

## **ДОВГОТРИВАЛЕ КУЛЬТИВУВАННЯ ТРОПІКОГЕННИХ ОРХІДНИХ IN VITRO ЯК СПОСІБ ЗБЕРЕЖЕННЯ ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ**

*Наведено дані відносно життєздатності 16 таксонів тропікогенних орхідних при тривалій безпасажній культурі. Встановлено, що у такий спосіб можна тривалий час зберігати цінні генотипи тропікогенних орхідних in vitro, що значно зменшує затрати праці з їх утримання. В ході експерименту встановлено низку адаптивних стратегій досліджуваних видів до умов тривалого безпасажного культивування, які виявляються насамперед різними морфологічними перебудовами.*

На сучасному етапі перед ботанічними садами різних країн стоять завдання зі збереження, відтворення генетичного різноманіття флори та пропаганди екологічного підходу до раціонального користування природними ресурсами планети. Великі колекції тропічних та субтропічних орхідних є прикрасою небагатьох ботанічних садів помірної зони. Перед науковцями, які займаються розмноженням тропікогенних орхідних in vitro, підтримкою колекцій цих рослин у ботанічних садах, постає дилема доцільності утримання в асептичних умовах великої кількості рослинного матеріалу, яка неминуче утворюється внаслідок насінневого розмноження. Крім того, іноді виникає потреба у створенні банків живих рослин in vitro, ресурси яких можна було б використовувати для обміну з іншими установами, підтримки власної колекції чи для експериментальної роботи. Збереження при низьких позитивних температурах для видів зазначеної групи є неприйнятним, можливість кріоконсервації насіння, тканин чи сіяньців є не в усіх установах. На сьогодні існує багато способів депонування рослинних тканин [1, 3, 4], але пошуки найоптимальнішого тривають.

У нормі частота пасажів для сіяньців чи рослин-регенерантів орхідних становить раз на 3—4 місяці. Кількість екземплярів, які стандартно вирощують на 50 мл пожив-

ного середовища, залежно від виду та віку рослин може відрізнятися на порядок (100 і більше штук). Тому планові пересадки потребують багато часу і є досить трудомісткими. Насіння тропікогенних орхідних зберігає найвищу схожість за оптимальних умов протягом 6—15 місяців, тому розробка способів тривалого збереження рослинного матеріалу, які б потребували мінімум фізичних і матеріальних затрат, є актуальним завданням. На організменному рівні кожному генотипу притаманна певна тривалість онтогенезу, впродовж якої рослини можна утримувати in vitro, після чого їх необхідно перевести ex vitro.

У зв'язку з вищевикладеним нам потрібно було з'ясувати:

- як довго в умовах культуральної кімнати можна утримувати без пересадок представників різних видів тропікогенних орхідних;
- протягом якого терміну можна без шкоди утримувати ті чи інші види в умовах безпересадочної культури;
- яким чином безпасажна культура вплине на процеси росту та розвитку ювенільних рослин;
- залежність життєздатності сіяньців від їх належності до групи епіфітів та наземних рослин.

Як об'єкти дослідження було обрано представників 16 видів та гібридів орхідних, які походять з різних континентів та нале-

жать до різних екологічних груп. Серед досліджуваних видів більшість є представниками південноамериканської флори (*Cattleya bowringiana* O'Brien, *C. granulosa* Lindl., *Encyclia tampensis* (Lindl.) Small, *Laelia lundii* Rchb. f. et Warm., *L. mantiqueirae* Pabst., *L. purpurata* Lindl., *L. rubescens* Lindl., *L. sincorana* Schltr., *L. lundii* × *mantiqueirae*, *Oncidium cebolleta* (Jacq.) Sw., *O. lanceanum* Lindl.), *Angraecum sesquipedale* Thouars походить з о. Мадагаскар, а решта видів (*Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f., *Paphiopedilum "Doreus"*, *P. delenatii* × *glaucophyllum*, *Phalaenopsis hybr.*) — з Азії. До епіфітних або літофітних видів традиційно відносять *Angraecum sesquipedale*, *Cattleya bowringiana*, *C. granulosa*, *Encyclia tampensis*, *Laelia lundii*, *L. mantiqueirae*, *L. purpurata*, *L. rubescens*, *L. sincorana*, *O. cebolleta*, *O. lanceanum*, *Phalaenopsis hybr.* До наземних видів, або таких, вихідні форми яких можуть вести наземний спосіб життя, належать *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f., *Paphiopedilum "Doreus"*, *P. delenatii* × *glaucophyllum* [2]. Кожен генотип був представлений рослинами, які вирощували у 5 колбах Ерленмеєра об'ємом 250 мл. У кожній колбі вирощували від 10 і більше рослин.

