

УДК 582.594.2

Теплицкая Л. М.

## ОХРАНА РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ РАСТЕНИЙ КРЫМА: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Охрана редких видов растений – одно из основных направлений сохранения биологического разнообразия на нашей планете.

Крупнейшее семейство цветковых растений, *Orhidaceae* Juss., находится под угрозой исчезновения. Дикорастущие виды орхидей охраняются во многих странах мира (Приложение II Конвенции по международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения). Виды семейства Орхидных представляют большой научный и практический интерес. Многие из них декоративны и могут быть использованы в зеленом строительстве и цветоводстве; ряд орхидей обладают лекарственными свойствами и применяются в медицине, некоторые орхидеи являются источниками масел.

Крым – крупнейший центр видового разнообразия орхидных в Украине. Его флора насчитывает 47 видов семейства Орхидные, что составляет 72% видового разнообразия орхидных в Украине. Все виды крымских орхидей являются редкими, исчезающими растениями и занесены в Красную книгу Украины; 27 дикорастущих орхидей Крыма очень малочисленны и отнесены к I и II категории редкости. Большинство популяций крымских орхидей деградирует под влиянием антропогенного пресса. Так, за 10 лет (1988-1998 гг.) виды II-III категории редкости *Comperia comperana* (Stev.) Aschers. et Graebn., *Himantoglossum caprinum* (Vieb) C. Koch, *Limodorum abortivum* (L.) Sw. резко сократили свою численность и теперь отнесены к I категории [1, 2].

Естественное воспроизводство орхидей (от прорастания семян до генеративного состояния) длится 8-12 лет и зависит от наличия в экосистемах специфических опылителей и микоризных грибов [3].

Актуальной проблемой является сохранения природных популяций этих растений посредством разработки методов создания генетических банков и коллекций для сохранения генофонда [3, 4, 5, 6].

В решении этой проблемы неоспоримую помощь могут оказать методы клонального размножения орхидей *in vitro*. Такие методы детально разработаны лишь для 30 видов промышленно культивируемых красивоцветущих тропических орхидей [4, 5]. Клональное размножение орхидей умеренной зоны *in vitro* не разработано, что обусловлено особенностями репродуктивной биологии и сезонного развития этих орхидей [6, 7, 8]. Поэтому весьма актуальным является подбор методов ускоренного размножения редких дикорастущих орхидей крымской флоры

из вегетативных и генеративных органов в условиях *in vitro*. Последующая пересадка ювенильных особей в природные местообитания будет способствовать сохранению биологического разнообразия редких орхидей Крыма.

В связи с вышеизложенным целью работы является разработка эффективного метода ускоренного размножения некоторых видов крымских орхидей.

## **МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектами исследования являлись *Anacamptis pyramidalys* (L.) Rich., *Comperia comperana* (Stev.) Aschers. et Graebn., *Orchys mascula* (L.) L., *Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb. из природных источников.

## **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксплант – это часть или орган растения, перенесенный на питательную среду *in vitro*.

Материал для эксплантов брали из следующих частей растения: стебель, клубень, корень, завязь, пыльники в закрытом цветке. Все объекты промывали проточной водой и затем ополаскивали дистиллятом.

Материал стерилизовали в боксе. Бокс предварительно обрабатывали в течение 20 минут ультрафиолетом. В качестве стерилентов использовали 70% спирт, 10% хлорамин, 15% перекись водорода. Экспозиция подбиралась экспериментально.

Из органов растений стерильными инструментами вычленили ткани-экспланты и помещали на плотные и жидкие среды. Были использованы питательные среды Мурасиге-Скуга (MS) и Кнудсона «С» в модифицированном варианте.

Готовые среды разливают по стерильным пробиркам и закрывают фольгой. Пробирки помещают в автоклав на 30-40 мин. при давлении 1 атмосфера.

Экспланты культивировали в условиях (1) температура 24-25°C, освещенность 4500 люкс, фотопериод 16 часов, (2) в темноте, в термостате при температуре 21-27° С.

Культивируемые ткани визуально оценивались на стерильность и жизнеспособность каждые 5 дней. Определяли также процент выживаемости и чистоты культуры.

