

УДК 582.594.2:581.143.6

Л. М. Теплицкая, Н. Ю. Лысякова, Э. Г. Бирюлева

ОСОБЕННОСТИ МИКОТРОФНОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ОРХИДЕЙ ФЛОРЫ КРЫМА

ВВЕДЕНИЕ

Все представители семейства *Orhidaceae* Juss природной флоры Крыма являются редкими и исчезающими растениями, занесенными в Красную книгу Украины. Декоративность орхидей умеренной зоны открывает перспективы их интродукции и использования в качестве исходного материала для селекции. Некоторые орхидеи обладают лекарственными свойствами, антиоксидантным и мембранопротекторным действием, также являются источниками биологически активных веществ.

В естественных биоценозах у орхидных наблюдается длительное воспроизводство (8-12 лет), что связано с особенностями биологии, зависимостями биологии, зависимостью от специфических опылителей, эндомикоризных грибов. Важную роль в сохранении этих растений играет поиск методов ускоренного размножения, введения в культуру, репатриация в природные фитоценозы, а также создание генетических банков и коллекций для сохранения генофонда.

Метод культуры тканей позволяет решить проблемы ускоренного и массового размножения орхидей. В настоящее время работы ведутся в двух направлениях: проращивание семян и микрклональное размножение [1-4]. И тот, и другой метод широко используются для размножения тропических и субтропических видов. Для растений семейства орхидных умеренной зоны биотехнологические приёмы ещё не разработаны. Препятствием является недостаточные знания их репродуктивной биологии, морфогенетических особенностей, а также симбиотических взаимоотношений с эндомикоризными несовершенными грибами.

Исследование особенностей микоризообразования у крымских видов орхидей вместе с разработкой биотехнологических приемов размножения позволяет получить уникальный материал для селекции, сохранить и восстановить природные популяции, расширить фонд ресурсов для получения лекарственных средств.

В связи с этим, целью наших исследований было изучение симбиотических отношений эндوفитных грибов с некоторыми видами крымских орхидей.

МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили виды: *Platanthera chlorantha* (Cust.) – любка зеленоцветковая, *Orchis militaris* (L.) – ятрышник шлемоносный, *Orchis*

mascula (L.) – ятрышник мужской, *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich – анакамптис пирамидальный.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования выборочно выделялись корни и корневые клубни 4 видов орхидей. Каждый вид анализировался по фазам вегетации (ювенильной, виргинильной и генеративной) в разных местах обитания [5]. Фиксация материала проводилась 70° спиртом [6] и 4% формалином. Анатомические препараты окрашивались анилиновым синим [6, 7]. Определялась частота встречаемости (F) и степень микотрофности (D) растений [1, 2, 8]. Математическая обработка проводилась по методике Лакина [9]. Экспланты культивировались в условиях СУВР (24-25°C) в термостате. Высадка корней и корнеклубней проводилась на среды Кнудсона, Чапека-Докса, Боаса [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Локализация эндофитных несовершенных грибов-микоризообразователей в клетках и тканях корневой системы орхидных обусловлена её морфолого-анатомическими особенностями.

Подземная часть клубневых видов (*P. chlorantha*, *O. mascula*) представлена двумя корневыми клубнями и плагиотропными придаточными корнями. Корни сближены, залегают на глубине до 5 см. Длина их варьирует от $3,7 \pm 0,3$ см до $7,2 \pm 0,2$ см. Корневые клубни удлинённо-яйцевидные, на конце стянуты в шнуровидное окончание. Один из корнеклубней увядающий, мягкий, сморщенный, темного цвета. Длина активного функционирующего корневого клубня составляет $2,5 \pm 0,2$ – $3,2 \pm 0,4$ см, а диаметр $1,8 \pm 0,3$ – $2,2 \pm 0,2$ см.

Придаточные корни покрыты ризодермой. Под ризодермой расположена первичная кора, которая в периферической части дифференцирована на двухслойную экзодерму, мезодерму и эндодерму типичного строения. Центральный цилиндр представлен радиальным пучком с полиархной ксилемой.

