

УДК 581.1

## **ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ И ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *HIMANTOGLOSSUM CAPRINUM* (VIEB.) С. КОСН. И *OPHRYS OESTRIFERA* VIEB.**

© 2011 г. Е. А. Шейко, Л. И. Мусатенко

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

Изучена вариабельность морфометрических показателей вегетативных и генеративных органов двух видов орхидей. Получены каллусные культуры из завязей ремнелестника козьего – *Himantoglossum caprinum* (Vieb.) С. Koch. и офрис оводоносной – *Ophrys oestrifera* Vieb. Показана зависимость процесса каллусогенеза от генотипа и фитогормонального состава питательной среды.

**Ключевые слова:** *Orchidaceae, Himantoglossum caprinum, Ophrys oestrifera,*  
*морфометрические показатели, культура in vitro, завязь*

Семейство *Orchidaceae* Juss – орхидные или ятрышниковые, является одним из наиболее богатых семейств покрытосеменных растений, которое объединяет 750 родов и от 17000 до 35000 видов. Орхидные – космополиты, распространены почти во всех регионах земного шара. Особенно широко представлены эпифитные орхидные в тропических и субтропических областях. Центром родового и видового разнообразия орхидей является тропическая Америка, где насчитывается до 306 родов, объединяющих 8266 видов (Dressler, 1981; Черевченко и др., 2001; Cribb et al., 2003).

Флора Украины включает 70 видов орхидных из 28 родов (Собко, 1989). Редкость орхидей и сокращающаяся их численность обусловлены как влиянием природных факторов (отсутствием в биотопе грибов-микоризообразователей и специфических насекомых-опылителей), так и антропогенным воздействием (Загульский, 1999; Jacquemyn et al., 2007).

Орхидные в настоящее время находятся на стадии активной эволюции, что подтверждается строением генеративной сферы у особей одного вида и множеством межвидовых и межродовых гибридов (Pijl, Van der Dodson, 1966;

Аверьянов, 1991а; 1991б). Вегетативные органы более консервативны, их строение отражает возникшую в ходе эволюции приспособленность растений к климатическим, эдафическим и фитоценотическим условиям обитания.

Вегетативный способ размножения орхидей хорошо известен и широко используется в практике цветоводства. Когда с начала XIX века в Англии впервые стали выращивать тропические декоративные орхидеи, то размножение их производилось только вегетативным путем (Поддубная-Арнольди, Селезнева, 1957). Клубневые орхидеи флоры Украины в природных условиях вегетативно не размножаются (Собко, Гапоненко, 1999), хотя исследователям иногда удавалось выявить отдельные случаи такого явления (Лукс, 1970).

Вегетативный способ размножения орхидей с целью их охраны имеет преимущества над семенным, так как таким образом исключается возможность получения гибридных поколений, что особенно важно при репатриации орхидей в природу. При всей простоте и надежности основным недостатком классических приемов вегетативного размножения остается их малый коэффициент размножения. В лучшем случае от одного экземпляра можно получить десяток небольших растений из черенков. Поэтому в настоящее время актуальным является разработка методов ускоренного размножения, введения в культуру, репатриа-

ция этих видов в природные места обитания, а также создание генетических банков и коллекций для сохранения и расширения генофонда. Перспективным направлением в этой области является разработка биологических подходов культивирования *in vitro* как вегетативных, так и генеративных структур, таких как пыльник, завязь и семязачаток, так как они имеют высокий морфогенетический потенциал и обладают определенной автономностью от материнского растения. Суть такого процесса заключается в переключении программы развития морфогенетически компетентных клеток генеративных структур с обычного гаметофитного пути на иной путь – спорофитный, то есть образования растения-регенеранта (Круглова и др., 2005). Для орхидей умеренной зоны этот вопрос остается малоизученным, поэтому любые исследования, связанные с изучением репродуктивных особенностей, представляют значительный практический и теоретический интерес. Первоочередное внимание следует уделить орхидным I категории редкости, к которым относятся *Himantoglossum caprinum* (Vieb.) C. Koch., 1837, *Ophrys oestriifera* Vieb., 1808.

