Хуссиен М., Коновалова Т.Ю., Молканова О.И.

Клональное микроразмножение представителей рода *Dactylorhiza Neck. ex Nevski*

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

УДК 581.1

Клональное микроразмножение представителей рода

Dactylorhiza Neck. ex Nevski

Хуссиен М., Коновалова Т.Ю., Молканова О.И.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Аннотация

Работа посвящена разработке и совершенствованию методов размножения *in vitro* представителей рода *Dactylorhiza*: *D. baltica* и *D. fuchsii*. В исследовании были использованы протокормы, полученные из семян, пророщенных асимбиотическим методом в течение 90 дней. В ходе исследования установлено, что среда $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга (1962) ($\frac{1}{2}$ МС) с 1-2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), картофельного пюре (20 г/л), и древесного угля (1 г/л) эффективно влияла на развитие протокормов и формирование сеянцев у исследуемых видов.

Процент приживаемости протокормов был высоким на всех вариантах питательных сред, но у *D. fuchsii* он был большим при концентрации 2 мг/л 6-БАП (95,4%), в то время как у *D. baltica* – при 1 мг/л 6-БАП (87,0%). При последующем культивировании на питательной среде, содержащей 2 мг/л 6-БАП, наблюдали наибольший процент конгломератов протокормов (68%) и образование новых вторичных протокормов у *D. fuchsii* ($5,5 \pm 0,3$ шт.). Было обнаружено положительное влияние безгормональной питательной среды во время развития протосомов на процент укореняемости (78%), и длину корней (0,9 см).

Во время образования протосомов *D. baltica* питательная среда с добавлением 1 мг/л 6-БАП оказывала лучшее влияние на число корней ($1,8 \pm 0,1$ шт.), в то время как среда, содержащая 2 мг/л 6-БАП, способствовала формированию большего числа новых вторичных протокормов ($3,2 \pm 0,1$ шт.). При последующем культивировании протосомов *D. baltica* на питательной среде, содержащей 1 мг/л 6-БАП, наблюдали увеличение высоты побегов ($4,8 \pm 0,3$ см) и длины корней ($2,2 \pm 0,1$ см), в то же время число новообразованных протокормов было выше на 30% на питательной среде с 2 мг/л 6-БАП.

Ключевые слова: DACTYLORHIZA BALTICA, DACTYLORHIZA FUCHSII, IN VITRO, ПРОТОКОРМЫ, ОРГАНИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ

Введение

Род *Dactylorhiza* Nevski, пальчатокоренник, относится к семейству Orchidaceae Juss., насчитывает около 40 видов травянистых многолетников, распространенных, в основном, в зоне умеренного климата в Евразии и Северной Америке.

Представители рода *Dactylorhiza* занимают разнообразные места обитания, такие как болота, сухие луга и леса. Субстрат колеблется от щелочного до довольно кислого (например, для *D. maculate* (L.) Soo – до pH 5,5). Большинство видов *Dactylorhiza* имеют зеленые облиственные побеги, которые появляются весной, в некоторых местах сохраняются до конца октября. Листья хорошо развиваются, особенно во влажных местообитаниях, а зимующий клубень развивается, в основном, в течение весны и лета. В декабре бутон на новом клубне уже содержит все листовые и цветочные зачатки на следующий сезон [1].

Dactylorhiza baltica (Klinge) Nevski (пальчатокоренник балтийский) один из тетраплоидных потомков от скрещивания *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo (пальчатокоренник мясокрасный) и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo (пальчатокоренник фукса). Отличается более узкой явно трехлопастной губой с мало выдающейся округлой средней лопастью и тонким шпорцем. Высота – 15-70 см, стебель в нижней части полый, листья с поперечно вытянутыми пятнами, отклоненные от стебля, соцветие плотное, цветки без запаха, сиренево-розовые, губа – 6-8 x 7-11 мм с четким линейным рисунком. Цветет с середины июня до середины июля, плодоносит в августе-сентябре [2].

Пальчатокоренник балтийский отличается от пальчатокоренника фукса тем, что стебель у него в нижней части полый, а также округлой верхушкой соцветия (у пальчатокоренника фукса она вытянутая, островатая) и деталями строения цветка. Так, у пальчатокоренника балтийского шпорец коротко-цилиндрический, почти мешковидный, трехлопастная губа почти округлая в очертании с тупой средней долей. А у пальчатокоренника фукса шпорец длинный, более тонкий, цилиндрический, губа округло-ромбическая, глубоко трехраздельная, с заостренной средней лопастью, которая нередко длиннее боковых [3].

