
Теорія, методи і практичні аспекти інтродукції рослин

УДК 582.594.2:57.085.2

Т.М. ЧЕРЕВЧЕНКО, Л.І. БУЮН, А.М. ЛАВРЕНТЬЄВА, Р.В. ІВАННІКОВ

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1

МЕТОДИ НАСІННЕВОГО ТА КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ЕНДЕМА о. МАДАГАСКАР — ANGRAECUM EBURNEUM BORY (ORCHIDACEAE JUSS.)

*Наведено результати дослідів з розробки методів насінневого та клонального розмноження *Angraecum eburneum* Bory in vitro. Підібрано живильні середовища для всіх етапів мікророзмноження. Визначено оптимальні експланти та їхній морфогенний потенціал.*

Створення колекцій тропічних і субтропічних рослин у захищеному ґрунті помірних широт слід розглядати як одну з форм охорони тропікогенної флори та її різноманіття ex situ, спрямованої на збереження видів у природі. Найбільш ефективним способом збереження генофонду малопоширених і ендемічних видів орхідних є використання біотехнологічних методів in vitro. Розробка методів отримання масового посадкового матеріалу цих рослин є актуальним завданням, яке допоможе вирішити багато питань їх інтродукції та реінтродукції [3].

Рід *Angraecum* Bory нараховує понад 200 епіфітних, рідше літофітних і наземних видів, поширених у тропічній і південній Африці, на Мадагаскарі, Сейшельських островах і у Шрі-Ланці. Це моноподіальні, здебільшого великі за розміром (до 1,0–1,5 м заввишки) рослини з міцними повітряними коренями, які утримують їх у вертикальному положенні. Листки кількістю від 12 до 17, 50–70 см завдовжки та 5–6 см завширшки, ременоподібні, шкірясті, світло-зелені. Квітконіс міцний, прямостоячий,

40–60 см завдовжки. Суцвіття у *A. eburneum* — китиця, містить 5–12 квіток. Квітки 7–10 см у діаметрі, білі, зелені або жовтаві (рис. 1). Губа біла зі світло-зеленим шпорцем довжиною 6–7 см. Характерною ознакою є наявність довгих (1,5–2,0 см) темно-коричневих або майже чорних брактетей. Колонка дуже товста та м'ясиста. Початок бутонізації у вересні, цвіте у січні — лютому. Тривалість цвітіння — 1,5–2,0 місяці. У зрізі суцвіття зберігає декоративність 15–20 днів [4].

Штучне запилення показало, що це самосумісний вид, але не автогамний. Ефек-



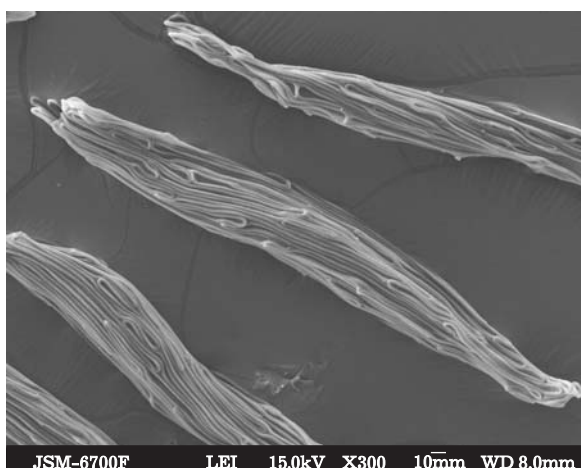
Рис. 1. Квітка *Angraecum eburneum*

© Т.М. ЧЕРЕВЧЕНКО, Л.І. БУЮН,
А.М. ЛАВРЕНТЬЄВА, Р.В. ІВАННІКОВ, 2011

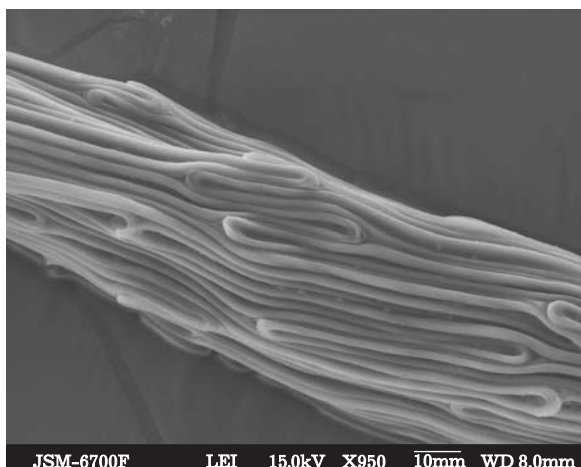
ISSN 1605-6574. Інтродукція рослин, 2011, № 3



Рис. 2. Плід *Angraecum eburneum*



а



б

Рис. 3. Мікрофотографії *Angraecum eburneum*: а — загальний вигляд насінини; б — клітини насінної оболонки

тивність штучного запилення вища при перехресному, ніж при самозапиленні, і становить 67 і 45 % відповідно.

