

Е. А. ШЕЙКО¹, Д. М. СЫТНИКОВ²

¹Медицинская академия имени С.И. Георгиевского КФУ имени В. И. Вернадского, г. Симферополь, Республика Крым, Россия

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, г. Одесса, Украина
lenasheyko@mail.ru

МЕТОД СОХРАНЕНИЯ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ *GOODYERA REPENS* (L.) R. BR. И *DACTYLORHIZA ROMANA* (SEBAST.) SOO

*Работа посвящена разработке и совершенствованию метода культуры изолированных тканей и органов редких видов орхидных для использования в системе сохранения и воспроизводства растительных ресурсов. В результате проведенных исследований были получены каллусные культуры генеративных органов *Goodyera repens* (L.) R. Br. и *Dactylorhiza romana* (Sebast.) So .*

Ключевые слова: *Orchidaceae*, культура *in vitro*, эксплант, каллусогенез, фитогормоны.

Представители семейства орхидных (*Orchidaceae*), также известные как орхидеи, занимают особое положение в мире растений. Они привлекают разнообразием и декоративностью цветков, уникальными особенностями своей биологии и другими необычными чертами [8]. В настоящее время актуальным является разработка методов ускоренного размножения, введения в культуру, репатриация 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* генеративных структур, таких как пыльник, завязь и семязачаток, так как они имеют высокий морфогенетический потенциал и обладают определенной автономностью от материнского растения [7]. 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. Для орхидей умеренной зоны этот вопрос остается малоизученным, поэтому любые исследования, связанные с изучением репродуктивных особенностей, представляют значительный практический и теоретический интерес.

Целью наших исследований являлась разработка методики и введение в культуру *in vitro* редких видов орхидей умеренной зоны – *Goodyera repens* (L.) R. Br. и *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soó. Объектом исследования были редкие виды орхидей – *Goodyera repens* (L.) R. Br. и *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soó. *Goodyera repens* (L.) R. Br. произрастает в сосновых и смешанных лесах западной и центральной части Крымских гор. Современные их находки приурочены к северо-западным и юго-восточным склонам Ялтинской и Никитской яйл и Бабуган-яйлы. Вид внесён в Красную книгу Республики Крым со статусом «редкий». *Dactylorhiza romana* (Sebast.) So . встречается в дубовых и дубово-грабинниковых лесах, реже смешанных лесах, зарослях кустарников и лесных опушках в западной и центральной частях Главной гряды Крымских гор, а также в восточной части в районе Старого Крыма и Карадага. Вид внесён в Красную книгу Республики Крым и Красную книгу города Севастополя со статусом «редкий» [1, 2, 3, 4, 6].

Экспедиционными исследованиями было охвачено центральный район Главной гряды Крымских гор и западный район Южного берега Крыма. Для определения морфогенетического потенциала природного растительного материала в условиях *in vitro* были использованы генеративные органы орхидей: семязачатки, завязи и пыльники. Сбор материала проводился с учётом принципов биоэтики в фазах цветения и плодоношения. В лабораторном эксперименте с культурой тканей экспланты культивировали на стерильных питательных средах: Мурасиге – Скуга (завязи), Нича и Нич (семязачатки и пыльники). В качестве эксплантов использовали генеративные органы орхидей, которые были отобраны в начале цветения (пыльники), и на 25-й день после опыления (завязи и семязачатки). Предварительно проводили поверхностную стерилизацию эксплантов растворами, подобранными для каждого типа экспланта, после чего их промывали стерильной дистиллированной водой. Для пыльников использовали двойную стерилизацию 0,8 % $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ и 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 2 и 1 мин соответственно, для завязей – стерилизацию 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1,5 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (2 мин), для стерилизации семязачатков – двойную стерилизацию 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (2 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (3 мин). К стерилизующему раствору добавляли эмульгатор Твин-20 (1 капля / 100 мл раствора). Для удаления фенолов в воду для промывания эксплантов добавляли 7 % раствор L-цистеина, а процесс изоляции эксплантов проводили в стерильном растворе аскорбиновой кислоты на чашках Петри. Культивирование проводили в фотолюминостате ФСЛ-В (Россия) при 20–25°C, 16-часовом фотопериоде с освещением 1000–3000 лк и 70 % относительной влажности воздуха и в термостате ВТ-120 (Польша) при температуре 25°C и отсутствии освещения. Для индукции роста и поддержания культур тканей использовали индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л. Временные препараты с ацетокармином для цитологических исследований готовились по методике Паушевой [5]. Микроскопические исследования проводили на микроскопах МББ-1 (Россия) при увеличении – 8×, 20× и 90×, а также с помощью бинокля БМ-51-2 (Россия).

