

УДК 581.1

## **ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ПАРОСТКІВ ОРХІДНИХ У КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ТА *IN VIVO***

© 2011 р. О. А. Шейко, Л. І. Мусатенко

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного*  
*Національної академії наук України*  
*(Київ, Україна)*

Незважаючи на те, що морфогенез паростків орхідних помірної зони вивчається з середини ХІХ століття, особливості розвитку багатьох представників цієї групи у природних місцезнаходженнях дотепер досліджені недостатньо. Метод асимбіотичного культивування паростків *in vitro* дозволяє істотно полегшити вивчення ранніх стадій онтогенезу орхідних помірної зони, але питання про відповідність процесів морфогенезу в асимбіотичній культурі і в природних умовах залишається дискусійним. Істотні відмінності між умовами зростання у природі і в асимбіотичній культурі можуть спричинити виникнення *in vitro* форм постнасінневого розвитку протокормів, які різко відрізняються від природних форм. Подібні явища розглядаються як приклад морфологічної адаптації, яка ілюструє пластичні реакції орхідних під впливом зміщення балансу фітогормональної системи. Значна кількість генетичних змін, які тестуються в культивованих *in vitro* клітинах, має зворотній характер. Також в огляді охарактеризовано основні варіанти проходження початкових етапів морфологічного розвитку, які можна спостерігати в культурі *in vitro*.

**Ключові слова:** *Orchidaceae*, культура *in vitro*, *in vivo*, морфогенез

За останні десятиріччя ХХ ст. для вивчення проблеми морфогенезу разом із класичними описовими методами (гістохімічними, електронно-мікроскопічними та ін.) великого значення набув експериментальний метод культури клітин, тканин і органів. Теоретично, в культурі *in vitro* майже кожен тотипотентну клітину рослинного організму можна спрямувати на різні шляхи розвитку, створивши їм певні умови (Бутенко, 1999; Батыгина, Васильева, 2002; Кушнир, Сарнацкая, 2005). Встановлено, що диференціація тотипотентних клітин популяції *in vitro* залежить від виду рослини та генотипу рослини-донора, від органа рослини та характеристик клітин експланту цього органа, від умов культивування (різних поживних середовищ, екзогенних гормональних факторів, стимуляторів), від фізичних факторів культивування (фотоперіоду, якості та інтенсивності освітлення, температурного режиму, рН, аерації) (Синнот, 1963; Батыгина, Васильева, 1978; Черевченко и др., 2008).

Показано, що при інтродукції змінюються лінійні розміри рослин, їх листків, квіток, суцвіть і плодів, а також їх кількість та якісні характеристики (Собко, Нефедова, 1983; Кондратюк, Остапко, 1990). Такі зміни спостерігалися і в процесі багаторічних досліджень рідкісних і зникаючих видів рослин флори України (Собко, 1983; Гавриленко, 1990; Гапоненко, 1995). До таких видів належить і родина *Orchidaceae* Juss. – орхідні або зозулинцеві, яка є однією з найбільших родин покритонасінних рослин, що налічує від 17000 до 35000 видів. Найчисленніші епіфітні орхідні у тропічних і субтропічних областях. Центром родової і видової різноманітності орхідей є тропічна Америка, де налічується до 306 родів, які об'єднують 8266 видів (Черевченко та ін., 2001).

Рідкісність орхідей, скорочення їх чисельності зумовлені як впливом природних чинників (відсутністю у біотопі грибів-мікоризотворювачів і специфічних комах-запилювачів), так і антропогенною дією (Филиппов, 1997; Куликов, Филиппов, 2000; Маракаев, Титова, 2001; Коломийцева, 2002; Bonnardeaux et al., 2007).

## ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ПАРОСТКІВ ОРХІДНИХ

Нині орхідеї перебувають на стадії активної еволюції, що підтверджується будовою генеративної сфери в особин одного виду і значною кількістю міжвидових та міжродових гібридів. Вегетативні органи консервативніші, їх будова характеризує пристосованість рослин до кліматичних, едафічних і фітоценотичних умов існування, що виникла у процесі еволюції (Терехин, 2000; Белюченко, Перебора, 2003).