Дозрівання плода триває 5,0–5,5 місяця (табл. 1). Плід у *A. eburneum* — коробочка, в період зрілості зеленувато-жовтого кольору, розкривається однією тріщиною, що загалом є характерним для представників триби Vandeeae (рис. 2). Особливістю є те, що периклінальні стінки практично непомітні, оскільки антиклінальні стінки розташовані близько одна до одної. Насіння коричневого кольору, дуже дрібне, від 360 до 450 мкм. Зародок займає більшу частину внутрішнього об'єму спермодерми — частка повітряного простору становить від 36 до 47 % залежно від положення запилюваної квітки у суцвітті (рис. 3).

Рослини *A. eburneum* можна розмножувати вегетативно, насінням та в культурі *in vitro*. Насіння цього виду ми отримували, запилюючи рослини в оранжерей.

У полі зору мікроскопа у 80–85 % насіння дуже добре видно зародки, однак іноді насінини зародків не мають.

Насіння *A. eburneum* висівали на різні за складом живильні середовища Кнудсона (Кн.) та Мурасіге–Скуга (МС). Перед висіванням насіння стерилізували за таким режимом: Chlorox — 15 хв та перекис водню (15 %) — 15 хв. Після кожного стерилізуючого агента насіння промивали у стерильній воді [5]. Живильні середовища були модифіковані додаванням до мінеральної основи пептону (2 г/л), гумату калію (50 мг/л), аденіну (2,0 та 4,0 мг/л), активованого вугілля (500 мг/л). Насіння висівали у колби Ерленмейера (250 мл) і поміщали в культуральне приміщення з таким режимом: температура — 26–28 °С, вологість — 70%, фотоперіод — 12 год і освітлення — 3–4 тис. лк.

Насіння *A. eburneum* починає проростати на 32-гу добу після висівання (табл. 2). На 50-ту добу відбувається активне формування протокормів, які мають 2–3 мм завдовжки. В цей період можна спостерігати

Таблиця 1. Морфометричні показники плодів рослин *Angraecum eburneum* Bory

№ зразка	Довжина, см			Ширина коробочки, см	Маса коробочки, г		Маса насіння, г
	колонки	плодоніжки	коробочки		з насінням	без насіння	
1	0,6	1,4	5,5	2,4	11,070	9,800	1,270
2	0,5	0,9	5,2	2,0	8,240	6,970	1,270
3	0,7	0,9	4,3	1,5	9,050	7,800	1,250
Середнє	0,6	1,1	5,0	2,0	9,450	8,200	1,260

масове позеленіння протокормів, тобто в цей період, імовірно, в них починають синтезуватися фотосинтетичні пігменти, і молоді спорофіти поступово переходять до автотрофного способу живлення. Протокорми мають булавоподібну форму, яка характерна для всіх видів *Angraecum*.

На 90-ту добу культивування протокорми збільшуються у 10 разів, і у них можна розрізнити апікальну та базальну частини. В субепідермальному шарі протокорму виникає меристематичний центр, який на перших етапах складається з невеликої групи клітин. Апікальна зона містить дрібні слабовакуолізовані клітини з густою цитоплазмою, які активно діляться. Ця зона займає приблизно 1/3 протокорму. Клітини цієї зони містять кристали оксалату кальцію — рафіди. Встановлено, що рафіди містяться в усіх частинах проростків орхідей, які активно ростуть, на всіх етапах їх росту та розвитку і є місцем відкладання енергетичних та пластичних речовин, які вступають у реакцію обміну [5]. Найбільші клітини базальної частини протокорму займають 2/3 його довжини, містять велику кількість крохмалю і виконують запасуючу функцію.

Одночасно з формуванням протокорму в його базальній частині з'являються клітини зі специфічними виростами (ризоїдами), які утворюють ризоїдальний комплекс. Ризоїди зазвичай зібрані у групи по 13–15 шт. У деяких сіянців ризоїдальний комплекс може формуватися не лише на базальній

частині протокорму, а й на бічних поверхнях. Поглинаючі волосинки подібні до кореневих і утворюють щільні структури, за допомогою яких протокорм утримується на поверхні [8].