При изучении локализации гифов эндофитного гриба в тканях корней и корнеклубней исследуемых видов выявлены определенные закономерности. В клетках эпibleмы гифы отсутствуют, но в самих корневых волосках их иногда можно увидеть. М.Г. Вахромеева, М.В. Ракова [5, 6, 11] называют их коммуникационными гифами. Эти гифы связывают с внешней средой плотные клубочки гиф (пеллотоны), расположенные в субэпидермальных слоях первичной коры. В центральной зоне мезодермы отмечено "переваривание" (расщепление) грибных гиф. Более активно этот процесс происходит около ядра клетки растения-хозяина. В клетке остаются лишь бесформенные комочки – экскреты. В эндодерме и центральном цилиндре гифы обнаружены не были. Степень микотрофности увеличивается от апекса к основанию корня в 2 раза.

Исследование срезов корневого клубня *P. chlorantha* показало сходство общего плана строения с корнем. Отличием является объемная по сравнению с другими зонами, в связи с запасующей функцией, мезодерма первичной коры, большое количество аминопластов и рафид оксалата Са в этих клетках.

Частота встречаемости, %

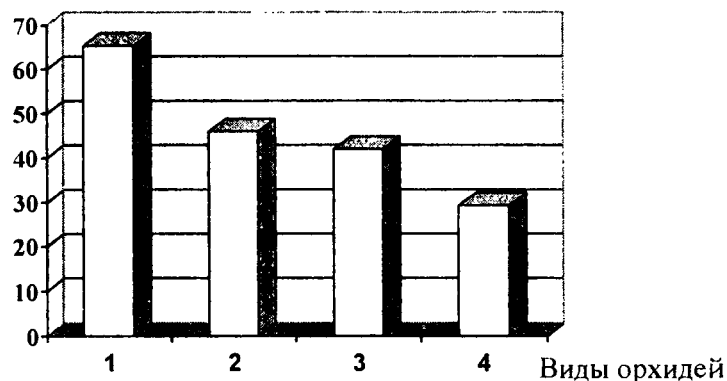


Рис. 2. Изменение частоты встречаемости микоризной инфекции у четырёх видов орхидных

- 1 – *P. chlorantha*
- 2 – *A. pyramidalis*
- 3 – *O. militaris*
- 4 – *O. mascula*

На наш взгляд изменение частоты встречаемости микотрофной инфекции предположительно связано с эколого-эдафическими (недостаточная освещенность, низкое содержание питательных веществ в почве, избыточное увлажнение, pH почвенного раствора) факторами и биологическими особенностями каждого вида [8, 14-17].

Следует отметить, что наименьшую зависимость от микоризного гриба проявляет *O. mascula*. Во всех вариантах опыта на всех этапах онтогенеза у этого вида отмечено минимальное количество гифов гриба в тканях корня и корнеклубня.

В связи с этим, интерес представляет выделение чистой культуры эндофитного гриба *O. mascula* и сопоставление морфометрических показателей мицелия гриба в монокультуре и тканях растения.

В результате проведенных исследований была получена чистая культура предполагаемого симбиотического гриба *O. mascula*. Наиболее эффективным при получении симбионта был метод множественных пассажей, суть которого заключается в получении смешанной культуры нескольких почвенных грибов, в том числе и эндофитного микоризного гриба полученных при посадке эксплантов корня и последующем их разделении. Участки корня высаживались в чашки Петри в условиях термостата в темноте, при температуре 22-23°C. Через 5-6 дней вокруг эксплантов корней образовывались колонии грибов белого цвета. Через каждые 5-6 дней колонии перепассировались. Другие методы, в частности метод почвенных разделений и другие не дали положительных результатов.

При визуальном изучении колонии гриба следует отметить, что колония белого цвета с пушистой поверхностью. При культивировании на питательной среде обнаруживается у грибницы стремление к радиальному разрастанию, рост её осуществляется равномерно во всех направлениях.

При культивировании гриба на питательных средах разного состава была выявлена разная скорость роста колонии. Так при культивировании гриба на средах Чапека-Докча гифы развиваются более быстро, но спороношение наступает позднее. При культивировании гриба на питательной среде Боаса образуются колонии меньшего размера, гифы развиваются хуже и спороношение наступает раньше (рис. 3, 4).

