

УДК 582.594.2 (502.753)+581.143.6

**Оптимизация условий инициации асептических культур двух охраняемых видов орхидных *Liparis loeselii* (L.) Rich. и *Listera ovata* (L.) R. Br.**

**О.Н. Козлова<sup>1</sup>, Е.В. Андриевская<sup>2</sup>, В.В. Ширвель<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
*kozlova\_o@yahoo.com*

<sup>2</sup>Лицей Белорусского государственного университета

**Optimization of aseptic culture initiation conditions of two rare orchid species *Liparis loeselii* (L.) Rich. and *Listera ovata* (L.) R. Br.** V.M. Kazlova, E.V. Adrievskaya, V.V. Shirvel. Problems of aseptic culture initiation of two rare Belarussian orchid species are discussed in this article. It was shown that an optimal sterilization method for *Liparis loeselii* seed capsules was burning them in 96% alcohol. Fast medium was more suitable for seed germination of *Liparis*. The size of protocorm and its number depend on seed maturity. Optimal time for sowing *Liparis* seeds is 45 days after pollination. Optimal medium for *Listera ovata* seed germination and protocorm cultivation is BM medium.

В настоящее время в Беларуси произрастает 36 видов орхидных, относящихся к 19 родам. 21 вид включен в Красную Книгу Республики Беларусь, в том числе *Liparis loeselii* (II категория охраны) и *Listera ovata* (IV категория охраны)[1]. Остальные внесены в «Список растений, нуждающихся в профилактической охране» (изучении, наблюдении и контроле). Все виды орхидных на территории Республики Беларусь в разной степени охвачены охраняемыми мероприятиями. Одним из возможных путей сохранения орхидных является их искусственное размножение в культуре *in vitro* с последующим возвращением их в естественную среду обитания (посадка растений в малочисленные популяции и реинтродукция в местообитания, из которых они исчезли), а так же использование в практике цветоводства [2].

При проведении экспериментов по асептическому посеву семян двух исследуемых видов использовался семенной материал видов образцов *L. ovata* и *Lip. loeselii*, интродуцированных в ЦБС НАН Беларуси.

На первом этапе работы проводился подбор способа стерилизации при введении в культуру *in vitro* *Lip. loeselii* и *L. ovata*. В первом случае семенные коробочки сначала отмывали с мылом, а затем два раза обжигали в 96% спирте. При посеве *L. ovata* использовалась стерилизация с помощью 10% гипохлорита кальция. Выбор способа стерилизации был обусловлен размерами и толщиной стенок семенных коробочек (рисунок 1). Так как плоды орхидных созревают позже, чем семена возможна непосредственная стерилизация плодов перед посевом. Важным является подбор такого стерилизующего агента, который с одной стороны был наиболее эффективным, но с другой не повреждал оболочку плода и сами семена. В случае *L. ovata* обжиг мелких плодов с тонкими стенками непосредственно в пламени спиртовки привел бы к перегреву семян и гибели зародышей. Поэтому был использован способ стерилизации плодов без термической обработки.

После стерилизации плоды аккуратно вскрывали и производили посев семян на поверхность плотной агаризованной среды в чашки Петри. Чашки культивировали при комнатной температуре в темноте до момента образования всходов. Учет грибной и бактериальной контаминации проводили спустя неделю после посева.



Рисунок 1 - Плоды *L. ovata* (слева) и *Lip. loeselii* (справа) перед стерилизацией

При получении асептических культур двух исследуемых видов наиболее эффективным оказался способ стерилизации с обжигом в 96% спирте. При использовании такого способа стерилизации плодов процент посевов с контаминацией был намного ниже, чем при использовании гипохлорита кальция. Использование гипохлорита кальция в случае с *L. ovata* не дало нужных результатов. Поэтому вопрос подбора условий стерилизации подобных плодов требует дальнейшего изучения.

В результате экспериментов предполагалось оценить влияние состава сред на всхожесть *Lip. loeselii* в культуре *in vitro*. Показано, что образование протокормов происходило чаще при использовании среды Fast (таблица 2) [3]. Выявлена зависимость всхожести от состава питательных сред. После пяти месяцев культивирования число протокормов на среде Fast было намного больше, чем на среде ВМ (таблица 2)[4].

Таблица 2 – Влияние состава питательных сред на всхожесть и размер протокормов у *Lip. loeselii*

Вариант среды	Положение плода*	Наличие протокормов, %	Всхожесть, %	Диаметр протокорма, мм
ВМ	верх	50	6,2	1,10±0,09
	середина	-	-	-
	низ	-	-	-
Fast	верх	67	94,5	1,24±0,03
	середина	-	-	-
	низ	-	-	-

\* см. пояснения в тексте

Всхожесть семян у *Lip. loeselii* существенно зависела и от степени зрелости. Так как цветение и плодоношение происходят не равномерно (по мере раскрытия цветков при удлинении цветоноса), то и степень зрелости семян в плодах из разных участков соцветия будет тоже различаться. В эксперименте использовали плоды из верхней, нижней трети и середины соцветия. Разница в завязываемости плодов составила около двух недель между исследуемыми вариантами. Возраст плодов в нижней трети составил около 78 дней с момента опыления, в середине соцветия – 63 дня, и в верхней трети соцветия – 48 дней. Показано, что оптимальным было использование семян из верхней трети соцветия (наименее зрелые). При посеве семян, завязавшихся раньше, всходов не наблюдали (таблица 2, рисунок 2).