Рослини вводили в культуру *in vitro* насінневим способом. Було використано насіння, отримане в оранжереях Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України. Ємності з рослинами розміщували в культуральному приміщенні на скляних стелажах при освітленості 2 клк, фотоперіоді 16 год, температурі 22—26 °С, відносній вологості повітря 70%. Використовували найпоширеніше для культивування орхідних *in vitro* тверде агаризоване середовище Мурасіге-Скуга (МС), яке було модифіковане нами відповідно до потреб досліджуваних видів.

Для оцінки стану рослин у контрольній точці (момент часу, в який здійснюють моніторинг) нами була розроблена п'ятибальна шкала:

5 балів — всі рослини в групі живі, мають нормальний габітус;

4 бали — в групі є поодинокі відмерлі рослини або екземпляри з відмираючими листками і коренями низових формацій;

3 бали — в групі живих екземплярів більше 50%;

2 бали — в групі збереглись поодинокі живі особини (менше 20%);

1 бал — всі рослини в групі загинули.

Дослід тривав 1700 діб, після чого рослини залишили в колбах для визначення максимального строку виживання для кожного генотипу. До кінця експерименту не залишилось жодної живої рослини у таких таксонів, як *Paphiopedilum "Doreus"*, *Phalaenopsis hybr.*, *Bletilla striata*. В решті дослідних груп залишилась певна кількість живих рослин, їхній стан ми оцінили у 2 бали.

Головними проблемами, які виникають перед ювенільними рослинами при такому способі депонування, є дефіцит вологи, автоінтоксикація, нестача поживних речовин. Перші дві, на нашу думку, є найбільш значущими. Сіянци, які вижили, були дуже зневоднені, всі їхні частини втратили нормальну тургоресцентність. Колби з рослинами були закриті алюмінієвою фольгою, тому газообмін між навколишнім середовищем і сіянцями відбувався, що було позитивним моментом. Однак у такий спосіб поживне середовище постійно втрачало вологу і під кінець експерименту в більшості колб висохло повністю, що і стало, за нашими спостереженнями, головною причиною загибелі більшості дослідних особин. За таких умов частина рослин залишалася живими ще 80—100 діб. Припускаємо, що в разі герметичної упаковки кожної ємності результати експерименту могли б бути дещо іншими.

У результаті спостережень за сіянцями ми дійшли таких висновків. По-перше, можна виділити декілька типів прояву систем надійності у дослідних видів, які виявляли свою дію насамперед на морфологічному та фізіологічному рівнях. По-друге, найменш витривалими виявилися таксони, представники яких ведуть наземний спосіб життя: *Bletilla striata*, *Paphiopedilum "Doreus"*, *P. delenatii* × *glaucophyllum* та *Phalae-*

*popsis hybr.* (представники останнього роду є типовими епіфітами) (рис. 1).

Зазвичай ксероморфні ознаки в групах наземних орхідних виражені не так яскраво, як у епіфітів, тому вони є чутливішими до дисбалансу водного обміну, що і стало, на нашу думку, основною причиною ранньої загибелі рослин у ході експерименту. Сіянци *Phalaenopsis* мають м'ясисті листки, які є основним депо води в організмі рослини та, відповідно до своєї функції, інтенсивно транспірують. Як відомо, робота продихового апарату в умовах культури *in vitro* порушується — внаслідок постійно високої вологості повітря всередині культуральних емностей продиши постійно перебувають у відкритому стані. Крім того, для ювенільних рослин цього роду характерним є інтенсивне виділення вторинних метаболітів у поживне середовище, що призводить до аутоінтоксикації. Патологічний вплив останньої особливо чітко виявляється на середовищах, які не містять у своєму складі активованого вугілля. Морфологічні зміни (крім незначного збільшення лінійних розмірів) у рослин цієї групи не зафіксовані.

У решти таксонів, представники яких є переважно епіфітами із симподіальним типом наростання вегетативної сфери, виявлено низку змін в морфологічній структурі та ритмах наростання вегетативних пагонів:

- види із симподіальним типом галузнення в умовах безпасажної культури не формують пагонів другого та наступних порядків і наростають моноподіально, що для них не характерно. Живою залишається лише верхня ділянка стебла з 3—4 листками та кількома коренями, які сформувались з пазух останніх. Причому це явище спостерігалось нами як у сіянців, які ще не почали формування симподію, так і в окремих пагонів другого та наступних порядків (рис. 2, 3);
- окремі особини зберігають симподій у вигляді групи туберидіїв (3—4 шт.), що частково зберігають життєздатне коріння та бруньки поновлення і повністю втратили асимілюючі листки;