D. baltica произрастает в прибалтийских странах Северной и Средней Европы, в Европейской России, фрагментарно в южной части Западной Сибири [4]. В Республике Коми точно известны три местонахождения *D. baltica*, остальные нуждаются в проверке.

Он предпочитает весенние болота с зеленым мхом, влажные луга и леса [5].

Было найдено, что *D. fuchsii* растет на известняковой основе на умеренно влажной почве в условиях полного светового режима на юго-западе Сербии и по всей лесной Западной Европе. Растения этого вида были зарегистрированы на высоте от 1243 м до 1250 м на северо-восточных склонах с наклоном 20-25 °. *D. fuchsii* растет обычно на лугах и открытых лесных массивах, опушках лесов и участках с разбросанными древостоями и негустой травой [6].

Виды семейства Orchidaceae Juss., по причинам высокой декоративности, слабой устойчивости к антропогенным факторам и специфических особенностей своей биологии, являются редкими и уязвимыми растениями. Они включены в Приложение II Международной конвенции СИТЕС. Во многих странах этим растениям предоставлен особый природоохранный статус. Пальчатокоренник балтийский включен в Красную книгу России, а пальчатокоренник фукса входит в ряд региональных Красных книг и Красную книгу Украины [4, 7].

Необходимы мероприятия по сохранению и восстановлению орхидей, включая разработку эффективных методов сохранения и размножения. Орхидеи составляют почти десятую часть всех видов растений, немногие виды орхидей успешно выращиваются из семян, и большинство из них являются тропическими эпифитными видами [8].

Сохранение жизнеспособных популяций орхидей требует глубокого понимания их биологических особенностей. Большинство видов являются высокоспециализированными по отношению к своим опылителям и имеют сложные взаимодействия с несколькими организмами на ранних стадиях их жизненного цикла (например, энтомофилия, глубокие симбиотические отношения с почвенными грибами, маленькие семена, длительные периоды времени, проведенные под землей до всхожести). Некоторые из обнаруженных орхидей, а именно: межвидовые гибриды *Dactylorhiza*, *Gymnadenia* и *Platanthera*, – требуют дальнейшего изучения [9]. Умеренные наземные орхидеи труднее размножать и культивировать, чем тропические эпифиты. Наземные орхидеи обычно дают множество мелких семян без эндосперма [4].

Для сохранения и введения в культуру видов рода *Dactylorhiza* большое значение имеет разработка эффективных методов размножения. Традиционное вегетативное размножение не позволяет получить большое количество посадочного материала, так как

дочерние побеги у орхидей с корневищами побегов (тубероидами): *Dactylorhiza*, *Orchis*, *Ophrys*, *Platanthera* и др., – отделяются наиболее быстро, через 0,5-1 год; вегетативное размножение у этих орхидей встречается крайне редко, за исключением *Platanthera hologlottis* [10]. Асимбиотический посев семян в стерильных условиях и последующее микрклональное размножение сеянцев *in vitro* является решением данной проблемы [11]. Кроме того, применение методов *in vitro* даёт возможность изучать морфогенетические процессы орхидей без деструктивного отбора проб. Исследования по размножению *in vitro* и последующему культивированию *ex vitro* редких и находящихся под угрозой исчезновения видов наземных орхидей могут также иметь важное значение для программ реинтродукции видов [12].

Морфологически орхидеи трудно изучать из-за наличия специфического явления в онтоморфогенезе – голометаморфоза, при котором происходит изменение целого ряда признаков. По мнению многих исследователей, можно разделить онтоморфогенез орхидей на следующие стадии: семена – протокорм – протосома – ювенильные растения. При прорастании семян у многих видов орхидей *in vitro* наблюдается два основных пути развития. В первом случае они формируются из семян протокормы, которые имеют одну точку роста. Эти ювенильные растения не образуют вторичные протокормы, но они образуют быстро корни и листья. В другом случае наблюдается образование конгломератов вторичных протокормов, после этого они развиваются в нормальные сеянцы либо продолжают образовывать новые протокормы.

В Латвии было начато детальное исследование *D. baltica*, включающее наблюдение в их естественной среде обитания, методику культивирования *in vitro* и последующую акклиматизацию *ex vitro* для защиты их от исчезновения, так как он имеет довольно декоративное соцветие и может быть зарегистрирован в качестве нового декоративного сорта. В исследовании была использована питательная среда Knudson (1946) с добавлением цитокининов и дрожжей в качестве органических добавок. При этом было отмечено наибольшее размножение (инициация новых 0,7 сеянцев на корнях). Также при применении цитокинина мета-тополина наблюдали потемнение питательной среды. Некоторое размножение (0,4 сеянца на корни /на растение) было получено в варианте с применением дрожжей 0,5 г/л + БАП 0,2 мг/л. Показатель жизнеспособности в этом случае составил 4,3 [4].