У природних умовах орхідні здатні до вегетативного та насінневого розмноження, проте для відновлення популяцій природного відтворення недостатньо у зв'язку з їх біоекологічними особливостями (Dafni, 1987; Собко, Гапоненко, 1999; Перебора, 2002; Johnson, Peter et al., 2003). Більшість видів належить до рідкісних та тих, що зникають (Ferdy, Loriot et al., 2001; Flores-Palacios, Valencia-Diaz, 2007; Jacquemyn, Honnay et al., 2007). Тому актуальною є розробка методів прискореного розмноження, введення у культуру, репатріація цих видів у природу, а також створення генетичних банків і колекцій для збереження і розширення генофонду. Незважаючи на те, що вже накопичений великий досвід розмноження орхідей і проведені численні фундаментальні і прикладні дослідження, поки що не всі види піддаються успішному розмноженню штучним шляхом (Собко, Нефедова, 1983; Теплицкая, Попкова и др., 2002). Тому вивчення репродуктивних особливостей орхідних помірної зони залишається актуальним.

Незважаючи на те, що морфогенез паростків орхідних помірної зони вивчається з середини XIX століття, особливості розвитку багатьох представників цієї групи у природних місцезнаходженнях дотепер досліджені недостатньо.

Метод асимбіотичного культивування паростків *in vitro* дозволяє істотно полегшити вивчення ранніх стадій онтогенезу орхідних помірної зони. Перші спроби пророщування насіння орхідних на живильних середовищах без грибів були зроблені після відкриття Бернардом у 1899 р. факту, що у процесі життєдіяльності у тканинах рослин крохмаль перетворюється на цукри (Bernard, 1909). Він дійшов висновку, що мікоризу можна замінити поживними речовинами з високою концентрацією сахарози. Експерименти в цьому напрямі продовжив Knudson (1946), завдяки чому значно зросла популярність орхідних. Суть розробленого методу полягає у використанні для пророщування насіння і розвитку паростків стерильних поживних середовищ, які містять сбалансований склад макро- і мікроелементів, вуглеводів,

вітамінів, регуляторів росту, амінокислот. При цьому проростання насіння відбувається без симбіотичного гриба, функцію якого (живлення зародка, що розвивається без вуглеводів) виконує живильне середовище. Головні переваги асимбіотичного насінневого розмноження порівняно з симбіотичним (для слабо мікотрофних орхідних, наприклад, тропічних) – простота, надійність, контрольованість і відтворюваність результатів, відсутність проблем, пов'язаних з підтриманням культур симбіотичних грибів і мінливістю їх активності. Питання про відповідність процесів морфогенезу в асимбіотичній культурі і в природних умовах залишається дискусійним (Дударь, 1967; Соболевская, 1984; Куликов, 1995; Попкова, Митрофанова, 1997).

Вважають, що відмінності між паростками орхідних, які розвиваються *in vitro* та *in vivo*, стосуються лише незначних деталей, наприклад форми і ступеня потовщення протокормів (Veuret, 1974; Батыгина, Васильева и др., 1978). Проте, істотні відмінності між умовами зростання у природі і в асимбіотичній культурі можуть спричинити виникнення *in vitro* форм постнасінневого розвитку, які різко відрізняються від природних форм (Куликов, 1995; Филлипов, 1997).

В асимбіотичних паростках *Cypripedium* L. може спостерігатися формування вторинних протокормоподібних структур, утворення кількох точок росту на одному протокормі, формування калюсу, що не характерно для паростків у природних умовах. На подальших стадіях розвитку паростки *Cypripedium* і *Listera ovata* (L.) R. Br. відрізняються від тих, що спостерігаються в природі, суттєвим збільшенням кількості і розмірів додаткових коренів, які утворюються на первинному пагоні до формування надземного асимілюючого листка, а також схильністю осей первинних пагонів до розгалуження.

У асимбіотичних паростків *Calypso bulbosa* (L.) Oakes швидко формується пагін з одним зеленим листком і туберидієм, а вже після цього починається розростання базальної частини протокорму, що призводить до формування коралоподібної структури. У природних умовах, навпаки, таке розростання протокорма відбувається перед розвитком надземного пагона.