Целью работы было изучение репродуктивной биологии, оптимизация условий культивирования *H. caprinum*, *O. oestriifera* и получение каллусной культуры для дальнейшего восстановления из нее растений-регенерантов.

## **МЕТОДИКА**

Реликтовый средиземноморский вид *Ophrys oestriifera* Vieb., 1808. – офрис оводоносная – многолетнее травянистое растение высотой 20-45 см. Клубни овальные. В нижней части стебля от двух до пяти длинных сизовато-зеленых листьев, в средней части два влагалища. Соцветие кистевидное. Цветки большие розовые с длинными густоволосистыми коричневыми выростами около основания губы, что придает ей сходство с самкой овода. Цветет в апреле-мае. Плодоносит в июне-июле. Размножается преимущественно семенами. Растет одиночно, редко небольшими группами. Распространен в Горном Крыму (за исключением Яйл), на Южном берегу Крыма, в Центральной Европе, Средиземноморье, на Кавказе, в Малой и Западной Азии (Протопопова, 1965; Собко, 1989).

Палеоэндемичный крымско-кавказский вид *Himantoglossum caprinum* (Vieb.) C. Koch., 1837 (ремнелепестник козий) – многолетнее

травянистое растение. Клубни цельные, эллиптические. Стебель высотой 50-75 см, около основания имеет 4-5 длинных сизовато-зеленых листьев. Соцветие продолговатое, кистевидное. Цветки достаточно большие, зеленовато-красные, оригинальной формы (напоминают голову гадюки с высунутым языком). Цветет в июле-августе. Плодоносит в августе-сентябре. Размножается семенами, Численность популяций низкая, заметно сокращается. Растет одиночно. Распространен в Крыму (окрестности Севастополя, Симферополя, Ялты, мыс Мартьян, массив Карадаг), на Кавказе (окрестности Геленджика, Россия) (Протопопова, 1965; Собко, 1989).

Сбор материала проводился в фазах цветения и плодоношения. При анализе использовались такие морфометрические показатели, как количество опыленных и неопыленных цветков в соцветии, длина и ширина завязи, длина цветоноса и венчика, коэффициент плодобразования. При этом выборка составила 35 растений каждого вида. Для статистической обработки эмпирических данных были использованы параметрические методы (Лакин, 1990). Завязи для введения в культуру собирали на 30-й день после завядания венчика. Всего в эксперименте по введению в культуру *in vitro* было взято по 200 эксплантов каждого вида. В связи с редкостью данных видов орхидей сбор материала проводили с учетом законов биоэтики.

Завязи культивировали на агаризованных питательных средах, содержащих бензиламинопурин (БАП), кинетин (2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д)), индолилмасляную кислоту (ИМК). Условия культивирования: температура 23-25°C, освещенность 2-3 тыс. люкс при 10 часовом фотопериоде, относительная влажность воздуха 60%.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

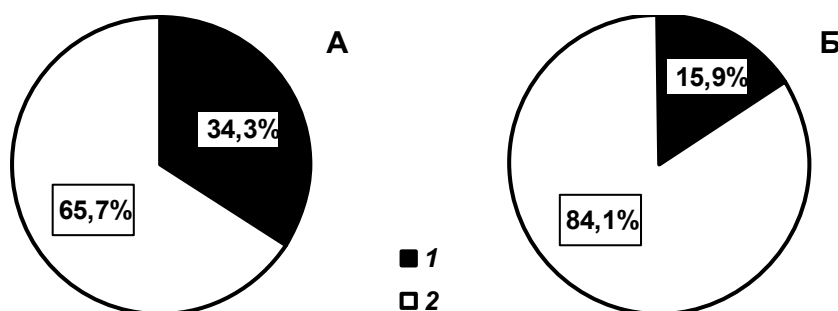
Оценка свойств особей растений – основа исследований ценопопуляций и дает возможность прогнозирования состояния популяций, что особенно актуально при изучении редких и исчезающих видов (Кучер, 2001). Количественную оценку репродукции особей растений полезно дополнять исследованием морфометрических показателей генеративных и вегетативных органов, поскольку размер особи, который определяется количеством, линейными размерами вегетативных и генеративных структур, обуславливает все репродуктивные показатели.

## ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ

**Таблица 1. Вариабельность морфометрических показателей орхидных**

Показатели	n	max	min	x'	Sx'	$\alpha$	$\sigma$	$\sigma^2$	cv
<i>Himantoglossum caprinum</i>									
Длина венчика, мм	35	25	15	18,7	0,9	0,03	3,5	12,4	18,7
Длина завязи, мм	35	20	14	16,9	0,6	0,09	2,1	4,5	12,4
Ширина завязи, мм	35	4,0	2,5	3,1	0,2	0,04	0,5	0,2	16,1
Длина цветоноса, см	35	68	47	60,5	1,9	0,05	6,3	39,1	10,4
<i>Ophrys oestrifera</i>									
Длина венчика, мм	35	15	9,5	11,6	0,9	0,02	1,9	3,5	16,4
Длина завязи, мм	35	19	14	15,8	0,8	0,03	1,8	3,4	11,4
Ширина завязи, мм	35	5,0	3,0	4,1	0,4	0,02	0,8	0,6	19,5
Длина цветоноса, см	35	23	18	20,3	0,8	0,03	1,8	3,1	8,9

**Примечание:** n – выборка, шт.; max – максимальное значение; min – минимальное значение; x' – среднее арифметическое; Sx' – ошибка средней арифметической;  $\alpha$  – среднее линейное отклонение;  $\sigma$  – среднее квадратичное отклонение;  $\sigma^2$  – дисперсия; cv – коэффициент вариации, %.



**Рис. 1. Количество опыленных (1) и не опыленных (2) цветков в соцветии.**  
 А – *Himantoglossum caprinum*; Б – *Ophrys oestrifera*.

В результате исследования морфометрических показателей двух видов орхидных выявлена широкая вариабельность (табл. 1). Среди линейных показателей наблюдается относительная консервативность параметров генеративных органов: длина и ширина завязи, длина венчика. Невысоким значением коэффициента вариации в этой группе показателей характеризуется и длина цветоноса (3,1% и 3,9% у *H. caprinum* и *O. oestrifera* соответственно). Высота растения, возможно, стабилизировалась на генетическом уровне, о чем свидетельствует отсутствие или низкая корреляция длины цветоноса с другими морфометрическими показателями. Низкий коэффициент корреляции длины цветоноса можно объяснить также тем, что измерение этого показателя осуществляли в основном на стадии плодоношения, когда размер растения достиг своего максимума и последней стадии годового цикла.

В популяциях обоих видов орхидных отмечена большая степень варьирования количества опыленных и неопыленных цветков в соцветии. При практически одинаковом количестве цветков в соцветии (*H. caprinum* – 28,9±0,8, *O. oestrifera* – 29,5±1,1), количество опыленных цветков у *H. caprinum* в два раза больше, чем у *O. oestrifera* (рис. 1). Это обусловлено особенно-

стями биоэкологии этих видов орхидей, в частности, их ценотическими отношениями.

Алогамная система скрещивания и обманная аттракция определяют тесную зависимость успеха репродукции от многих факторов, которые влияют на активность опылителей (погодные условия, наличие кормового растения вблизи популяции орхидеи и др.), а также от степени морфологического соответствия опылителей цветку (Kullenberg, Bergstrom, 1976; Лагутова, Назаров, 1993). Более интенсивно посещаются орхидеи, которые сформировали соцветия к моменту появления опытных опылителей. Об этом свидетельствует большее количество плодов в нижней части соцветия. Растения с более поздними сроками цветения посещаются редко. Поэтому коэффициент плодообразования (отношение количества плодов к количеству цветков в соцветии особи) в популяциях широко варьирует (от 15,9% – у *O. oestrifera* до 93% – у *H. caprinum*), следовательно варьирует и количество плодов (4,7 и 21,1 шт. у *O. oestrifera* и *H. caprinum* соответственно).

