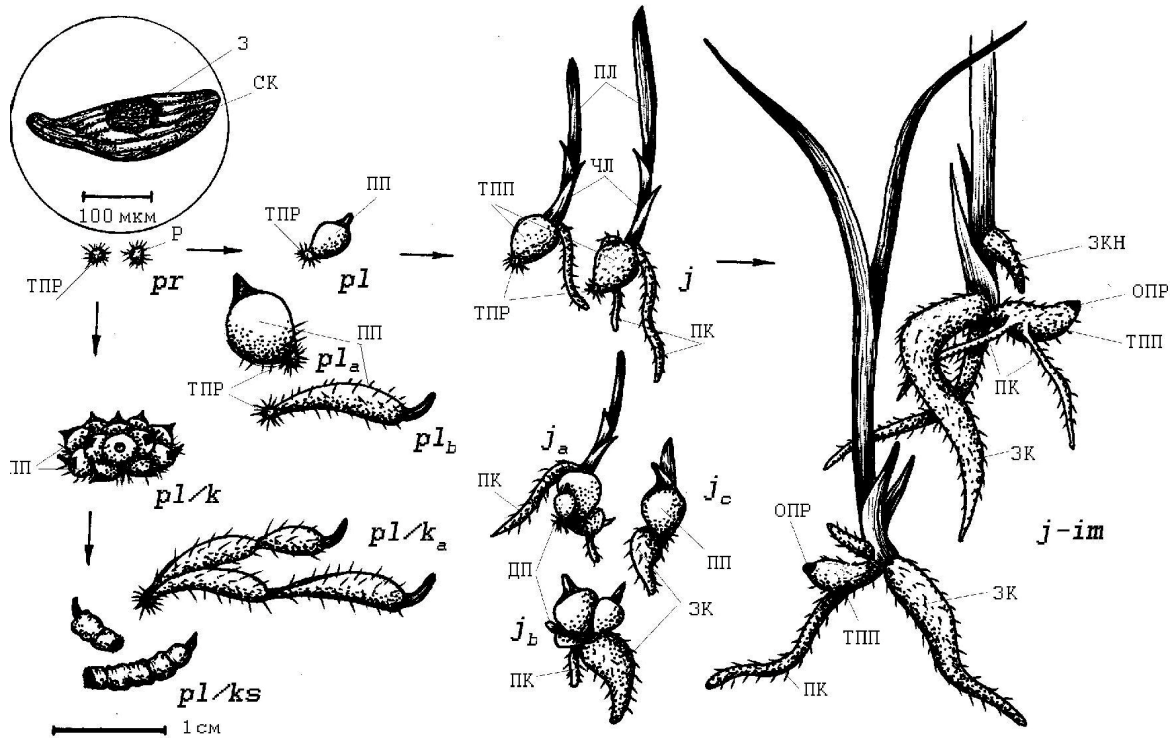


Рис. 1. Онтогенез *D. incarnata* *in vitro*. Онтогенетические состояния: *sm* – семя; *pr* – протокорм; *pl* – проросток; *pl_a* – увеличенный проросток (повышенный гормональный фон); *pl_b* – корневидно удлиненный проросток (повышенное содержание ауксина в среде); *pl/k* – колония проростков; *pl/k_a* – колония корнеподобных проростков; *pl/ks* – стареющая колония проростков; *j* – ювенильное; *j-im* – ювенильно-имматурное. Условные обозначения: З – зародыш; СК – семенная кожура; ТПР – тело протокорма; Р – ризоиды; ПП – первичный побег; ТПП – тело первичного побега; ПК – первичный корень; ПЛ – первичный лист; ЧЛ – чешуевидные листья; ДП – дочерний побег; ЗК – запасующий корень; ОПР – отмерший протокорм; ЗКН – запасующий корень ной волны роста

in vitro на стадии развития «протокорм» под воздействием фитогормонов. При этом в качестве основных задач выступали:

- определение оптимальных фитогормональных условий вегетативного размножения протокормов;
- выявление максимального эффекта вегетативного размножения протокормов.

Было приготовлено 9 вариантов среды С. Мальмгрин с различной концентрацией фитогормонов и соотношениями ауксина (ИМК) и цитокинина (6-БАП), равными 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 помещалось по 3 протокорма *Dactylorhiza incarnata*. Затем они содержались на затененном стеллаже при температуре 20⁰С на протяжении двух месяцев.