Для размножения *Dactylorhiza incarnata in vitro* в качестве материала были использованы протокормы, которые культивировали на питательной среде, содержащей различные концентрации регуляторов роста индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 6-бензиламинопурина (6-БАП). Применение ранее указанных регуляторов роста в соотношении 1 мг/л : 1 мг/л оказало явное влияние на образование протокормов (до 8-12 шт.) [13].

Целью настоящего исследования является разработка и совершенствование методов размножения *in vitro* представителей рода *Dactylorhiza*: *D. baltica* и *D. fuchsii*.

Объекты и методы исследования

Для посева использовали зрелые семена, собранные с культивируемых растений. Для стерилизации и химической скарификации семян применяли обработку 2% раствором серной кислоты в течение 10 мин с последующей стерилизацией 20-30 мин 25% раствором бытового отбеливателя гипохлорит натрия (NaClO). Семена высевали на питательную среду Harvais (1982) с добавлением кусточков картофеля (56 г/л), не содержащую регуляторов роста. Семена содержали в темноте при t 3-4 °C в течение 3 месяцев, а затем переносили в помещение с температурой 20-23 °C, где они и прорастали.

Для исследования были использованы протокормы, полученные из семян, пророщенных асимбиотическим методом в течение 90 дней.

Для эксперимента использовали 2 варианта сред ½ MC (Murashige and Skoog, 1962) с различной концентрацией 6-бензиламинопурина (6-БАП) (1 и 2 мг/л) с добавлением 20 г/л пюре картофеля и 1 г/л древесного угля по 6 повторностей каждого варианта. В каждую банку пересаживали 30 первичных шаровидных протокормов. После культивирования мы помещали банки на полку в темноту, пока они не образовали корни при температуре 23-27 °C в течение двух месяцев. Потом мы перенесли их в помещение с освещением интенсивностью 1500-2000 Лк. У *D. fuchsii* на этапе развития протокормов в протосомы использовали питательную среду 1/2 MC с добавлением 6-БАП в концентрации 1,0 и 2,0 мг/л. В качестве контроля использовали питательную среду без добавления регуляторов роста.

Было замечено, что *D. baltica* развивался быстрее, чем *D. fuchsia*, поэтому мы

разделили его развитие на два этапа, и на следующих этапах развития были измерены и рассчитаны следующие показатели.

Первый этап (развитие протокормов в протосомы):

- 1- Процент приживаемости (%);
- 2- Число корней (шт.);
- 3- Число новых протокормов (шт.).

Второй этап (развитие протосомов и образование ювенильных растений):

- 1- Длина побегов (см);
- 2- Длина корней (см);
- 3- Число новых протокормов (шт.).

Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и PAST 2.17с.

Результаты и обсуждение исследований

Было показано, что состав питательной среды является одним из важных факторов, оказывающих влияние на развитие протокормов и формирование семян у исследуемых видов. Результаты показали, что процент приживаемости протокормов был высоким на всех вариантах питательных сред, но у *D. fuchsii* он был большим при концентрации 2,0 мг/л 6-БАП (95,4%) (рис. 1).

Рис. 1. Влияние концентрации 6-БАП на приживаемость протокормов *D. fuchsia* после 60 суток культивирования

После прорастания семян концентрация цитокинина (6-БАП) оказывала влияние на

особенности морфологии образующихся протокормов. Более высокий процент единичных протокормов (51,0%) наблюдался при добавлении 1 мг/л 6-БАП в питательную среду, в то же время на питательной среде, содержащей 2 мг/л 6-БАП, были замечены наибольший процент конгломератов вторичных протокормов (68,0%) и образование новых вторичных протокормов у *D. fuchsii* ($5,5 \pm 0,3$ шт.), по сравнению с вариантом (1 мг/л 6-БАП) ($4,8 \pm 0,2$ шт.) (рис. 2, табл. 1). Это согласуется с результатами других исследователей, где они доказали положительное влияние добавления 6-БАП, картофельного пюре на пролиферацию и развитие протокормов наземных орхидей [14, 15].

