

УДК 635.918[57.085.2+579.6]

**Р. В. Иванников, А. Н. Лаврентьева, Н. С. Иванникова,
И. Л. Белякова, Ю. М. Шурыга**

Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины,
ул. Тимирязевская, 1, Киев, 01014 Украина, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

Коллекция тропических и субтропических растений *in vitro* в НБС им. Н. Н. Гришко НАН Украины

Ключевые слова: коллекция растений *in vitro*, тропикогенная флора, биотехнология, орхидные.

В настоящее время интродукция тропических и субтропических растений в ботанических садах умеренной зоны является одним из способов их сохранения. В НБС имени Н. Н. Гришко НАН Украины собрана большая коллекция тропических и субтропических растений, многие из которых привезены из мест их природного произрастания. Коллекция начала формироваться в послевоенные годы, поэтому возраст некоторых экземпляров достигает уже более 50 лет. В 1999 г. коллекции присвоен статус национального достояния Украины. В связи с этим особое значение приобретает её изучение, сохранение, поддержание и обновление.

Для осуществления этих задач в 1974 г. в отделе была создана лаборатория, которая должна была заниматься разработкой методов массового размножения растений в асептической культуре. К тому времени силами сотрудников отдела уже была собрана значительная коллекция суккулентов, представителей семейства орхидных, ароидных и др. растений, что позволило провести тщательное изучение их биологических особенностей, определить условия искусственного опыления и культивирования в условиях оранжерей. В настоящее время коллекция тропических и субтропических растений насчитывает 3100 видов и разновидностей, представляющих около 150 семейств и свыше 700 родов.

Одной из самых больших по количеству растений является коллекция орхидей, насчитывающая около 450 видов и разновидностей, относящихся более чем к 160 родам. Наличие такого количества растений, позволило отработать методику искусственного опыления орхидных, что сделало возможным получение качественного семенного материала. Значительное количество исследований в первые годы работы лаборатории было направлено на усовершенствование метода семенного размножения орхидных в условиях культуры *in vitro*. В экспериментах использовали как семена, полученные по делектусам, так и семена репродукции ботанического сада. Методика размножения *in vitro* позволяет реализовывать потенциальные возможности орхидных, т. к. даёт возможность прорастить все потенциально жизнеспособные семена. Проведенные нами исследования подтвердили гипотезу касательно того, что семена орхидных вызревают значительно раньше, чем их плоды. В связи с этим метод высева семян из незрелых коробочек (green capsule culture), более предпочтителен и часто используется нами в работе.

В лаборатории с момента её образования проводятся комплексные исследования, направленные на выяснение действия различных компонентов питательных сред на процессы роста и развития сеянцев разных видов орхидных, изучаются особенности их онтогенеза *in vitro*. Полученные результаты привели к разработке состава универсальной питательной среды для проращивания семян тропикогенных видов орхидных, которая в 4–5 раз ускоряет темпы развития сеянцев. За разработку состава этого типа среды

получено авторское свидетельство. Использование прописи данной питательной среды способствовало успешному получению сеянцев более чем 160 видов орхидных, относящихся к 51 роду данного семейства.

За годы существования лаборатории были размножены тропические растения из 20 семейств, относящихся к 89 родам, 228 видам и 28 культиварам. На протяжении последних 10 лет в лаборатории разработаны и модифицированы методы семенного и клонального размножения растений из следующих семейств: *Araceae* Juss., *Orchidaceae* Juss., *Bromeliaceae* Juss., *Cactaceae* Juss., *Proteaceae* Juss., *Nepenthaceae* Dum., и др. Особое внимание уделяется размножению редких и исчезающих видов, занесённых в международную Красную книгу (*Laelia lobata* Lindl., *Cattleya aclandiae* Lindl., *Paphiopedilum delenatii* Guill., *Coelogyne lawrenceana* Lindl., *Angraecum eburneum* Vory и др.) (рис. 1).

Нами установлено, что постсеменное развитие зародыша орхидных протекает необычно, с формированием специфической структуры — протокорма. Разные виды орхидных отличаются формой и размером протокорма. У эпифитов протокорма сферической формы, а у наземных видов они имеют вытянутую форму. Кроме того, было показано, что развитие сеянцев в асептической культуре может проходить двумя основными путями. В первом случае из зародыша формируется первичный протокорм, из которого в дальнейшем формируется один сеянец. Во втором случае на теле первичного протокорма формируются конгломераты вторичных протокормов. Направляя течение онтогенеза по второму пути, можно существенно повысить коэффициент вегетативного размножения орхидных *in vitro*.

Отдельным направлением нашей работы является разработка и усовершенствование методик длительного хранения генетического разнообразия ядерного материала (nuclear genetic diversity — NGD) растений с использованием пыльцы. Консервация пыльцы растений может стать отправной точкой для решения целого ряда как прикладных, так и фундаментальных задач современной биологии и сельского хозяйства. Использование пыльцы, сохранённой методом криоконсервации, позволяет «синхронизировать» цветение и получать нормальное потомство. Этот приём может быть с большой эффективностью использован как в открытом грунте, так и в оранжереях.