Семена пальчатокоренника мясокрасного в условиях центральной части Европейской России окончательно созревают в конце июля – начале августа. Общеизвестно, что семена орхидных, как и представители некоторых других высокоспециализированных таксонов (*Orobanchaceae*, *Burmanniaceae*), являются наиболее

мелкими среди покрытосеменных растений. Длина семени в исследуемой популяции в среднем составляет 257.9±29.7 мкм, ширина – 86.3±6.7 мкм. Семя образует крыловидные расширения, которые, как и малые размеры семени и внутрисеменные полости, заполненные воздухом, являются приспособлением к анемохории. Один конец семени крючкообразно загнут (рис. 1, *sm*). Поверхность семени ячеистая. Эндосперм редуцирован. Зародыш, как и у всех орхидных, развит слабо и не образует зародышевых органов. Его диаметр – 89.9±8.3 мкм. Зрелые семена отличаются ярко выраженным покоем, который поддерживается плотной семенной кожурой и накоплением в ней различных ингибиторов роста. Поэтому посев семян пальчатокоренника мясокрасного *in vitro* осуществлялся нами недозрелыми семенами (стадия окончательного формирования семени, но без опробковения семенной кожуры). Эта стадия наступает через 25–30 дней после начала цветения.

Протокормы. Под протокормом понимают начальную стадию развития проростка, его формирование связано с прорастанием недифференцированного зародыша. Понятие «прорастание» применительно к семенам орхидей весь-

ма условно, так как нет типичного «проклевывания» корешка. Прорастание начинается с растрескивания семенной кожуры, небольшого высовывания зародыша наружу и образования на его эпидерме волосков. Современные исследования [3] показывают, что для прорастания семени в природных условиях не требуется повреждения семенной кожуры грибом. Однако рост протокормов останавливается на ранних стадиях развития без проникновения в них грибов *Rhizoctonia sp.*

При посеве незрелых семян пальчатокоренника мясокрасного на стерильные питательные среды протокормы появляются на 15–20 день. Их размер – 0.7–2.5 мм. Протоком (рис. 1 *pr*) белого цвета, радиально симметричен, имеет шаровидную форму, и вся его поверхность густо покрыта эпидермальными волосками, значительно превышающими по длине диаметр протокорма. В дальнейшем верхняя (апикальная) часть протокорма несколько разрастается и на ней закладывается почка с зачатками первых листьев. Продолжительность данного онтогенетического состояния *in vitro* (в зависимости от фитогормонального фона) от 1 до 3 месяцев.

Проростки. В литературе имеется много разногласий с выделением ранних стадий онтоморфогенеза у орхидных [4, 9]. На наш взгляд, стадия проростка наступает с закладки на верхушке протокорма почки с зачатками первых листьев (рис. 1, *pl*). Этот процесс сопровождается разрастанием апикальной части протокорма, над ним как бы формируется новая структура, которую можно рассматривать как первичный побег. Он представляет собой продолговато-шаровидное образование от 3 до 8 мм в диаметре. Крупных размеров (более 5 мм в диаметре) тело первичного побега достигает при высоком фитогормональном фоне в среде, соотношение ауксина и цитокинина 5:5 (рис. 1, *pl a*). При высоком содержании в питательной среде только ауксина наблюдается корневидное вытягивание тела первичного побега (рис. 1, *pl b*). На апикальной (верхней) части располагается почка, а на дистальной (нижней) – сохраняется протокорм. Шаровидно (в некоторых случаях веретеновидно-удлиненно – рис. 1, *pl b*) разросшееся основание первичного побега, так же как и протокорм, имеет белую окраску, его поверхность, как правило, не покрыта волосками (или их количество не значительно). При этом на апикальной части протокорма может заложиться не одна почка первичного побега, а несколько (по нашим наблюдениям до 12 шт.). В этом случае формируется колония проростков (рис. 1, *pl/k*). Это еще раз подтверждает тот факт, что протокорм и первичный побег (про-

росток) – это вполне отдельные, самостоятельные образования. При длительном клонировании *in vitro* протокормов (под воздействием фитогормонов) без частых пересадок на свежие питательные среды, со временем, перестают образовываться новые первичные побеги, а стареющий первичный побег вместо перехода в ювенильное онтогенетическое состояние начинает нарастать моноподиально и формировать на верхушке новый первичный побег. В результате наблюдаются «колбаскообразные» удлиненные (до 15–25 мм длиной) стареющие первичные побеги (рис. 1, *pl/ks*). Как правило, на этой стадии развития растения требуют охлаждения в холодильнике (при температуре 4⁰С) на протяжении 2–4 месяцев. Без такого периода покоя растения затормаживаются в развитии и вследствие фенольных выделений растения буреют и отмирают в массовом порядке. Продолжительность онтогенетического состояния проростка *in vitro* (в зависимости от фитогормонального фона и температуры инкубирования) от 2 до 6 месяцев.