Рис. 2. Влияние различных концентраций 6-БАП: А – 1,0 мг/л, Б – 2,0 мг/л на образование новых вторичных протокормов (масштаб 1 см)

Таблица 1. Влияние концентрации 6-БАП на характеристики протокормов *D. fuchsii* после прораствания *in vitro*.

Концентрация 6-БАП (мг/л)	Число новых вторичных протокормов, шт.	Протокормы	
		Единичные протокормы, %	Конгломерат протокормов, %
1	$4,8 \pm 0,2$	51,0	49,0
2	$5,5 \pm 0,3$	32,0	68,0

Во время развития протокормов *D. fuchsii* в протосомы при культивировании на питательной среде без регуляторов роста наблюдали наибольший процент укореняемости протосомов, который составил 78%. Установлено, что с повышением концентрации 6-ВАР 1 мг/л уменьшается процент укореняемости: до 20% (рис. 3).

Рис. 3. Влияние концентрации 6-БАП на укореняемость протосомов *D. fuchsii*

В то же время было найдено, что длина корней у протосомов *D. fuchsii* была большей при культивировании на питательной среде без добавления 6-БАП по сравнению с другими вариантами: 0,90 см (рис. 4).

Рис. 4. Влияние концентрации 6-БАП на длину корней протосомов *D. fuchsii*

На первом этапе у *D. baltica* было обнаружено, что процент приживаемости протокормов был высоким при помещении сферических протокормов на питательную среду ($\frac{1}{2}$ МС) с добавлением 1 мг/л 6-БАП и достигал 87% (рис. 5).

При культивировании протосомов *D. baltica* на питательной среде с 1 мг/л 6-БАП число образовавшихся побегов было равно $1,60 \pm 0,08$ шт., число корней – $1,80 \pm 0,10$ шт. Питательная среда, содержащая 2 мг/л 6-БАП, способствовала формированию большего числа новых вторичных протокормов ($3,20 \pm 0,10$ шт.). Необходимо отметить, что в среднем 35% от всех пересаженных протокормов не образовывали новые протокормы (табл. 2).

Рис. 5. Влияние концентрации 6-БАП на приживаемость протокормов *D. baltica* после 60 суток культивирования

Таблица 2. Влияние концентрации 6-БАП на характеристики протосомов *D. baltica* во время образования протосомов

Концентрация 6-БАП (мг/л)	Число образовавшихся побегов, шт.	Число корней, шт.	Число вторичных протокормов, шт.
1	1,60±0,08	1,80±0,10	2,10±0,10
2	1,04±0,02	0,80±0,08	3,20±0,10

При последующем культивировании протосомов *D. baltica* на питательной среде, содержащей 1 мг/л 6-БАП, наблюдали увеличение высоты побегов ($4,80 \pm 0,30$ см) и длины корней ($2,20 \pm 0,10$ см). Наряду с этим во многих исследованиях цитокинины усиливали развитие побегов и деление клеток некоторых видов *Dactylorhiza* [16], так же, как и добавление органических веществ, таких как пюре картофеля, в среду для размножения орхидей даёт перспективные результаты, поскольку они содержат углеводы, некоторые аминокислоты, витамины и регуляторы роста растений [1].

В то же время число новообразованных протокормов было выше на 30% на питательной среде с 2 мг/л 6-БАП ($3,00 \pm 0,20$ шт.) (табл. 3, рис. 6).

Таблица 3. Влияние концентрации 6-БАП на морфометрические характеристики сеянцев *D. baltica*.

Концентрация 6-БАП (мг/л)	Длина побегов, см	Число корней, шт.	Длина корней, см	Число новых протокормов, шт.
1	4,80±0,30	1,60±0,09	2,20±0,1	2,10±0,10
2	1,00±0,09	1,10±0,20	0,90±0,3	3,00±0,20

Рис. 6. Влияние различных концентраций 6-БАП: А – 1.00 мг/л, Б – 2 мг/л на морфометрические характеристики сеянцев *D. baltica*

Заключение

В процессе исследования были установлены особенности развития и оптимальный гормональный состав питательной среды для культивирования в условиях *in vitro* представителей рода *Dactylorhiza*. По скорости развития было замечено, что *D. baltica* развивался более быстро, чем *D. fuchsii*.

Для клонального микроразмножения *in vitro* *D. fuchsi* оптимальной средой для получения высокого процента приживаемости протокормов является среда $\frac{1}{2}$ МС, содержащая 20 г картофельного пюре, 1 г/л древесного угля и 1 мг/л 6-БАП. Для получения высокого количества новых вторичных протокормов оптимальным оказалось использование питательной среды $\frac{1}{2}$ МС с добавлением 6-БАП в концентрации 2 мг/л. При этом наибольшее образование новых протокормов составило $5,5 \pm 0,3$ шт. В то же время было обнаружено, что использование питательной среды без гормонов может быть лучше для образования протосомов с высоким процентом укореняемости (78%) и длинными корнями (0,9 см).