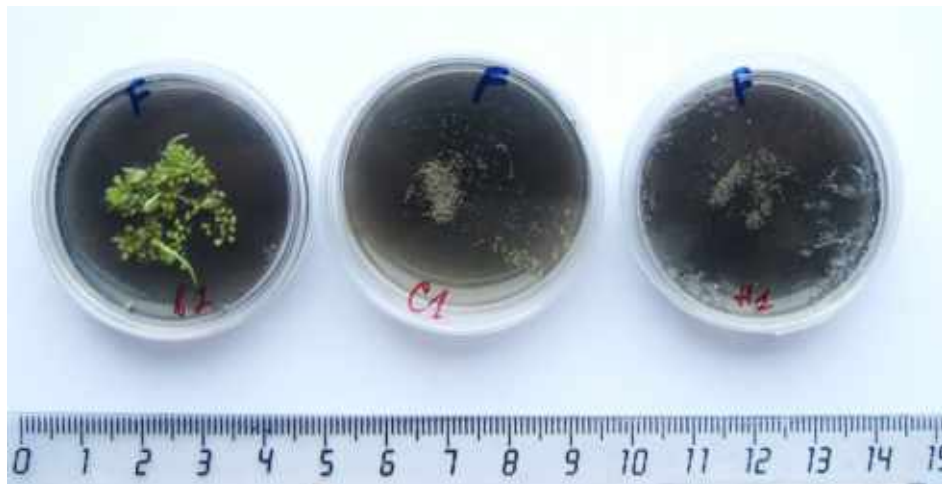


Рисунок 2 – Всхожесть семян у *Lip. loeselii* в зависимости от степени зрелости. Слева на право: верхушка, середина и нижняя треть соцветия.

Распространенной проблемой при введении в культуру *in vitro* орхидей умеренного климата является значительное снижение всхожести по мере созревания семян – стадия покоя [5]. При опробковении семенной оболочки начинает работать целый комплекс факторов, приводящих семена к стадии глубокого покоя. При посеве зрелых семян некоторых видов практически невозможно получить даже единичные всходы при непосредственном физическом и химическом воздействии на семена [2,6]. Так как зародыш в семени орхидных развивается раньше, чем опробковевает оболочка, то посев на стадии незрелых семян (с развитым зародышем) приводит к значительным успехам при проращивании семян многих трудно проращиваемых видов, которым относится и *Lip. loeselii* [6]. Сроки посева для таких видов определяются эмпирически.



Рисунок 4 – Всхожесть семян у *L. ovata* в зависимости от состава среды. Слева среда Fast, справа – VM.

В результате наших экспериментов показано, что оптимальными сроками посева семян *Lip. loeselii* является период 40-50 дней с момента опыления. При введении в культуру *in vitro* *L. ovata* использовали семенные коробочки в возрасте около 40 дней с момента опыления. Спустя пять месяцев после посева наблюдали прорастание семян только на среде VM (рисунок 3). При использовании среды Fast прорастания семян не происходило. Полученные нами результаты частично согласуются с данными Широкова с соавт., которые использовали среды и Fast, и VM при получении асептических культур тайника яйцевидного. Однако, в нашем случае использование

среды Fast оказалось не оправданным. Всходы были получены только при использовании среды ВМ. При этом положение плода на оси соцветия (т.е. степень зрелости семян) не оказывало существенного влияния на образование протокормов. Принципиальным фактором, влияющим на всхожесть *L. ovata*, возможно является наличие в среде кальция в форме гидролизата казеина, а так же L-глутамин и отсутствие минеральных источников азота. Использование среды Fast с большим содержанием органических добавок неопределенного состава (дрожжевой экстракт, пептон, гумат натрия) себя не оправдало.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редколлегия: Л.И. Хоружик (предс.), Л.М. Сушня, В.И. Парфенов и др. – Минск: 2015. – с 456.
2. Культивирование орхидей европейской России / А.И. Широков [и др.]; под общ. ред. А.И. Широкова. - Н.Новгород: 2005. - с 64.
3. Fast, G. Möglichkeiten zur Massenvermehrung von *Cypripedium calceolus* und anderen europäischen Wildorchideen / G. Fast // 8th World Orchid Conf., Frankfurt, 1975. / Proc. 8th World Orchid Conf. – Frankfurt, 1975. – P. 359-363.
4. Van Waes, J.M. In vitro germination of some Western European orchids / J.M. Van Waes, P.C. Deberg. // *Physiol. Plant.* – 1986. – Vol. 67. – P. 253-261.
5. Rasmussen, H. Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant / H. Rasmussen. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 444 p.
6. Орхидные Урала: систематика, биология, охрана / С.А. Мамаев [и др.]; под общ. ред. С.А. Мамаева. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 124 с.