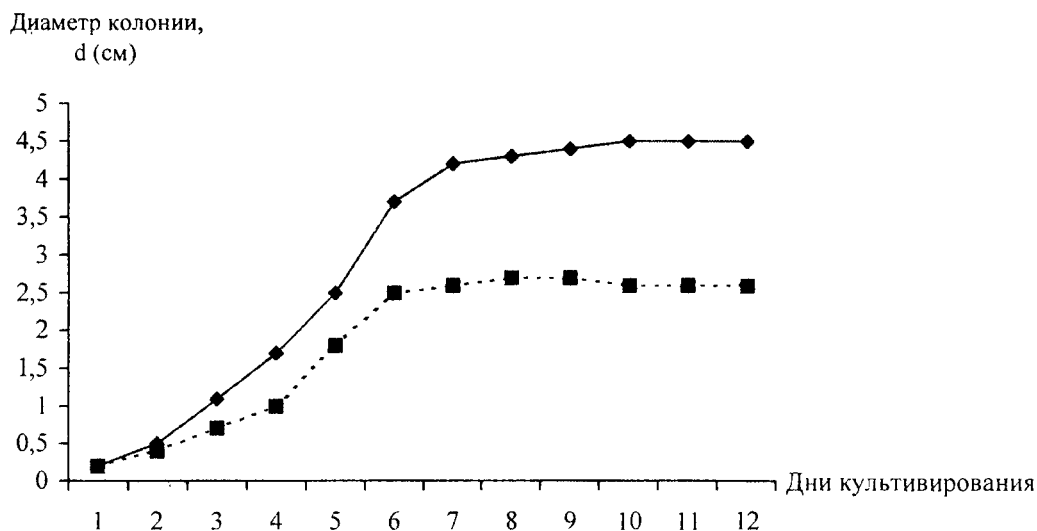


Рис. 3. Интенсивность роста колонии эндомикоризного гриба
 — рост мицелия на среде Чапека-Докса --- рост мицелия на среде Боаса

Физиологическое состояние колоний гриба в процессе роста изменяется. Первая стадия – это молодой активно растущий мицелий, имеющий максимальную скорость роста. Диаметр колоний составляет 4,5 см (на среде Чапека-Докса) и 2,5 см (на среде Боаса). На рисунке 3 видно, что активный рост мицелия идёт до 8-9 дня культивирования. Вторая стадия нами названа стадией "зрелого мицелия". Этот этап наступает после снижения скорости роста монокультуры. Кривые на графике выходят на плато. У гриба этот период характеризуется активным спороношением. И третья стадия – "стареющий мицелий". На этом этапе исчерпан запас питательных веществ среды, диаметр колонии не увеличивается. Наблюдается изменение цвета колонии, её деградация.

Морфологические исследования колонии гриба показали, что гифы гриба несептированы. Гифы не имеют перегородок и грибница представляет собой одну большую клетку, радиально разветвленную. На поверхности питательной среды гифы пересекаясь и переплетаясь образуют плотную пленку.



Рис. 4. Интенсивность роста колонии эндомикоризного гриба

При изучении гиф мицелия в монокультуре и гиф в клетках корня растения-хозяина в качестве сравнительного морфометрического показателя нами была взята ширина гиф. При измерении гиф гриба в монокультуре также изучалась частота встречаемости гиф различной ширины на колонию (в %), а в растении частота встречаемости гиф определённой ширины на группу клеток (табл. 1).

Таблица 1
Сравнительные морфометрические показатели мицелия гриба в монокультуре и тканях корня растения *Orchis mascula*

Ширина гиф изолированного гриба, (мкм)	Частота встречаемости на колонию, (%)	Ширина гиф в тканях растений, (мкм)	Частота встречаемости на группу клеток в растении
7,2±0,1	4,0	8,1±0,2	2,0
8,0±0,2	17,0	11,3±0,2	15,0
9,2±0,3	50,0	12,2±0,5	59,0
11,6±0,2	20,0	13,4±0,6	18,0
12,1±0,3	9,0	14,0±0,1	6,0

Полученные данные могут служить косвенным критерием оценки определения этапа развития гриба, его возраста. Ширина гиф изолированного гриба варьирует от

7,2±0,1 мкм до 12,1±0,3 мкм, наиболее часто встречаются гифы шириной 9,2±0,3 мкм – 50% частота встречаемости и 11,6±0,2 мкм – 20% частота встречаемости на колонию.