Ювенильные. Переход к ювенильному состоянию (рис. 1, *j*) связан с началом автотрофного питания – у растения появляется первый зеленый лист от 2 до 6 см длиной. Лист имеет линейно-шиловидную форму, но в условиях питательных сред он часто плотно свернут в трубочку (аналогично первым листьям злаков). Вторым признаком является появление первых придаточных корней в числе 1–2 шт. При высоком фитогормональном фоне среды наблюдается слабая способность к формированию дочерних первичных побегов (рис. 1, *j a, b*). В этих же условия придаточные корни могут приобретать запасающий характер, значительно разрастаясь в диаметральном направлении (рис. 1, *j b, c*). Нижняя (как бы подземная) часть первичного побега увеличивается в размере почти в 2 раза до 8–10 мм. В ее основании хорошо заметно тело протокорма. Продолжительность данного онтогенетического состояния *in vitro* (в зависимости от фитогормонального фона) от 2 до 4 месяцев. Дальнейшее культивирование растений возможно лишь при строгом чередовании условий содержания: 2–3 месяца в холодильнике, 2–3 месяца на стеллаже с подсветкой. Без холодных периодов покоя растения погибают из-за выделения ими в среду фенольных соединений, которые в природных условиях, по видимому, выполняют функцию химической защиты от серьезных поражений ризоктониозом.

Ювенильно-имматурные. Главным признаком перехода от ювенильного онтогенетического состояния к имматурному у тубероидных орхидных, в природных условиях, является

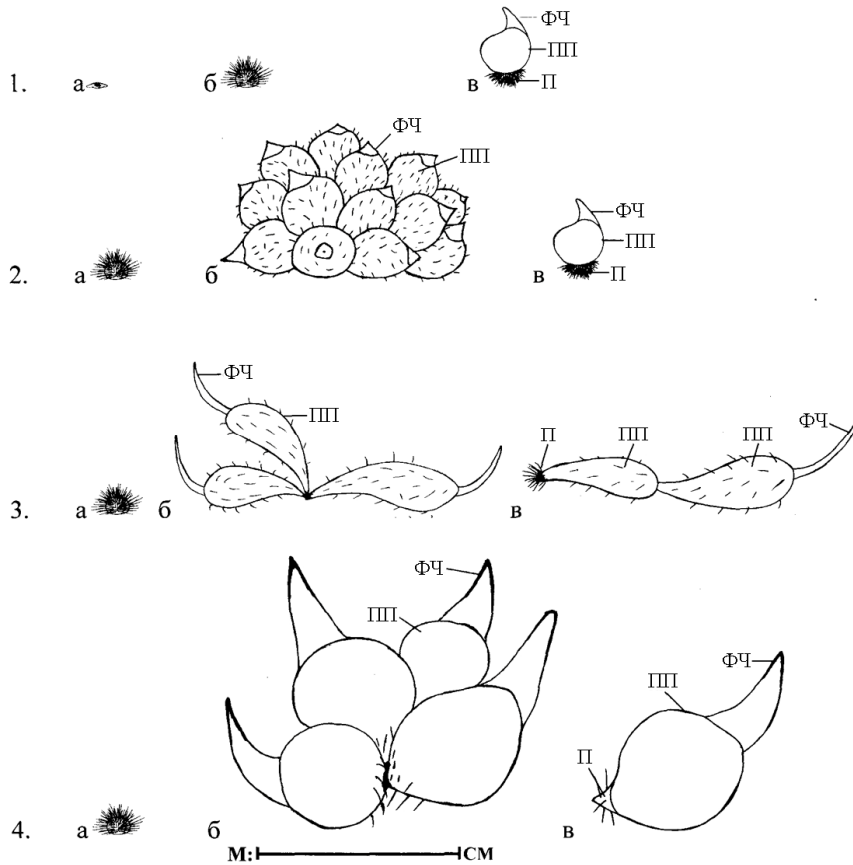


Рис. 2. Развитие и вегетативное размножение *Dactylorhiza incarnata* на ранних стадиях при различном фитогормональном режиме *in vitro* (ФЧ – фотосинтезирующая часть первичного побега; ПП – тело первичного побега; П – протокорм): 1 – типичное развитие (контроль) (а – семя; б – протокорм; в – первичный побег (проросток)); 2 – Развитие при соотношении ИМК:6-БАП = 1:1 мг/л (а – протокорм; б – образовавшаяся колония проростков; в – отдельный первичный побег); 3 – Развитие при соотношении ИМК:6-БАП = 5:1 мг/л (а – протокорм; б – образовавшаяся колония проростков; в – отдельный первичный побег); 4 – Развитие при соотношении ИМК:6-БАП = 5:5 мг/л (а – протокорм; б – образовавшаяся колония проростков; в – отдельный первичный побег)

смена способа нарастания побега – с моноподиального на симподиальный (т.е. в основании надземного побега закладывается молодой тубероид с почкой). Однако при длительном культивировании (до 4 лет) растений на питательных средах *in vitro* обнаружено, что перехода к имматурному состоянию не происходит – растение продолжает развиваться моноподиально. При этом остальные признаки соответствуют имматурному состоянию. Поэтому мы выделяем ювенильно-имматурное онтогенетическое состояние. В этом состоянии дальнейшее развитие останавливается. Растение можно культивировать достаточно долго. При увеличении гормонального фона среды можно получать дочерние ювенильные растения.