После появления растений-регенератов (через 6-9 месяцев) они переносились в субстраты и адаптировались к условиям естественных местообитаний. В качестве субстратов использовали перлит, высушенный сфагнум, смесь почва-торф и лиственной опад.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Получение асептической культуры тканей крымских видов орхидей**

Получение исходного материала является важным этапом в работе *in vitro*. Для успешного культивирования тканей *in vitro* материал должен быть стерильным. Патогенные грибы и микроорганизмы, попав на питательную среду, размножаются и губят культуру тканей. Поэтому материал для приготовления эксплантов стерилизуют. Необходимо подбирать такие стерилизующие вещества, которые бы убивали микроорганизмы и грибы, но оставляли жизнеспособными ткани растения.

У орхидей корни и клубни пронизаны мицелием микоризных грибов, а поверхностные ткани всех органов несут споры грибов и бактерии. Ткани орхидей

достаточно нежные. Поэтому мы разработали методику, согласно которой были использованы мягкие, щадящие стерилизующие вещества и сокращено время стерилизации (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных способов стерилизации на жизнеспособность эксплантов  
(*Anacamptis pyramidalys*)

Экспланты	Стериленты	Время стерилизации	Инфицированные пробирки	Погибшие экспланты %:	Жизнеспособные экспланты %
Клубни	70% спирт	1	0	0	100
	10% хлорамины	2			
	70% спирт	1	0	0	100
	10% перекись водорода	2			
Молодые корни	70% спирт	1	0	0	100
	10% хлорамины	2			
	70% спирт	1	0	0	100
	10% перекись водорода	2			
Сегменты стебля	96% спирт	5	0	0	100
Часть листа	96% спирт	5	0	46	54
Завязи	70% спирт	1	0	20	80
	10% хлорамины	2			
	70% спирт	1	0	0	100
	10% перекись водорода	2			
Пыльники	70% спирт	1	0	20	80
	10% хлорамины	2			
	70% спирт	5	0	0	100
	10% хлорамины	5			
	10% перекись водорода	5			

Установлено, что для сегментов стебля лучшим стерилизующим веществом был 96% спирт (время экспозиции 5 мин.) В этом случае все пробирки с эксплантами не инфицировались, экспланты не погибали, и через 2 недели образовывался каллус. Часть листа не инфицировалась при обработке 96% спиртом, но жизнеспособность этих эксплантов была снижена до 54%. Для завязей лучшим стерилизующими веществами были 70% спирт (время экспозиции 1 мин.) и 15% перекись водорода (время экспозиции 2 мин.)

Вариант с использованием пыльников из закрытого цветка не дал положительных результатов. Пробирки не были инфицированы, но эти экспланты не развивались и гибли.

Сегменты корней и клубни при дробной стерилизации 70% спиртом и 10% хлорамином (время экспозиции 1 и 2 мин.), а также 70% спиртом и 10% перекисью

водорода не инфицировались и не гибли. Они оставались жизнеспособными весь период культивирования (6-9 мес.).

Аналогичные результаты получены для всех фотосинтезирующих видов орхидей.

### **Культивирование эксплантов**

Эффективность размножения в значительной степени зависит от правильного выбора питательной среды. В большинстве случаев исследователи отдают предпочтение среде Мурасиге-Скуга (MS). Способность растений к возобновлению из эксплантов зависит от формы азота и его концентрации. Отличительной особенностью среды Мурасиге-Скуга является высокая концентрация неорганического азота. В ее состав входит две азотсодержащие соли  $KNO_3$  и  $NH_4NO_3$ , которые обеспечивают хорошее развитие органов растений. Входящие в состав среды биологически активные вещества, макро- и микроэлементы добавлялись в разных пропорциях. В каждом конкретном случае они подбирались с учетом особенностей развития тканей выращиваемых *in vitro*. Мы испытали несколько вариантов среды Мурасиге-Скуга (табл. 2). Они различались по содержанию биологически активных веществ: бензолил-амино-пурина (БАП),  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты ( $\alpha$ -НУК), гибберелловой кислоты (ГК) и кинетина.