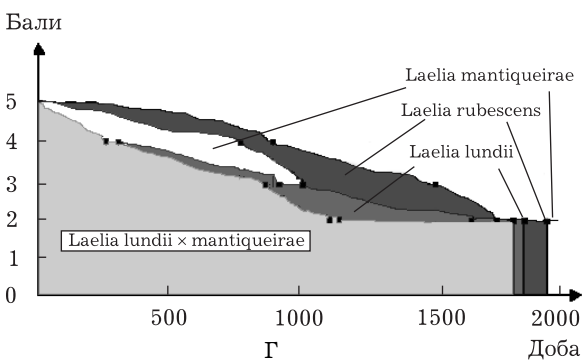
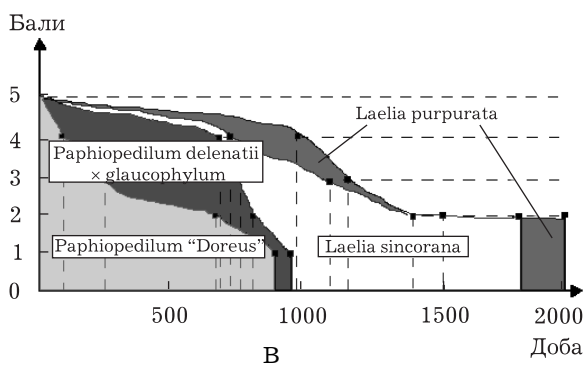
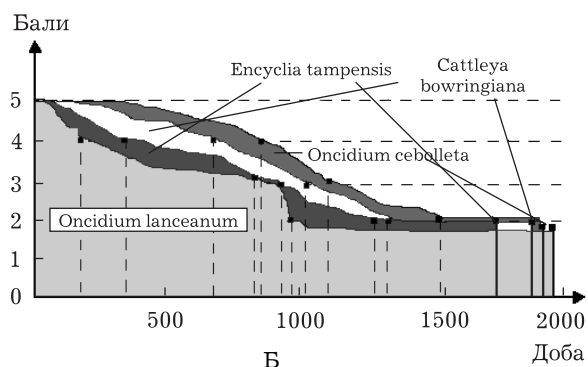
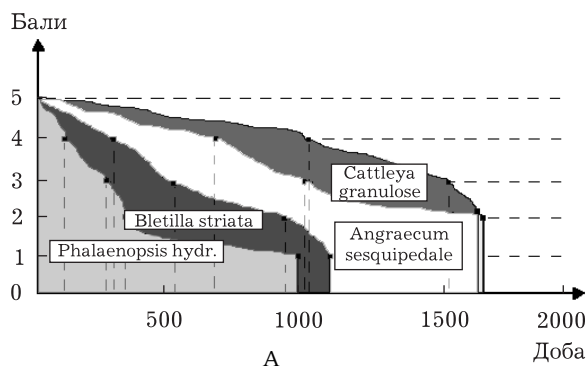


Рис. 1. А—Г: динаміка життєздатності сіянців досліджуваних видів у безпасажній асептичній культурі



Рис. 2



Рис. 3



Рис. 4

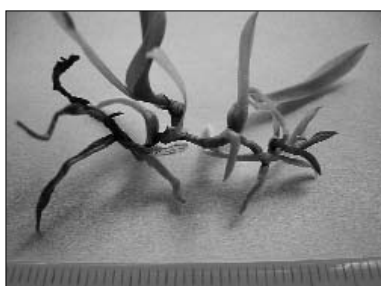


Рис. 5



Рис. 6



Рис. 7

Рис. 2. Сіянци *Cattleya bowringiana* з живою верхньою ділянкою стебла

Рис. 3. Пагони другого порядку сіянця *Laelia lundii*, які наростають моноподіально

Рис. 4. Сіянець *Laelia sincorana* з порушеною супідрядністю пагонів

Рис. 5. Сіянець *Laelia rubescens* з активно наростаючою плагіотропною ділянкою симподію, який має недорозвинені елементи структури

Рис. 6. Сіянци *Laelia rubescens* з редукованою, активно наростаючою плагіотропною частиною

Рис. 7. Сіянець *Parhiopedilum delenatii* × *glaucophyllum* з нехарактерно видовженими меживузлями

- припускаємо, що дисбаланс водного обміну може опосередковано впливати на супідрядність пагонів у симподії. Одночасно на одному екземплярі може розвиватися дві і більше бруньок поновлення. Крім того, відмічено тенденцію до зменшення лінійних розмірів кожного наступного пагона порівняно з попереднім (рис. 4);
- активне наростання плагіотропної ділянки симподію при недорозвиненні окремих елементів кожного метамеру (рис. 5, 6).
- у представників роду *Parhiopedilum* було зафіксовано нехарактерне подовження меживузль (рис. 7).