Ширина гиф в тканях корня растения варьирует от 8,1±0,2 мкм до 14,0±0,1 мкм. Наиболее часто встречаются гифы шириной 12,2±0,5 мкм – 59% частота встречаемости на группу клеток зоны всасывания корня и 13,4±0,6 мкм – 18%. Из данных видно, что в монокультуре изолированного гриба основную массу составляют гифы шириной 9,2±0,3 мкм, а в тканях корня 12,2±0,5 мкм.

На основании этих данных можно предположить, что в тканях растения по возрасту мицелий гриба продвигнут в своём жизненном цикле в отличие от изолированной культуры, в которой, не такие благоприятные условия для его развития, как в тканях растения. Поэтому ширина гиф мицелия может являться косвенным показателем физиологического развития гриба, соответствующего среде обитания.

Таким образом, в результате исследований выявлены закономерности динамики симбиотических отношений, выделена чистая культура эндофитного микоризного гриба крымской орхидеи вида *Orchis mascula*, выбрана среда и условия его культивирования в изолированных условиях *in vitro*, даны основные биотехнологические характеристики колонии: скорость роста, физические и химические факторы культивирования, выявлены морфометрические показатели гриба *in vitro* и в растении, которые могут являться показателем физиологического состояния гриба и его стадии развития.

Список литературы

1. Бургеф Х. Микориза растений. – М.: Сельхозизд., 1963. – 370 с.
2. Burgeff H. Mycorrhiza of orchids. – In.: The orchids, a Scientific Survey / Ed. C. Withner. – N.Y.: Ronald Press, 1959. – P. 361-396.
3. Morel G. Tissue culture – a new means of clonal propagation of Orchids // Am. Orchid. Soc. Bult. – 1964. – P. 473-478.
4. Knudson L. A new nutrient solution for germination of orchids seeds // Am. Orchid. Soc. Bult. – 1946. – No. 4. – P. 214-217.
5. Поддубная-Арнольди В.А. Орхидеи и их культура. – М.: Изд-во АН СССР, 1957. – 173 с.
6. Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского союза. – М.: Наука, 1981. – 217 с.
7. Сизова Т.П., Вахромеева М.Г. Особенности микоризы любки двулистной и ятрышника Фукса в зависимости от их возрастного состояния // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. Биол. – 1984. – № 2. – С. 27-31.
8. Селиванов И.А., Бейрах Э.А., Мельникова С.Л., Соломатова Н.Г. К инвентаризации микотрофных растений лесостепного Зауралья. – 1964. – С. 63-78.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 206 с.
10. Бугенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. – М.: Наука, 1975. – 50 с.
11. Вахрамеева М.Г., Ракова М.В. Орхидные Дальнего Востока. – В кн.: Охрана и культивирование орхидей. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 45-47.
12. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Развитие зародыша и проростка некоторых орхидных. – В кн.: Охрана и культивирование орхидей. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 73-75.

13. Вахрамеева М.Г., Денисова Л.В., Никитина С.В. Орхидеи нашей страны. – М.: Наука, 1981. – 220 с.
14. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. Бот. Ин-та АН СССР. – 1950. – № 6. – С. 204-206.
15. Крюгер Л.В., Шардакова О.М. Микосимбиотрофизм орхидных и некоторые вопросы их биологии // Микориза и другие формы консортивных связей в природе. – Пермь, 1980. – С. 20-28.
16. Semenova A.V., Makaveychuk A.Yu., Kislin E.N., Guseva M.V. Seed germination of boreal terrestrial orchids // Proc. XI Int. symp. "Embryology and seed reproduction". – Leningrad, July 307, 1990. – St. Petersburg: Nauka, 1992. – P. 489-490.
17. Weinert M. Keimugsfördernde Faktoren bei schwerkeimended europäischen Orchideen // J. Bodenpilze und Agarbedeckung. Die Orchidee. – 1990. – Bd. 41. – N 4. – S. 127-133.

Поступила в редакцию 15.06.2002 г.