На цьому етапі культивування можна спостерігати регенерацію багатoverхівкового вторинного протокорму в базальній частині первинного протокорму. При його утворенні вирішальними факторами є екзогенний рівень і розподіл фітогормонів у живильному середовищі. На відносно простому середовищі Кн. частка таких протокормів становить 12 %, а на середовищі МС їх утричі більше.

Деякі вчені вважають, що етап органогенезу починається після того, як протокорм досягне «критичної маси» [6]. Нами встановлено, що протокорми різних видів орхідей у фазі диференціації апекса пагона

Таблиця 2. Тривалість періоду проростання насіння та розвитку сіянців деяких видів *Angraecum*, доба

Вид	Початок проростання	Утворення рослин	Висадка у субстрат
<i>A. eburneum</i> Bory	32	150	240
<i>A. modestum</i> Hook. f.	90	203	285
<i>A. sesquipedale</i> Thou	34	210	274
<i>A. sanderianum</i> Rchb. f.	91	205	427

можуть значно відрізнятись за лінійними розмірами, проте їхня кількість однакова на цьому етапі органогенезу.

У процесі подальшого росту протокорму і проростка відбувається диференціація листових примордій і починає розвиватися провідна система. Формування першого листка у *A. eburneum* відзначено нами на 90-ту добу після висівання насіння. Листки закладаються у формі замкнутого валика і нагадують невелику луску, яка вкриває апікальну меристему. Другий листкоподібний орган розвивається безпосередньо з пазухи напроти першого.

У подальшому розвиток сіянців відбувається за рахунок послідовного закладання та росту листків наступного порядку і функціонування однієї апікальної меристеми. Формується біполярний проросток, в апексі якого відбуваються регулярні пластохронні цикли.

Розвиток сіянців *A. eburneum* відбувається дуже повільно і на 150-ту добу культивування вони мають лише 5 мм завдовжки. Сіянци *A. eburneum* морфологічно більш вирівняні, ніж сіянци *A. sesquipedale*, 95% з них не мають морфологічних відхилень. На 200-ту добу сіянци мають по 2 листки, у па-

зухах яких розташовані бруньки. У подальшому в базальній частині сіянців ендогенно закладається корінь, який має характерну для орхідей будову. При розвитку коренів другого та третього порядків базальна частина сіянців усихає.

У сіянців *A. eburneum* розрізняють три стадії розвитку — насіння, протокорм і проросток, які мають різні вимоги до живильних середовищ. З літератури відомо, що деякі комплексні сполуки покращують проростання насіння на 15–30% [1].

Нами встановлено, що внесення в середовище пептону, гумату калію та активованого вугілля поліпшує умови живлення, що виявляється збільшенням вегетативної маси сіянців (табл. 3).

Виявлено, що додавання аденіну спричиняє прискорений поділ клітин, що сприяє активній регенерації адвентивних пагонів і збільшенню кількості отриманих рослин. Як свідчать дані табл. 3, найбільший ефект отримано при концентрації аденіну в живильному середовищі МС 4 мг/л, що збільшило вегетативну масу сіянців майже у 5 разів.

Внесення активованого вугілля до всіх живильних середовищ є обов'язковим,

Таблиця 3. Вплив різних модифікацій живильних середовищ Кнудсона (Кн.) та Мурасіге–Скуга (МС) на ріст сіянців *Angraecum eburneum*

№	Живильне середовище	Концентрація, мг/л	Інтенсивність наростання вегетативної маси		
			Висота рослин, см	Довжина коренів, см	Сира маса 20 рослин, г
1.	Кн. + гумат калію + а. в.	50,0 + 500,0	1,5	0,5	1,160
2.	Кн. + пептон + гумат калію + а. в.	2000,0 + 50,0 + 500,0	2,5	1,0	2,900
3.	МС + аденін + а. в.	2,0 + 500,0	2,0	0,6	1,645
4.	МС + аденін + а. в.	4,0 + 500,0	3,0	1,5	5,350
5.	МС + НОК + 2,4-Д + гідролізат казеїну	0,5 + 0,2 + 200,0	2,5	1,0	3,490
6.	Кн. (контроль)		0,5	0,2	0,640

Примітка: а. в. — активоване вугілля; НОК — нафтилоцтова кислота.

оскільки це сприяє поглинанню фенольних сполук, які виділяються у середовище і можуть спричинити загибель рослин [2].

Сіянци *A. eburneum* 1,5–3,0 см довжиною з 3–4 листками і 2–3 коренями (через 240–300 діб) можна висаджувати у субстрат (рис. 4). Після пересадки *ex vitro* ріст сіянців значно прискорюється, їхня вегетативна маса у десятки разів перевищує таку у рослин, що залишилися у колбах *in vitro*.