В результате наблюдений выявлено, что *D. baltica* способен развиваться и сформировать хорошо развитые сеянцы из протокормов за 6 месяцев, что характеризует высокий потенциал протокормов для размножения *in vitro*. Питательная среда $\frac{1}{2}$ МС, дополненная 20 г/л картофельного пюре, 1 г/л древесного угля и 1 мг/л 6-БАП, может быть рекомендована для эффективного развития протокормов *in vitro*. Сеянцы

характеризовались интенсивным ростом и развитием корней на одной и той же среде. Этот протокол является эффективным способом для широкомасштабного размножения *D. baltica*.

Список использованных источников

1. Rasmussen H.N. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, 1995. — 295 p.
2. Коновалова Т.Ю., Шевырева Н.А. Северные орхидеи. В культуре и в природе. — Ливны: ИП Мухаметов Г.В., 2016. — 302-303 с.
3. Варлыгина Т.И., Вахрамеева М.Г., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. — 437 с.
4. Jakobsone G., Belogradova I., Roze D., Megre D. *Dactylorhiza baltica* in vitro and in vivo // Acta Biol. Univ. Daugavp. — 2012. — Vol. 12. — N 2. — P. 151-165.
5. Teteryuk L.V., Kirillova I.A. Rare and protected Orchids of the Komi Republic // Arbeitskreis Heimische Orchideen. — 2011. — Vol. 28. — N 1. — P. 133-179.
6. Đorđević V., Jovanović S., Stevanović V. *Dactylorhiza fuchsii* (Orchidaceae), a new species in the flora of Serbia // Archives of Biological Sciences. — 2014. — Vol. 66. — N 3. — P. 1227-1232.
7. Кириллова И.А. Биологические особенности и состояние ценопопуляций орхидных бассейна Р. Щугор (национальный парк "Югыд ва") // Известия Коми научного центра УРО РАН. — 2018. — Т. 34. — № 2. — С. 17-25.
8. Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., Lipavská, H. European orchid cultivation—from seed to mature plant // European Journal of Environmental Sciences. — 2011. — Vol. 1. — N 2. — P. 95-107.
9. Dubynin A., Selyutina I., Egorova A., & Blinnikov M. An orchid (Orchidaceae)-rich area recommended for preservation in Novosibirsk Region, Russia // Acta Biologica Sibirica. — 2021. — Vol. 7. — N 7. — P. 21-38.
10. Batygina T.B., Bragina E.A., Vasilyeva V.E. The reproductive system and germination in orchids // Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. — 2003. — Vol. 45. — N 2. — P. 21-34.
11. Dutra D., Johnson T.R., Kauth P.J., Stewart S.L., Kane M.E., Richardson L. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2008. — Vol. 94. — N. 1. — P. 11-21.
12. Jakobsone G. Morphogenesis of wild orchid *Dactylorhiza fuchsii* in tissue culture // Acta Universitatis Latviensis, Biology. — 2008. — Vol. 745. — P. 17-23.
13. Крюков Л.А., Широков А.И., Сырова В.В. Анализ потенциала вегетативного

Хуссиен М., Коновалова Т.Ю., Молканова О.И.

Клональное микроразмножение представителей рода *Dactylorhiza Neck. ex Nevski*

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
 =====

размножения тубероидных орхидных на ранних стадиях развития *in vitro*. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – Т. 2. – С. 413-417.

14. Yan N., Hu H., Huang J.L., Xu K., Wang H., Zhou Z.K. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds // Plant cell, tissue and organ culture. – 2006. – Vol. 84. – N. 1. – P. 114-118.

15. Jiang H., Chen M.C., Lee Y.I. In vitro germination and low-temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* PJ Cribb & SC Chen, a rare and endangered lady's slipper orchid // Scientia Horticulturae. – 2017. – Vol. 225. – P. 471-479.

16. Jakobsone G. Germination and development of some terrestrial orchids in vitro. In III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. – 2007, September. – Vol. 812. – P. 533-538.

=====

Цитирование:

Хуссиен М., Коновалова Т.Ю., Молканова О.И. Клональное микроразмножение представителей рода *Dactylorhiza Neck. ex Nevski* [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2021. – №4. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2021/4/st_417.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/20214417>.