У представників триби *Orchideae* (Dressler and Dods) Verm. на ранніх стадіях розвитку *in vitro* часто зустрічається значне витягування протокормів у довжину, що не спостерігається у природних умовах. На подальших етапах роз-

витку асимбіотичні паростки відрізняються від природних (а також від тих, які вирощувались в асимбіотичній культурі) збільшенням кількості і розмірів додаткових коренів на первинному пагоні, затримкою розгортання асимілюючих листків, гальмуванням або повною відсутністю диференціації пагонів відновлення і коренебульб, які формуються на них. Замість цього частина додаткових коренів, які утворилися на первинному пагоні, потовщуються і набувають вигляду запасаючих органів. Таким чином, особливість асимбіотичних паростків видів триби *Orchideae* – триваліший моноподіальний ріст первинного пагона і затримка або повна відсутність переходу до симподіального росту. Ці особливості морфогенезу можуть бути пов'язані з впливом екзогенних регуляторів росту, які входять до складу живильних середовищ, і неоптимальним температурним режимом культивування (Андропова, Куликов и др., 2000).

Узагальнюючи результати спостережень, які були отримані під час вивчення онтогенезу сіяньців тропічних видів орхідних, Черевченко і співробітники умовно виділили два основні варіанти проходження початкових етапів морфологічного розвитку, які можна спостерігати в культурі *in vitro*.

У першому випадку з насіння формуються протокорми, які мають одну точку росту. Далі з них утворюються сіяньці, для яких на перших етапах розвитку властивий моноподіальний тип росту і ортотропний характер наростання вегетативної сфери. Встановлено, що ці сіяньці, зазвичай, не утворюють вторинних протокормів. Надалі вони формують пагони другого і подальших порядків, а після досягнення певного віку і розміру їх першими переводять в септичні умови.

У другому випадку діяльність апікальної меристеми первинного протокорму гальмується. Замість цього спостерігається активне утворення нових меристематичних центрів на тілі протокорму, що призводить до формування конгломератів вторинних протокормів. Останні або входять в фазу органогенезу, або продукують собі подібних.

У разі розвитку протокормів за другим варіантом термін культивування рослин *in vitro* збільшується вдвічі і більше (Черевченко та ін., 2008).

Співвідношення кількості сіяньців, які розвиваються за першим і другим варіантом, залежить не тільки від комплексу абіотичних чинників, що впливають на рослини, але і від

видової приналежності, тобто в основному визначається взаємодією систем генотип – живильне середовище.

У працях Купермана і Черевченко та Кушнір вказується на наявність у деяких орхідних, які пройшли період асимбіотичної культури, незвичайних індивідуумів – гіперморф (Куперман, 1977; Черевченко, Кушнір, 1986). Їх чисельність порівняно із загальною кількістю сіяньців невелика (до 0,5%); темпи росту і розвитку *in vitro* та протягом деякого часу після висаджування оранжерейні умови суттєво відрізняються від звичайних рослин. Проте після певного часу (*Cymbidium sp.* Sw. – до 2 років) цикли їх росту і розвитку нормалізуються і синхронізуються з циклами нормальних рослин. Подібні явища розглядаються як приклад морфологічної адаптації, яка ілюструє пластичні реакції орхідних під впливом зміщення балансу фітогормональної системи.

Факт загибелі частини сіяньців на ранніх етапах онтогенезу, а також наявність кількох варіантів початкових етапів онтоморфогенезу і акселерація сіяньців свідчать про те, що мінливість, яка спостерігається *in vitro*, – наслідок фізіологічної адаптації, що спричиняє морфологічну. Логічно допустити, що в сіяньцях відбуваються і специфічні перебудови геному, проте, як було показано на клітинному рівні, значна кількість генетичних змін, які тестуються в культивованих *in vitro* клітинах, не ідентифікуються в життєздатних рослинах – регенерантах (Кунах, 2001). Отже, ці зміни мають зворотній характер.

Переваги методу клонального розмноження рослин незаперечні, особливо у промисловому квітникарстві. Проте питання про його застосування як основного при розмноженні рідкісних і зникаючих видів рослин дискусійне. Воно виправдане тільки у тому разі, якщо у розпорядженні дослідників знаходяться одиничні екземпляри, які не можуть бути розмножені статевим шляхом. При клональному розмноженні істотно знижується рівень гетерогенності популяцій, які будуть відтворені надалі з таких екземплярів. Це важливий момент, на який слід звернути увагу при розробці методик розмноження як *in vitro*, так і *ex situ* (вегетативне розмноження рослин).

Таким чином, для розуміння процесу розвитку паростків у природних умовах можна спиратися тільки на вивчення морфогенезу паростків у культурі *in vitro*. З іншого боку, немає достовірних відомостей про те, що і в природ-

## ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ПАРОСТКІВ ОРХІДНИХ

них умовах розвиток паростків одного і того ж виду відбувається абсолютно однаково і не залежить від погодних умов або від географічного місцезнаходження популяції.

