

# Збереження чоловічих гаметофітів орхідних при низьких критичних температурах

Р.В. ІВАННІКОВ

Національний ботанічний сад НАН України, м. Київ

## Preservation of Orchid Male Gametophytes at Critical Low Temperatures

R.V. IVANNIKOV

National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Принципова можливість тривалого збереження фертильності чоловічих гаметофітів тропічних та субтропічних орхідних при температурах нижчих за 0°C була нами показана у попередніх роботах. З літературних джерел відомі нечисельні публікації відносно криозбереження пилку деяких видів орхідних [Carvalho V.S., 2006; Wagner A., 2008]. Автори наводять складну, багатоетапну процедуру проводки полінаріїв через серію розчинів кріопротекторів, яка є коштовною і не завжди зручною у практичній роботі. В роботах, які на сьогодні опубліковані, здебільшого йдеться про пилок цінних у комерційному відношенні видів та їх гібридів, натомість представникам рідкісних та зникаючих видів увага практично не приділяється.

Відповідно до цього метою нашої роботи було відпрацювання протоколу процедури тривалого збереження пилку орхідних, який би суміщав у собі позитивні сторони кріотехнологій та відносну простоту технік низькотемпературного зберігання полінаріїв орхідних. Як об'єкти для даного етапу дослідження нами були обрані рослини *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe і *Phalaenopsis sp.* з колекції НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Рослини *P. appletonianum* в природі літофіти, а більшість представників роду *Phalaenopsis* Blume – типові епіфіти.

Зібраний пилок поміщали у спеціальні віалі для заморожування на целулойдні стрічки. Пилок кожного з видів був розділений на контрольну та експериментальну групи. Заморожування полінаріїв проводили у рідкому азоті шляхом прямого занурення віалей у судину Дьюара. Експозиція 7 хв. Після цього віалі поміщали у термос на льодяну баню, який попередньо витримували добу в холодильній камері (–18°C). В термосі зразки знаходилися 1 годину (під час транспортування), після чого віалі розташовували в холодильній камері (–18°C). Контрольні партії полінаріїв після розморожування перевірялися на здатність до запилення. Експериментальну партію зберігали в холодильнику і щорічно, в сезон квітання, перевіряли полінарії на фертильність. При зберіганні у віалі із полінаріями завжди додавали гранули гідрофільного сорбенту (силікагель). Отримане в результаті експерименту насіння мало нормальну морфологію і було висіяне на живильні середовища MS. Розвиток сіянців представників дослідних видів за фенологічними та морфологічними параметрами не відрізнявся від норми.

Таким чином, нами вперше була розроблена проста й ефективна процедура тривалого зберігання чоловічих гаметофітів тропікогенних орхідних, яку можна використовувати як для наземних видів, так і для типових епіфітів. Встановлено, що, застосовуючи дану методику, можна зберігати фертильність полінаріїв орхідних не менш двох років.

Principle possibility of long-term preservation of fertile male gametophytes of tropical and subtropical orchids at the temperatures below 0°C has been shown by us previously. There are known a few publications as for cryopreservation of pollen of some orchids [Carvalho V.S., 2006; Wagner A. 2008]. The authors present a complicated, multi-stage procedure of pollinaria exposure in the series of cryoprotectant solutions, which is very expensive and not always suitable in practice. In the reports which have been already published mostly the pollen of commercially valuable species and their hybrids is described, but the attention has not been virtually paid to the representatives of rare and endangered species.

Therefore our research aim was to develop the protocol of long-term preservation of orchid pollen, which would combine the positive issues of cryotechnologies and relatively simple techniques of low temperature preservation of orchid pollinaria. We have chosen the plants *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe and *Phalaenopsis sp.* from the collection of M.M. Gryshko National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine. Plants *P. appletonianum* in nature are lithophytes, and the majority of the representatives of *Phalaenopsis* Blume are typical epiphytes.

The collected pollen was placed into special freezing vials and to celluloid bands. The pollen from each species was divided into control and experimental groups. Pollinaria were frozen in liquid nitrogen by a direct plunging of vials into Dewar vessel. The exposure time was 7 min. Afterwards the vials were placed into thermal vessel on ice bath, which was preliminarily kept in freezing chamber (–18°C). In thermal vessel the samples were kept during 1 hr (during transportation) afterwards the vials were located in freezing chamber (–18°C). Control batch of pollinaria after thawing was checked for pollination ability. Experimental batch was stored in refrigerator and annually in blossom season the pollinaria were checked for the fertility. When storing in a vial with pollinaria the granules of hydrophilic adsorbing agent (silica gel) was always added. The obtained as a result of experiment seeds were of normal morphology and was seeded onto nutrient medium MS. The developing seedlings of the representatives of species on their phenological and morphological parameters did not differ from the norm.

Thus we have for the first time developed a simple and effective procedure of long-term preservation of tropicogenic orchid male gametophytes which may be used both for land species and typical epiphytes. It has been established that using this method the fertility of orchid's pollinaria can be preserved up to 2 years.