Культивирование растений *in vitro* для получения каллуса и растений-регенерантов невозможно без получения асептической куль-

Таблица 2. Влияние различных стерилентов и режимов стерилизации на получение асептической культуры и жизнеспособность завязей орхидных *in vitro*

Объект исследования	Стериленты и режимы стерилизации	Количество асептических эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
<i>Himantoglossum caprinum</i>	80% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH – 3 мин	87,7	30,9
	80% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH – 1,5 мин, 15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – 2 мин	51,6	49,8
	15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – 2 мин	35,5	34,4
	80% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH – 3 мин	95,8	27,0
<i>Ophrys oestrifera</i>	80% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH – 1,5 мин, 15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – 2 мин	68,1	50,5
	15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – 2 мин	12,4	11,8

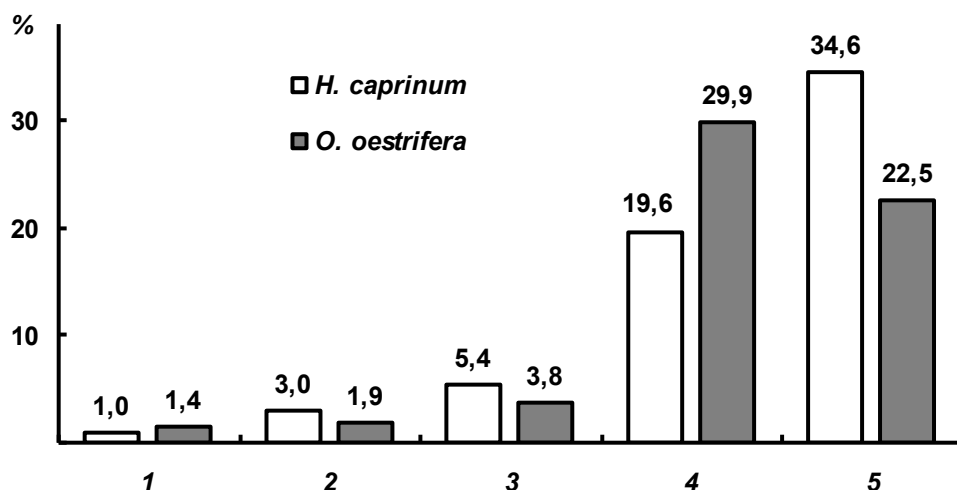
туры. В наших исследованиях было испытано два способа стерилизации. На начальных этапах проведения эксперимента планировалось подобрать такие стериленты и режимы стерилизации, чтобы получить максимальный выход стерильного материала при минимальной гибели эксплантов от жесткого режима стерилизации. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Завязи *H. caprinum* делили на 10 частей (эксплантов), завязи *O. oestrifera* – на 8 частей. Поверхностную стерилизацию материала проводили 80% этиловым спиртом (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) с экспозицией 3 мин, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH – 1,5 мин вместе с 15% перекисью водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – 2 мин, 15% перекисью водорода с экспозицией 10 мин (табл. 2). Наибольшей стерильности при получении асептических эксплантов генеративных органов орхидей изученных видов удалось достичь при использовании стерилизации с 80% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в течение 3 мин. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации составило у *H. caprinum* – 87,7%, а у *O. oestrifera* – 95,8%. При этом процент жизнеспособных эксплантов был достаточно низким у обоих видов (от 27,0% до 30,9%), что не удовлетворяло нашим требованиям. При использовании стерилизации 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 2 мин, несмотря на то, что процент асептических эксплантов был невысок (35,5% и 12,4%), он практически совпадал с процентом жизнеспособных эксплантов (34,4% и 11,8% соответственно). Это объясняется малой токсичностью перекиси водорода для тканей. После стерилизации экспланты достаточно только один раз промыть стерильной водой. Оставшаяся в тканях перекись быстро разрушается. Оптимальным способом стерилизации завязей изученных видов орхидных было использование двойной стерилизации с 80% этиловым спиртом и 15% перекисью водорода в течение 1,5 и 2 мин соответственно. Несмотря на то, что при этом процент асептических эксплантов оказался ниже, чем

при использовании стерилизации 80% этиловым спиртом в течении 3 мин, в дальнейшей работе использовалась именно эта стерилизация, так как показатель жизнеспособности эксплантов был сравнительно высок и составил 49,8% (*H. caprinum*) и 50,5% (*O. oestrifera*).