Ґрунтуючись на результатах власних спостережень, вважаємо оптимальним терміном для чергового пасажу строк, коли за розробленою нами шкалою стан рослин можна оцінити на три бали. Для кожного ви-

ду цей термін є специфічним (див. таблицю). Оптимальний термін для пасажу становить 60—70% від терміну максимальної тривалості життя у безпасажній культурі.

Можна припустити, що на здатність до виживання впливає також місце розміщення рослини в колбі. Однак нам не вдалося виявити залежності між розташуванням рослин та їхньою здатністю до виживання. В одних випадках живі рослини розташовувалися по периметру колби, в інших — у центральній частині.

За результатами проведених досліджень можна зробити такі висновки:

- безпасажну культуру можна застосовувати як найпростіший спосіб депонування на організменному рівні цінних генотипів тропікогенних орхідних в умовах культури *in vitro*;

**Тривалість життя та оптимальний термін пересадки при беспасажній культурі в умовах *in vitro***

Вид	Оптимальний термін пасажу, доба	Тривалість життя, доба
Angraecum sesquipedale	1005	1733
Bletilla striata	512	1092
Cattleya bowringiana	1117	1796
C. granulose	1525	1705
Encyclia tampensis	808	1755
Laelia lundii	912	1943
L. lundii × manti-queirae	830	1816
L. manticueirae	1003	1874
L. purpurata	1159	2025
L. rubescens	1483	1943
L. sincorana	1224	1888
Oncidium cebolleta	1096	1865
O. lanceanum	879	1933
Paphiopedilum "Doreus"	312	892
P. delenatii × glaucophyllum	512	949
Phalaenopsis hybr.	250	986

- системи надійності ювенільних рослин спрацьовують на всіх рівнях організації, що виявляється морфологічними змінами структур сіянцив та зміною їхніх ритмів росту і розвитку;
- термін для проведення необхідної пересадки для кожного виду визначається дослідним шляхом і є видоспецифічним;
- представники епіфітних видів із симподіальним типом наростання вегетативної сфери є більш витривалими та пластичними порівняно з наземними орхідними;
- у групах рослин, які вижили, виявлено особини на різних етапах розвитку, що свідчить про гетерогенність насіння в плоді. В кожній групі рослин живими залишилися здебільшого не найбільші та найрозвинутіші особини, а екземпляри середніх та найменших розмірів.

1. Карташова Е.Р. Збільшення тривалості фаз росту культур тканин і клітини за допомогою інгібітора ІОК-оксидазної активності // Физиол. и биохим. культур. раст. — 1992. — 25, № 4. — С. 397—403.

2. Червченко Т.М., Буюн Л.І., Ковальська Л.А. *ma in.* Орхідеї. — К.: Просвіта, 2001. — 224 с.

3. Augereu J.M., Courtois D., Petiard V. Simple storage of plant callus // Trends Biotechnol. — 1986. — 4, N 12. — P. 308—309.

4. Dereuddre J. Problemes poses par la conservation des souches cellulaires et des organs cultives in vitro // Bull. Soc. bot. Fr. Actual. Bot. — 1985. — 132, N 3-4. — P. 123—140.

Рекомендувала до друку А.М. Лаврентьєва

*Р.В. Іванников*

Национальный ботанический сад  
им. Н.Н. Гришко НАН Украины,  
Украина, г. Киев

**ДЛИТЕЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТРОПИКОГЕННЫХ ОРХИДНЫХ IN VITRO КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ**

Приведены данные относительно жизнеспособности 16 таксонов тропикогенных орхидных при длительной беспасажной культуре. Установлено, что таким образом можно длительное время сохранять ценные генотипы тропикогенных орхидных *in vitro*, что значительно уменьшает затраты труда на их содержание. В ходе эксперимента выявлено ряд адаптивных стратегий исследуемых видов к условиям длительного беспасажного культивирования, которые проявляются прежде всего различными морфофизиологическими перестройками.

*R.V. Ivannikov*

M.M. Gryshko National Botanical Gardens,  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Ukraine, Kyiv

**LONG CULTIVATION OF TROPICOGENIC ORCHIDS IN VITRO AS A WAY OF RARE GENOTYPES CONSERVATION**

Data concerning vitality of 16 tropicogenic orchids genotypes during long cultivation without replanting are given. It is determined, that in such a way it is possible to conserve for a long time valuable orchid's genotypes *in vitro* and cutting of work input on their cultivation. A series of adaptive strategies of test plants to the conditions of long cultivation without replanting were found during the experiment. The strategies became apparent first of all in the form of various morphological and physiological rearrangements.