В фиксированных образцах определяли количество индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов (ЦТК). Фракцию гормонов выделяли 80%-ным этанолом, спирт упаривали. Водный остаток промораживали, центрифугировали при 10000 g, супернатант экстрагировали диэтиловым эфиром при pH 2,5 (ИУК и АБК) и бутанолом при pH 8 (ЦТК). Уровни связанных ИУК и АБК оценивали после химического гидролиза. Фракции ИУК и АБК очищали с помощью кислотно-щелочной переэкстракции и ТСХ на пластинах Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) в системе растворителей хлороформ : этилацетат : уксусная кислота (70 : 30 : 5). Очистку ЦТК проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке Дауэкс 50Wx8 (H^+ -форма, элюция аммиаком) и ТСХ в системе изопропанол:аммиак:вода (10 : 1 : 1). В качестве стандартов использовали препараты фитогормонов фирмы Sigma (США). Окончательный анализ качественного и количественного содержания фитогормонов проводился методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 В (США), колонка Eclipse XDB-C 18 2,1×150 мм, размер частиц 5 мм. Элюция проводилась в системе растворителей метанол : вода (37 : 63). Анализ и обработка хроматограмм производилась с использованием программного обеспечения Chem Station, версия В.03.01, в режиме *on line*. Все полученные результаты обрабатывали статистически с помощью компьютерной статистической программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. Достоверность разницы оценивали по критерию Стьюдента, используя 5 % уровень значимости ($P \leq 0,05$).

Культивирование растений *in vitro* для получения каллуса и растений-регенерантов невозможно без получения асептической культуры. Для соблюдения условий асептики

работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию пыльников проводили 0,8 % $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ (5 мин), 0,8 % $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ (2 мин) вместе с 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 мин) и 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 мин). В результате установлено, что максимальная стерильность для получения асептических эксплантов пыльников достигается при использовании двойной стерилизации 0,8 % $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ и 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 2 и 1 мин соответственно. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации составляла от 62 % (*D. romana*) до 70 % (*G. repens*). Не смотря на то, что при этом процент асептических эксплантов был ниже, чем при использовании двух других способов стерилизации (стерильность составляла в среднем 71 % для всех эксплантов), в дальнейшей работе использовали именно эту схему стерилизации, поскольку наблюдался высокий показатель жизнеспособности эксплантов, который составлял более 51 % (для двух других способов стерилизации показатель жизнеспособности не превышал 12 %).

Стерилизацию эксплантов завязей проводили с помощью 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ с экспозицией 3 мин, 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1,5 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (2 мин), 15 % H_2O_2 с экспозицией 2 мин. Максимальной стерильности эксплантов достигли при использовании 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 3 мин. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации варьировало от 80 % у *G. repens* до 91% для завязей *D. romana*. При этом процент жизнеспособных эксплантов оставался низким и составлял в среднем 29 %. Использование 15 % раствора H_2O_2 в течение 2 мин показало, что количественное соотношение асептических и жизнеспособных эксплантов совпадало (в среднем 21 %), что объясняется низкой токсичностью перекиси водорода для растительных тканей. Наиболее оптимальным способом стерилизации эксплантов завязей орхидных оказалась двойная стерилизация 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1,5 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (2 мин), поскольку при сравнительно низком проценте асептических эксплантов (55 %) количество жизнеспособных эксплантов, сравнительно с двумя другими способами стерилизации, был максимальным и составляло 50 %.

Для получения асептической культуры семязачатков использовали три способа стерилизации: 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 4 мин, 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (2 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (3 мин) и 15 % H_2O_2 с экспозицией 4 мин. Показано, что наиболее эффективным было использование двойного метода стерилизации 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (2 мин) и 15 % H_2O_2 (3 мин), поскольку данный метод обеспечивал получение максимального количества жизнеспособных асептических эксплантов, которое в среднем составляло 70 % для исследуемых видов орхидей.

Оптимальная питательная среда, физические факторы, баланс экзогенных и нативных гормонов – условия, обязательные для получения клеток, способных к морфогенезу. В ходе проведения эксперимента нами были использованы пять основных питательных сред: Мурасиге – Скуга, Кнудсона, Нича, Нича и Нич и Потата II. Состав среды был модифицирован для индукции каллусогенеза, чтобы в короткие сроки получить первичную каллусную ткань. В качестве основных дедифференцирующих факторов использовали природные фитогормоны и их синтетические аналоги: 2,4-Д, ИМК, 6-БАП. Данные регуляторы роста использовались в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л. Полученные нами данные, однако, позволили сделать вывод о том, что из всех сред наиболее пригодной для культивирования завязей изучаемых видов является среда Мурасиге – Скуга, а для культивирования пыльников и семязачатков – среда Нича и Нич с различными концентрациями регуляторов роста. При культивировании генеративных органов на остальных средах во всех вариантах наших исследований получены отрицательные результаты. Перед подбором оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде для культивирования эксплантов предварительно провели исследования содержания фитогормонов в интактных органах. Исследования по подбору оптимальных

концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде показали, что максимальная частота каллусогенеза из эксплантов завязей орхидных наблюдается на питательных средах, в которых сохраняется такое же соотношение цитокининов и ауксинов, как и для интактного органа. У *G. repens* максимальная частота каллусогенеза наблюдается при культивировании на питательной среде с добавлением экзогенных цитокининов и ауксинов в соотношении 1,9, что характерно для интактных органов. Для эксплантов завязей

D. romana такое соотношение фитогормонов составило 1,4. Наиболее оптимальными вариантами питательных сред для культивирования пыльников оказались: для *G. repens* – VIII (29,8±1,2 %), для *D. romana* – X (36,6±1,3 %). Для культивирования семязачатков наиболее эффективными оказались варианты питательных сред VI (*G. repens* – 22,2±1,1 %) и IX (*D. romana* – 19,5±1,0 %). При культивировании на питательных средах с другими количественными соотношениями фитогормонов частота каллусогенеза была значительно меньше и не превышала для всех типов эксплантов 11 %.

Каллус удалось получить при введении в культуру *in vitro* пыльников, завязей и семязачатков. В процессе введения этих эксплантов в культуру происходит переключение программы морфологически компетентных клеток генеративных структур с обычного гаметофитного пути на иной путь – спорофитный, то есть образования растения- регенеранта. В полученном нами каллусе были обнаружены мелкие клетки, локализованные группами, с крупными ядрами, образующими меристематический очаг. Появление меристематических очагов означало, что в каллусной ткани начались процессы дедифференциации. Деление клеток меристематических очагов могло приводить к образованию лигнифицированных проводящих элементов сосудов и трахеид. Их образование аналогично ксилемогенезу у интактного растения и включает в себя стадии: рост клеток, вакуолизацию, отложение вторичной оболочки в условиях *in vitro*.

Другой путь морфогенеза в меристематических очагах – это спонтанный эмбриоидогенез. Каллусная клетка, ставшая на путь эмбриоидогенеза, относительно обособляется от окружающих клеток, ограничиваясь плотной оболочкой, увеличивается, сильно окрашивается. Обособившаяся клетка претерпевает строго направленные деления. В результате заложения ориентированных клеточных перегородок возникает четырёхклеточная структура (тетрада), все клетки которой располагаются линейно. В дальнейшем формировании эмбриоида принимают участие как апикальные, так и базальные клетки, появляется многоклеточный эмбриоид.

Таким образом, цитологический анализ каллусных культур орхидных показал ряд специфических особенностей. К ним относятся: 1) значительная структурная гетерогенность клеток, наличие различных типов образований, различающихся по морфологии; 2) связь морфологических признаков отдельных образований с их морфологическими потенциями.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные растворы и режимы стерилизации для получения каллусной культуры из завязей, семязачатков и пыльников *G. repens* и *D. romana*; подобрана питательная среда и биологически активные вещества для культивирования эксплантов из генеративных органов орхидных *in vitro*. Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов генеративных органов орхидных и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микрклонального размножения этих видов. Результаты работы могут служить основой для разработки эффективных методов размножения редких орхидных в культуре *in vitro* при помощи экзогенных регуляторов роста. Показана возможность дальнейшего практического применения каллусных культур для возобновления и сохранения редких и исчезающих видов орхидей.

Список использованной литературы

- 1 Вахрамеева М. Г. Орхидные России (биология, экология и охрана) / М. Г. Вахрамеева, Т. И. Варлыгина, И. В. Татаренко. – М.: Тов. науч. изд. КМК, 2014. – 437 с.
- 2 Ена А. В. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы. Издание второе / А. В. Ена, А. В. Фатерыга (ред.). – Симферополь: Ариал, 2016. – 480 с.
- 3 Ефимов П. Г. Новые данные о распространении видов семейства *Orchidaceae* для некоторых регионов России / П. Г. Ефимов, М. М. Гафурова, А. В. Леострин [и др.] // Ботанический журнал. – 2018. – № 103 (7). – С. 923–930.
- 4 Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). – М.: Тов. науч. изд. КМК, 2008. – 885 с.
- 5 Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
- 6 Фатерыга А. В. Орхидеи Крымского полуострова / А. В. Фатерыга, П. Г. Ефимов, С. А. Свирин. – Симферополь: Ариал, 2019. – 224 с.
- 7 Швецов А. Н. Интродукция *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo в Главном ботаническом саду (ГБС) РАН / А. Н. Швецов, Р. З. Саодатова, Т. Ю. Коновалова [и др.] // Вестник СВФУ. – 2015. – № 3 (47). – С. 52–62.
- 8 Joffard N. Effect of pollination strategy, phylogeny and distribution on pollination niches of Euro-Mediterranean orchids / N. Joffard, F. Massol, M. Grenié, [et al.] // Journ. Ecol. – 2019. – №107 (1). – P. 478–490.