Важным методическим моментом в разработке методов культуры *in vitro* является подбор питательной среды с оптимальной концентрацией регуляторов роста для индукции каллусогенеза. Нами были использованы пять основных питательных сред: Мурасиге-Скуга, Кнудсона, Нича, Нича и Нич, Потата II. Состав среды был модифицирован для индукции каллусогенеза, чтобы в короткие сроки получить первичную каллусную ткань. В качестве основных дедифференцирующих факторов рекомендуется использовать природные фитогормоны и их синтетические аналоги: 2,4-Д, ИМК, 6-БАП (Бутенко, 1964; Круглова, Батыгина, 2002). Данные регуляторы роста использовались в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л.

Однако, полученные нами данные позволили сделать вывод о том, что из всех сред наиболее пригодной для культивирования завязей изучаемых видов является среда Мурасиге-Скуга с различными концентрациями регуляторов роста. При культивировании генеративных органов на остальных средах во всех вариантах наших исследований получены отрицательные результаты. Данные по каллусообразованию на различных вариантах среды Мурасиге-Скуга представлены на гистотрамме (рис. 2).

При концентрации 2,4-Д 1,5 мг/л и 6-БАП 2,5 мг/л частота каллусообразования составила для *O. oestifera* – 29,9%, а для *H. caprinum* – 19,6%. При использовании концентрации ИМК 2,0 мг/л и 6-БАП 3,0 мг/л для *O. oestifera* количество образующих каллус завязей составило 22,5%. Подобная зависимость прослеживается при высадке на данную модификацию среды завязей *H. caprinum* – 34,6% каллусообразую-



**Рис. 2.** Влияние фитогормонов модифицированной среды Мурасиге-Скуга на частоту каллусообразования (%) в культуре *in vitro* завязей *Himantoglossum caprinum* и *Ophrys oestrifera*:

1 – питательная среда, не содержащая фитогормонов (контроль); 2 – 2,4-Д (1,5 мг/л), ИМК (1,5 мг/л), 6-БАП (1,5 мг/л); 3 – 2,4-Д (3,0 мг/л), 6-БАП (2,0 мг/л); 4 – 2,4-Д (1,5 мг/л), 6-БАП (2,5 мг/л); 5 – ИМК (2,0 мг/л), 6-БАП (3,0 мг/л).

щих эксплантов. При использовании других соотношений концентраций фитогормонов процент каллусогенеза составил от 1,9 до 5,4%. Количество пролиферирующих эксплантов, высаженных на безгормональную среду Мурасиге-Скуга, составило от 1,0 до 1,4%.

Из полученных данных можно сделать вывод, что для получения каллусных культур из завязей изученных видов необходимо использовать среду Мурасиге-Скуга, содержащую 2,4-Д 1,5 мг/л и 6-БАП 2,5 мг/л, или эту же среду, модифицированную ИМК 2,0 мг/л и 6-БАП 3,0 мг/л.

На основании полученных данных можно констатировать, что орхидные характеризуются значительной вариабельностью морфометрических показателей вегетативных и генеративных органов, что безусловно влияет на репродукцию популяций в целом. Интенсивность завязывания плодов исследованных видов орхидей неодинакова и зависит от погодных условий во время цветения, количества насекомых-опылителей и т.д. Изменение экологических условий каждый год сильно влияет на продолжительность отдельных периодов развития. Сезонная ритмичность развития орхидных у разных видов неодинакова и отображает длинный путь их эволюции в определенных природно-климатических условиях. В результате проведенных исследований была получена каллусная культура из завязей двух видов орхидных и по-

казано влияние биологически активных веществ на частоту каллусообразования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов Л.В. Основные пути морфологической эволюции в семействе *Orchidaceae* // Ботан. журнал. – 1991а. – Т. 76, № 7. – С. 921-943.
- Аверьянов Л.В. Происхождение и некоторые особенности эволюции, биологии и экологии орхидных (*Orchidaceae*) // Ботан. журнал. – 1991б. – Т. 76, № 10. – С. 1345-1359.
- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
- Загальський М.М. Зміни позицій орхидних (*Orchidaceae* Juss.) за останні 200 років на заході України та їх охорона // Охорона і культивування орхидей. Мат-ли Міжнар. наук. конф. – К.: Наук. думка, 1999. – С. 54-56.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Сельди-мирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – Уфа, 2005. – 230 с.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 22 с.
- Кучер Е.Н. Изменчивость морфометрических параметров особи в популяции *Dactylorhiza romana* (Seb. Et Mauri) Soo. // Актуальні проблеми бо-