Таблица 2

Влияние биологически активных веществ на регенерацию сегментов клубней  
*Anacamptis pyramidalys*

Вариант среды	БАП, мг/л	$\alpha$ -НУК, мг/л	Кинетин, мг/л	ГК, мг/л	pH среды	Образование побегов	Рост каллуса
MS-1	0,1	0,1	0,2	0,1	5,5	+	-
	0,1	0,1	0,2	0,1	7,2	+	-
MS-2	2,0	1,0	0,2	0,1	5,5	-	+
	2,0	1,0	0,2	0,1	7,2	-	+
MS-3	1,0	2,0	0,2	0,1	5,5	-	+
	1,0	2,0	0,2	0,1	7,2	-	+

Различный состав среды влияет на развитие экспланта в (1) орган или (2) недифференцированную ткань – каллус. В одном случае (вариант MS-1) среда способствует развитию экспланта и образованию побегов. В других случаях (вариант MS-2 и MS-3) эксплант образует каллус.

Высокую жизнеспособность проявляют сегменты клубней *Orchis mascula* и *Anacamptis pyramidalys* на всех вариантах среды MS. Меристематические зоны стебля и клубней *Anacamptis pyramidalys* через 6 недель культивирования образуют первичные побеги.

Таким образом, было установлено, что различные соотношения биологически активных веществ обеспечивают различные пути регенерации – увеличение содержания биологически активных веществ вызывает процесс образования каллуса (табл. 2). Значения pH среды не оказывает существенного влияния на развитие экспланта. Культивирование тканей орхидей на всех вариантах среды MS обеспечивает их жизнеспособность в течение длительного времени (до 12 месяцев).

Следующим этапом работы была пересадка образовавшихся побегов на среду для укоренения. В среду вносили (ИМК – индолилмасляную кислоту – 0,98 мг/л, ИУК – индолилуксусную кислоту – 2,8 мг/л,  $\alpha$ -НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту – 1 мг/л. При таком соотношении фитогормонов до 70% растений образовывали корни.

### Получение саженцев орхидей

Полученные в пробирке растения переносят в нестерильные условия. Эти растения имеют хорошо развитые листья, стебель (1-2 см) и корневую систему из 3-4 корней (длина до 4 см). Растения должны быть адаптированы к жестким условиям окружающей среды. Для этого субстрат, на котором будут расти растения, предварительно прогревали в течение 2-4 часов при температуре 85-90°C. В качестве субстрата мы использовали перлит, высушенный сфагнум и торфяную смесь (табл. 3).

Таблица 3

Влияние типа субстрата на получение саженцев орхидей

Тип субстрата	Приживаемость в нестерильных условиях, %	Укоренившиеся растения, %
Перлит	80	40
Высушенный сфагнум	100	80
Торфосмесь (почва – торф 1:1)	0	0

Субстрат помещают в горшочки. Перед посадкой корни растений укорачивают и обрабатывают раствором  $KMnO_4$ . Горшочки покрывают стеклянными банками и ставят на стеллаж. Каждые 10 дней растения удобряют минеральными удобрениями. Перед высаживанием растений в естественные местообитания субстрат с саженцами необходимо инфицировать мицелием почвенных грибов.

### Список литературы

1. Червона книга України: Рослинний світ. Відп. ред. Ю. Р. Шеляг-Сосонко. – К.: “Українська енциклопедія” ім. М. П. Бажана, 1996. – С. 336-403.
2. Голубев В. Н. Биологическая флора Крыма. – Ялта, второе издание, 1996. – 86 с.
3. Arditi J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture // *Orchid Biology. Rev. and Persp.* – 1099. – V. 1. – N 5,6. – P. 159-175.
4. Черевченко Т. М., Кушнир Г. П. Орхидеи в культуре. – Киев: Наукова думка, 1986. – 197 с.
5. Лаврентьева Е. Н. Методы массового размножения тропических и субтропических орхидей // Международная науч. конференция по охране и культивированию орхидей. Киев, сентябрь 1999 г.: Материалы. – Киев: Наукова думка, 1999. – С. 105-108.
6. Куликов П. В. Экология и репродуктивные особенности редких орхидных Урала // Автореф. дисс.... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 1995. – 24 с.
7. Попкова Л. Л. Редкие виды орхидных флоры Крыма, их микроразмножение и поддержание биологического разнообразия // Автореф. дисс.... канд. биол. наук. – Ялта. – 1999. – 17 с.
8. Андронова Е. В., Золотухина Н. О., Батыгина Т. Б. Репродуктивная биология и биотехнологические методы размножения редких видов орхидных // Международная науч. конференция по охране и культивированию орхидей. Киев, сентябрь 1999 г.: Материалы. – Киев: Наукова думка, 1999. – С. 26.

Статья поступила в редакцию 03.01.2001