### ЛІТЕРАТУРА

- Андропова Е.В., Куликов П.В., Филиппов Е.Г. и др. Проблемы и перспективы семенного размножения орхидных умеренной зоны // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Е. Б. Батыгиной. – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 513-524.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – 232 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. Эмбриогенез у покрытосеменных растений // Ботан. журн. – 1978. – Т. 63, № 1. – С. 87-111.
- Белюченко И.С., Перебора Е.А. К вопросу об эволюции в семействе *Orchidaceae* Juss. // Вестн. ХНУ. – 2003. – С. 79-82.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Гавриленко Н.А. Сравнительное изучение популяций пыльцеголовников в естественных и искусственных сообществах заповедника «Кодры» // Заповедники СССР – их настоящее и будущее. Ч. 2. Ботаника, лесоведение, почвенные исследования. – Новгород, 1990. – С. 29-32.
- Гапоненко Н.Б. Модификационная изменчивость некоторых видов рода *Orchis* L. в связи с их интродукцией и акклиматизацией // Особенности акклиматизации многолетних интродуцентов, накапливающих биологически активные вещества. – Краснодар: Кубанский гос. аграрн. ун-т, 1995. – С. 46-50.
- Дударь Ю.А. Морфогенез *Orchis tridentata* в условиях культуры // Бюл. Главн. ботан. сада. – 1967. – Вып. 64. – С. 55-58.
- Коломийцева Г.Л. Орхидеи и их опылители // Наука и жизнь. – 2002. – № 8. – С. 141-145.
- Кондратюк Е.Н., Остапко В.М. Редкие, эндемичные и реликтовые растения юго-востока Украины в природе и культуре. – Киев: Наук. думка, 1990. – 152 с.
- Куликов П.В. Экология и репродуктивные особенности редких орхидных Урала: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 1995. – 22 с.
- Куликов П.В. Семенное и вегетативное размножение орхидных Урала в природе и культуре *in vitro* // Биол. разнообразие. Интродукция растений. Мат-лы. науч. конф. – СПб. – 1995. – С. 202-203.
- Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Репродуктивная стратегия орхидных умеренной зоны // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. / Ред. Т.Б. Батыгиной. – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 510-513.
- Кунах В.А. Эволюция геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – Т. 1. – С. 53-67.
- Куперман Ф.М. Морфобиологія рослин. – М.: Высш. шк., 1977. – 288 с.
- Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наук. думка, 2005. – С. 5-23.
- Маракаев О.А., Титова О.В. Особенности ростовых процессов у орхидных (*Orchidaceae*) разного возраста в зависимости от некоторых экологических факторов // Современные проблемы биологии, химии, экологии и экологического образования. – Ярославль: ЯрГУ, 2001. – С. 185-190.
- Перебора Е.А. Орхидные Северо-Западного Кавказа. – М.: Наука, 2002. – 253 с.
- Попкова Л.Л., Митрофанова О.В. Морфогенез некоторых орхидных Крыма при семенном размножении в условиях *in vitro* // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. – Бюл. Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 168-181.
- Синнот Э. Морфогенез растений. – М.: Изд-во иностр. лит. – 1963. – 603 с.
- Собко В.Г. Морфогенетические особенности орхидей трибы *Orchidae* флоры Украины. – Киев: Наук. думка, 1983. – С. 27-29.
- Собко В.Г., Гапоненко М.Б. Вегетативне розмноження реліктових та ендемічних видів орхідей флори України // Охорона і культивування орхідей. – К.: Наук. думка, 1999. – С. 76-78.
- Собко В.Г., Нефедова О.Н. *Epipactis palustris* L. в природе и в первичной культуре // Охрана и культивирование орхидей. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. – Киев: Наук. думка. – 1983. – С. 45-47.
- Соболевская К.А. Исчезающие растения Сибири в интродукции. – Новосибирск: Наука, 1984. – 222 с.
- 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.