## ШЕЙКО, МУСАТЕНКО

- таніки та екології. Мат-ли конф. молодих вчених-ботаніків України. – Ніжин: Наука-Сервіс. – 2001. – С. 63-64.
- Лагутова О.И., Назаров В.В. Экология опыления *Dactylorhiza rotana* Soo. (Orchidales) // Укр. бот. журнал. – 1993. – Т. 50, № 1. – С. 107-110.
- Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Лукс Ю.А. К вопросу о естественном вегетативном размножении некоторых наземных орхидей с корневыми клубнями // Тр. Никит. ботан. сада. – 1970. – Т. 43. – С. 79-88.
- Поддубная-Арнольди В.А., Селезнева В.А. Орхидеи и их культура. – М.: Изд-во АН СССР, 1957. – 175 с.
- Протопопова В.В. Родина Орхідні // Визначник рослин України. – К.: Урожай, 1965. – С. 117-186.
- Собко В.Г. Орхідеї України. – К.: Наук. думка, 1989. – 192 с.
- Собко В.Г., Гапоненко М.Б. Вегетативне розмноження реліктових та ендемічних видів орхидей флори України // Охорона і культивування орхидей. Мат-ли Міжнар. наук. конф. – К.: Наук. думка, 1999. – С. 76-78.
- Черевченко Т.М., Буюн Л.И., Ковальская Л.А., Вахрушкин В.С. Орхидеи. – Киев: Просвіта, 2001. – 224 с.
- Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W., Barrett R.L. Orchid conservation – a global perspective // Nat. Hist. Publ. – 2003. – P. 1-24.
- Dressler R.L. The orchids. Natural history and classification. – London: Harvard Univ. Press, 1981. – 332 p.
- Jacquemyn H., Honnay O., Pailler 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.
- Kullenberg B., Bergstrom G. Hymenoptera Aculeata males as pollinators of *Ophrys* orchids // Zool. Scr. – 1976. – V. 5. – P. 13-23.
- Pijl L., Van der Dodson C. Orchid flowers. Their pollination and evolution. – Coral Gables: Univ. Miami Press, 1966. – 214 p.

Поступила в редакцію  
20.11.2010 г.

## THE PECULIARITIES OF REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *HIMANTOGLOSSUM CAPRINUM* (BIEB.) C. KOCH. AND *OPHRYS OESTRIFERA* BIEB. AND INTRODUCTION IN CULTURE

O. A. Sheyko, L. I. Musatenko

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

The variability of morphometric indexes of vegetative and generative organs of 2 orchids species were studied. Callus cultures from ovary of *Himantoglossum caprinum*, *Ophrys oestrifera* were gotten. It was shown the dependence of callusgenesis processis from genotype and phytohormonal composition of nutritient medium.

**Key words:** *Orchidaceae*, *Himantoglossum caprinum*, *Ophrys oestrifera*, *morphometric indexes*, *culture in vitro*, *ovary*

**ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ**

**ОСОБЛИВОСТІ РЕПРОДУКТИВНОЇ БІОЛОГІЇ  
І ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *HIMANTOGLOSSUM CAPRINUM* (VIEB.) С. КОСН.  
ТА *OPHRYS OESTRIFERA* VIEB.**

О. А. Шейко, Л. І. Мусатенко

*Институт ботаники ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України  
(Київ, Україна)*

Вивчено варіабельність морфометричних показників вегетативних та генеративних органів двох видів орхідей. Отримані калусні культури зав'язей ремнепелюстника козячого – *Himantoglossum caprinum* (Vieb.) С. Koch. и офрис оводоносної – *Ophrys oestrifera* Vieb. Показано залежність процесу калусогенезу від генотипу та фітогормонального складу поживного середовища.

**Ключові слова:** *Orchidaceae*, *Himantoglossum caprinum*, *Ophrys oestrifera*, морфометричні показники, культура *in vitro*, зав'язь