При мікророзмноженні як джерело експлантів використовували однорічні пагони генеративно зрілих рослин. Листя і корені у пагона обрізали, отримуючи відрізок 14 см завдовжки. У пазухах листків знаходяться до 6 спіральні розташованих бруньок.

Проведений морфологічний аналіз виявив, що бруньки базальної частини пагона значно більші за інші — від 0,7 мм до 1 см завдовжки. Бруньки середньої частини розміром до 0,5 мм, добре розвинені. Що ближче до апексу розташовані бруньки, то менші розміри вони мають (до 2 мм завдовжки).

Для стерилізації рослинного матеріалу, отриманого з оранжерей, використовували розроблений нами метод [5].

З літературних джерел відомо, що від розміру експланта значною мірою залежить тип морфогенезу [10]. У зв'язку з цим ми використовували пазушні бруньки 0,3–0,5 мм завдовжки. Через 1,5–2,0 місяці культивування на живильних середовищах відбувається регенерація первинного протокорму. Його розвиток починається з набухання тканин листових зачатків. На поверхні експланта та на основній частині листових зачатків відбувається інтенсивне ділення клітин епідермісу. При цьому утворюється довгий ряд клітин, які формують протокорм. Іноді утворюється не один, а 2–5 і більше протокормів. Вони мають вид кулястих блискучих потовщень, спочатку білого, а потім зеленуватого забарвлення, з довгим рядом ризоїдів у нижній частині. Вони ідентичні протокормам, отриманим з насіння [9].

Установлено, що при діленні первинного протокорму він регенерує велику кількість



Рис. 4. Ювенільні рослини *Angraecum eburneum*, придатні до висадки *ex vitro*

вторинних протокормів. Їхнє розмноження відбувається у геометричній прогресії за рахунок ділення клітин субепідермального шару первинного протокорму [7, 10]. Тривалість пластохрону становить 30–45 діб, тобто закладання листових зачатків відбувається нерівномірно. Перший корінь диференціюється ендогенно після утворення 2–3 справжніх листків.

Вивчення регенераційної здатності різних за походженням експлантів виявило, що найбільшим цей показник був у бруньок апікальної частини та пазушних бруньок відростаючого пагона (65 і 60 % відповідно) (табл. 4).

Проведені дослідження дали змогу визначити два способи мікророзмноження *A. eburneum*: регенерація протокормів з апікальних і латеральних меристем відростаючих пагонів; індукція протокормів і паго-

Таблиця 4. Морфогенетичний потенціал різних експлантів *Angraecum eburneum* в культурі *in vitro*

№	Експлант	Кількість, шт.	Структури, які утворились, % від загальної кількості		
			Нерозвинені експланти	Протокорми	Пагони
1.	Верхівка відростаючого пагона	10	5	65	30
2.	Пазушні бруньки відростаючого пагона	10	10	60	30
3.	Сегменти ізольованих листків і коренів сіяньців	20	10	30	60
4.	Сегменти ізольованих сіяньців	20	5	30	65

нів з сегментів ізольованих сіяньців. Обидва способи з достатньою ефективністю можуть бути використані при мікророзмноженні *A. eburneum in vitro*.

Було також проведено вивчення впливу складу живильних середовищ на процес мікророзмноження *A. eburneum*. Ізольовані експланти культивували на живильних середовищах МС, Піріка, WPM з різними концентраціями та співвідношенням регуляторів росту (табл. 5). Використання живильного середовища WPM не дало позитивних результатів, тому воно було виключено з наступних досліджень.

Найкращі результати отримано на живильних середовищах № 2, 3, 4. Внесення до середовища Піріка зеатину (0,5 мг/л) сприяло утворенню найбільшої кількості протокоормів (80%). Дещо нижче цей показник був на середовищах МС (60 і 50% відповідно). Установлено, що для отримання пагонів *A. eburneum* краще використовувати середовище МС або його половинну концентрацію з додаванням 2–4 мг/л аденіну. Внесення

Таблиця 5. Вплив складу живильних середовищ на морфогенез експлантів *Angraecum eburneum in vitro*, %

№	Живильне середовище	Компонент	Концентрація, мг/л	Кількість експлантів, шт.	Структури, які утворились, %		
					Нерозвинені експланти	Протокорми	Пагони
1	МС	Аденін	2,0	8	10	30	60
		НОК	0,5				
		А.В.	500,0				
2	Піріка	Зеатин	0,5	8	10	80	10
		ІОК	0,2				
		А.В.	500,0				
3	МС	БАП	2,0	9	5	60	35
		ІОК	1,0				
		А.В.	500,0				
4	МС (1/2 концентрації)	Аденін	4,0	10	10	50	40
		ІОК	1,0				
		А.В.	500,0				

Примітки: МС — середовище Мурасіге—Скуга; А.В. — активоване вугілля; ІОК — індолилоцтова кислота; НОК — нафтилоцтова кислота; БАП — бензиламінопурин.