В этом онтогенетическом состоянии (рис. 1, *j-im*) растение имеет 2–3 зеленых линейно-шиловидных листа, достигающих длины до 13 см. Они сложены по средней жилке и окончательно пластинка не раскрывается. В нижней (как бы подземной) части хорошо различается побуревшее тело первичного побега, в основа-

нии которого идентифицируется отмерший протокорм. С каждой новой волной роста образуются 1–2 новых придаточных корня, часто клубневидно утолщающихся (переход к запасным корням). При этом тубероиды не образуются, а их функцию выполняют запасные корни. Листья также буреют и отмирают, а с новой волной роста развиваются новые.

* * *

Как показывают наши исследования, активное вегетативное размножение у тубероидных орхидных наблюдается на начальной стадии формирования первичного побега (рис. 2) при содержании в питательной среде фитогормонов индолилмасляной кислоты и 6-бензоаминопурина. Гормоны в равном соотношении оказывали выраженный мультиплицирующий эффект. При содержании в количестве по 1 мг/л протокорм образует до 8–12 шт. первичных побегов, размер их соответствует контрольному. Их поверхность плотно покрыта ризоидами. При уве-

личении доли гормонов в среде до 3 мг/л количество первичных побегов на протокорме 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. первичных побегов, но их размер превышает 4.0 мм. Формирующийся в этом случае первичный побег содержит лишь единичные ризоиды. В случаях преобладания в среде ИМК (3:1 и 5:1) также наблюдается слабая мультипликация первичных побегов (2–4 шт.), но они принимают корнеподобно вытянутые формы и обильно опушены ризоидами. В остальных случаях наблюдается менее выраженная мультипликация первичных побегов.

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

1. На ранних стадиях развития у тубероидных орхидных отмечается активное вегетативное размножения при сравнительно невысоком фитогормональном фоне питательной среды *in vitro* (по-видимому, 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.).

2. Максимальный эффект мультипликации первичных побегов 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).

3. В результате полученных наблюдений каждый протокорм способен сформировать (за 2 месячный экспериментальный период) до 12 хорошо развитых первичных побегов, что и характеризует высокий потенциал вегетативного размножения.

Список литературы:

1. Татаренко И.В. Орхидные России: жизненные формы, биология, вопросы охраны. М.: Аргус, 1996. 208 с.
2. Вахромеева М.Г. Род пальчатокоренник. Биологическая флора Московской области. 2000. Вып. 14. С. 55–86.
3. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. О методах размножения орхидных умеренной зоны в культуре *in vitro* // Бюл. Главного ботан. сада. М.: Наука, 1998. С. 125–131.
4. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Репродуктивная стратегия орхидных умеренной зоны // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция. Системы репродукции/ под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 2001. Т. 3. С. 442–446.
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. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб: Изд-во СПб ГУ, 2002. 232 с.
7. Андреева Е.В., Куликов П.В., Филиппов Е.Г., Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Проблемы и перспективы семенного размножения *in vitro* орхидных умеренной зоны // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция. Системы репродукции. Под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 2000. Т. 3. С. 513–524.
8. 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.
9. 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.
10. Rasmussen H.N. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge: University Press, 1995. 433 p.
11. Malmgren S. Orchid propagation: theory and practice. North American Native Terrestrial Orchids «Propagation and Production» Conference proceeding. Washington, 1996. P. 63–71.
12. Вахромеева М.Г., Денисова Л.В., Никитина С.В., Самсонова С.К. Орхидеи нашей страны. М.: Наука, 1991. 224 с.

MULTIPLICITY OF ONTOGENETIC PATTERNS OF *Dactylorhiza incarnata* (L.) *Soo* IN CONNECTION WITH PROTOCORM VEGETATIVE PROPAGATION *IN VITRO*

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

The multiplicity of ontogenic patterns of *Dactylorhiza incarnata* (L.) *Soo* due to vegetative propagation of protocorms at their early stages of development has been determined and studied under the influence of phytohormones *in vitro*. Phytohormone optimal concentrations and ratios to maximize the effect of vegetative propagation are found.

Keywords: vegetative propagation, vegetative cloning, cultivation, orchids, ontogeny, multiplicity, protocorm, rare species, phytohormones, *in vitro*.