- Терехин Э.С. Репродуктивная биология // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 21-24.
- Филиппов Е.Г. Внутривидовая изменчивость и экология видов рода *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (сем. *Orchidaceae*) на Урале: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 1997. – 22 с.
- Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. – Киев: Наук. думка, 1986. – 198 с.
- Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – Киев: Наук. думка, 2008. – 560 с.
- Черевченко Т.М., Буюн Л.И., Ковальська Л.А., Вахрушкін В.С. Орхідеї. – К.: Просвіта, 2001. – 224 с.
- Bernard N. L'evolution dans la symbiose les orchidees et leurs champignons commensaux // Ann. Sci. Nat. Bot. – 1909. – V. 9. – P. 1-196.
- Bonnardeaux Y., Brundrett M., Batty A. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids : compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. // Mycol. Res. – 2007. – V. 111. – P. 51-61.
- Dafni A. Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception // Orchid biology. Reviews and perspective. – Cornell Univ. Press, 1987. – V. 4. – P. 81-104.
- Ferdy J., Lorient S., Sandmeier M. Inbreeding depression in a rare deceptive orchid // Can. J. Bot. – 2001. – V. 79. – P. 1181-1188.
- Flores-Palacios A., Valencia-Diaz S. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes // Biol. Conserv. – 2007. – V. 136. – P. 372-387.
- Jacquemyn H., Honnay O., Paillet T. Range size variation, nestedness and species turnover of orchid species along an altitudinal gradient on Reunion Island: Implications for conservation // Biol. Conserv. – 2007. – V. 136. – P. 388-397.
- Johnson S., Peter C., Agren J., Nilsson L. Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by cooccurring rewarding «magnet» plants // Ecology. – 2003. – V. 84. – P. 2919-2927.
- Knudson L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds // Amer. Orchid Soc. Bull. – 1946. – V. 15. – P. 214-217.
- Veyret Y. Development of the embryo and the young seedling of orchids // The Orchids: Scientific studies. – N.Y.: Willey, 1974. – P. 223-265.

Надійшла до редакції  
01.02.2011 р.

## **THE PECULIARITIES OF ORCHIDS SEEDLING MORPHOGENESIS ON CULTURE *IN VITRO* AND *IN VIVO***

O. A. Sheyko, L. I. Musatenko

*M.G. Kholodny Institute of Botany  
of the National Academy of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)*

Morphogenesis of seedling of orchids in temperate area studying from XIX century, in spite of this peculiarity of development the most representatives of this group in nature up to this time to research not enough. Method of asymbiotic cultivation of seedling *in vitro* to permit essentially to make easier studying of early stages of ontogenesis of *Orchidaceae* of temperate area but question about accordance of process of morphogenesis in asymbiotic culture and in nature to reserve discussion. The essential distinctions between growth natural conditions and asymbiotic cultivation can provide for rise *in vitro* forms of afterseed development of protocorm which to differ from natural. The similar phenomenons to death with example of morphophysiology adaptation which to illustrate plastic reactions of orchids under the influence of displacement of balance phytohormonology system. The considerable quantity of genetic changes of cells cultivated *in vitro* have to invertible type. And also in the review the characteristic of the basic versions of morphological development in initial stage on culture *in vitro* is represented.

**Key words:** *Orchidaceae, culture in vitro, in vivo, morphogenesis*

## ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ПАРОСТКІВ ОРХІДНИХ

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА ПРОРОСТКОВ ОРХИДНЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Е. А. Шейко, Л. И. Мусатенко

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного  
Национальной Академии наук Украины  
(Киев, Украина)*

Несмотря на то, что морфогенез проростков орхидных умеренной зоны изучается с середины XIX столетия, особенности развития многих представителей этой группы в природных местонахождениях исследованы недостаточно. Метод асимбиотического культивирования проростков *in vitro* позволяет существенно облегчить изучение ранних стадий онтогенеза орхидных умеренной зоны, но вопрос о соответствии процессов морфогенеза в асимбиотической культуре и в природных условиях остается спорным. Существенные отличия между условиями произрастания в природе и в асимбиотической культуре могут обусловить возникновение *in vitro* форм постсеменного развития протокормов, которые резко отличаются от наблюдаемых в природе. Подобные явления рассматриваются как пример морфофизиологической адаптации, которая иллюстрирует пластические реакции орхидных под влиянием смещения баланса фитогормональной системы. Значительное количество генетических изменений, которые тестируются в культивируемых *in vitro* клетках, носят обратимый характер. Также в обзоре приведена характеристика основных вариантов прохождения начальных этапов морфогенетического развития, которые можно наблюдать в культуре *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Orchidaceae*, культура *in vitro*, *in vivo*, морфогенез