ІОК (0,2–1,0 мг/л) до живильних середовищ має перевагу над НОК.

Сегменти ювенільних пагонів на живильному середовищі № 4 регенерували масу адвентивних пагонів, тоді як підвищена концентрація аденіну (4 мг/л) блокувала апікальне домінування і сприяла регенерації нових рослин. Обкорінення отриманих пагонів відбувалося на середовищі № 4 з додаванням 2 мг/л ІМК.

Постасептична адаптація *A. eburneum* відбувалась без особливих ускладнень. Як первинний субстрат використовували сфагновий мох, на якому приживаність рослин становила 95–100 %.

Таким чином, було опрацьовано методи насінневого та клонального мікророзмноження унікального виду, ендема о. Мадагас-

кар — *A. eburneum*. Досліджено особливості проходження основних етапів онтогенезу в умовах асептичної культури та отримано достатню кількість посадкового матеріалу.

1. *Іванніков Р.В.* Біологія розвитку видів роду *Laelia* Lindl. в умовах оранжерейної культури та культури *in vitro*: Дис. ... канд. біол. наук. — К., 2001. — 152 с.

2. *Лаврентьєва А.М.* Використання біотехнологічних методів розмноження декоративних інтродуцентів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2004. — Вип. 36. — С. 137–145.

3. *Лаврентьєва А.М., Іванніков Р.В.* Використання методів асептичної культури для розмноження рідкісних та високодекоративних представників тропікогенної флори // Інтродукція рослин. — 2004. — № 1. — С. 41–47.

4. *Черевченко Т.М., Буюн Л.І., Ковальська Л.А.* та ін. Орхідеї. — К.: Просвіта, 2001. — 224 с.

5. *Черевченко Т.М., Лаврентьєва А.Н., Іванніков Р.В.* Біотехнологія тропічних і субтропічних рослин *in vitro*. — К.: Наук. думка, 2008. — 560 с.

6. *Шевцова Г.Г., Батыгина Т.Б., Лаврентьєва А.Н.* Некоторые аспекты системы воспроизведения орхидных на примере *Cymbidium hybridum* (Orchidaceae). // Ботан. журн. — 1986. — **71**, № 11. — С. 1457–1467.

7. *Champagnat M., Morel G.* La culture *in vitro* des tissus de tubercules d'*Ophrys* // *Conep. Rend. Acad. Sci. Paris.* — 1972. — **274**, N 10. — P. 3379–3380.

8. *Chudovskaya E.A.* Some anatomo-gistological features of orchids morphogenesis *in vitro* // Матеріали Міжнар. наук. конф. «Охорона і культивування орхідей». — К.: Наук. думка, 1999. — С. 139.

9. *Morel G.* Tissue culture — a new means of clonal propagation of Orchids // *Bot. Caz.* — 1964. — N 6. — P. 473–478.

10. *Morel G.* Clonal multiplication of orchids // *The Orchids. Scientific studies.* — New York: Wiley — Ln.-tersci. publ., 1974. — P. 169–222.

Рекомендувала до друку
Л.А. Ковальська

*Т.М. Черевченко, Л.І. Буюн,
А.Н. Лаврентьєва, Р.В. Іванніков*

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

МЕТОДИ СЕМЕННОГО
И КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
ЭНДЕМА о. МАДАГАСКАР — *ANGRAECUM
EBURNEUM* BORY (ORCHIDACEAE JUSS.)

Приведены результаты опытов по разработке методов семенного и клонального размножения *Angraecum eburneum* Bory *in vitro*. Подобраны питательные среды для всех этапов микроразмножения. Определены оптимальные экспланты и их морфогенный потенциал.

*Т.М. Cherevchenko, L.I. Buyun,
A.M. Lavrentyeva, R.V. Ivannikov*

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

METHODS OF SEEDS AND CLONE
MICROREPRODUCTION OF ENDEMIC AN
ISLAND MADAGASCAR — *ANGRAECUM
EBURNEUM* BORY (ORCHIDACEAE JUSS.)

Results of researches on working out of methods seed and clonal reproduction of *Angraecum eburneum* Bory are given. Nutrient mediums for all stages of microreproduction are picked up. Optimum explants and them morphogenic potential are defined.