Важность длительного сохранения пыльцы сельскохозяйственных растений хорошо обоснована и давно известна [7]. Доступность жизнеспособных мужских гаметофитов может разрешить целый ряд практических проблем стоящих на сегодня перед исследователями:

- возможность воссоздания в искусственных условиях полового процесса у различных представителей цветковых растений, относящихся к категориям редких и исчезающих и получения от них нормального жизнеспособного генетически гетерогенного потомства;
- скрещивание желательных генотипов может позволить получение групп индивидов, имеющих синхронизированное цветение;
- доступность жизнеспособной пыльцы может помочь в размножении редких видов флоры, получении новых гибридов как внутривидовых, так и между представителями различных таксонов;
- можно существенно сэкономить посевные площади и полезную площадь оранжерей;
- отсутствие необходимости выращивания целых популяций растений для получения пыльцы в селекционных целях;
- пыльца обычно подвергается менее строгим карантинным ограничениям, поэтому международное перемещение растительного материала в форме пыльцевых зёрен практически не ограничено [6].

Принципиальная возможность продолжительного сохранения жизнеспособности мужских гаметофитов тропических и субтропических орхидных при температурах ниже 0°C, нами была показана ранее [3]. На возможность использования пыльцы, искусственно сохранённой в условиях пониженной температуры указывают и наши коллеги [1].

Известен и ряд публикаций, где приведены данные касательно криосохранения пыльцы некоторых видов орхидных [8]. Авторы описывают сложную многоэтапную процедуру проводки поллиinarieв через растворы криопротекторов, что затратно и не всегда удобно на практике. Кроме того, известные нам работы касаются пыльцы коммерчески ценных гибридов. С природными видами орхидных работы практически не ведутся. Иметь криогенную установку для создания резервной коллекции пыльцы, семян и меристем сегодня не всегда экономически оправдано. Однако при правильно отработанной процедуре криосохранения мгновенная консервация растительных тканей в жидком азоте является, безусловно, более предпочтительной в сравнении с фиксацией пыльцы с помощью химических соединений [5].



Blechnum gibbum (Labill.) Mett.



Platycerium elephantotis Schweint.



Pteris catoptera Kunz.



Cymbidium dayanum Rchb. f.



Melocactus guaricensis Croizat.



Виды рода *Rhododendron* L.

Рис. 1. Размножение методом *in vitro*.

В связи с вышеизложенным, нами была отработана процедура длительного хранения пыльцы орхидных, совмещающая в себе положительные стороны криотехнологий и относительную простоту и дешевизну техники низкотемпературного хранения поллинариев орхидных.

Применяемая нами процедура замораживания поллинариев в жидком азоте с последующим хранением в морозильной камере и разморозкой не имеет явных негативных последствий в процессе завязывания коробочек и формирования семян исследуемых таксонов орхидных. Однако с увеличением срока хранения, фертильность пыльцевых зёрен уменьшается. Можно предположить, что «качество» поллинариев в цветке может быть различным. Тоже можно допустить и по отношению к разным цветкам одного вида даже если растения выращивали в одинаковых условиях. Всё это, безусловно, сказывается на получаемых результатах и может служить объяснением их относительной неоднородности.

Существуют данные, на основе которых можно утверждать, что температурный фактор влияет на количественные и качественные показатели жизнеспособности мужских гаметофитов семенных растений не только во время оплодотворения, но и в период микроспорогенеза [2, 4]. Показатели температуры, которые выходят за пределы оптимума, резкие её колебания в период созревания пыльцы могут привести к полной или частичной потере фертильности пыльцевых зёрен.

Совершенно закономерным, на наш взгляд, является факт влияния агротехники на параметры жизнеспособности и фертильности пыльцы. Первые работы в этом направлении были опубликованы еще конце позапрошлого века (Б. Лидфордс, 1899) и касались в основном сельскохозяйственных и садовых культур. Из собственного опыта мы знаем насколько важным в результате может оказаться комплекс агротехнических мероприятий при получении нормальных, вызревших семян тропикогенных орхидных *ex situ*. Излишек или недостаток света, влаги, элементов питания может стать причиной неудачного опыления, абортирования плодов в процессе созревания и формирования неполноценных семян. При нарушении условий агротехники сбой в системе репродукции может происходить на разных ее этапах (формирование мужских гаметофитов, прорастание пыльцы, оплодотворение, формирование семян и т. п.).

При проведении этих работ (длительное хранение, опыление, обмен поллинариями) необходимо также учитывать и биологические особенности видов связанные с особенностями их репродуктивной биологии и базирующемся на явлении самонесовместимости. Так, в зависимости от наличия и степени самонесовместимости в условиях интродукции ГБС им. Цицина РАН (г. Москва) нашими коллегами [1] были выделены три группы видов: 1) отсутствие самонесовместимости (*Sobralia*, *Flickingeria*, *Cattleya*, *Epidendrum*, большинства видов из трибы *Vandaeae*, *Cymbidium*, *Lemboglossum*, *Osmoglossum*, виды из подтрибы *Zygopetalinae*, *Peristeria*, *Stanhopea*); 2) наличие строгой самонесовместимости (большинство видов *Coelogyne*, *Bulbophyllum*, *Brassia*, *Rodriguezia*, виды из подтрибы *Maxillariinae*). Эффективность перекрёстного опыления составила от 32 до 100%. 3) частичная самонесовместимость (*Dendrobium* (14 видов из 27 проявляли строгую самонесовместимость, у остальных видов эффективность опыления колебалась от 33 до 100%), *Encyclia*, *Oncidium*, *Miltonia*). Анализ экспериментальных данных показал, что наиболее эффективным способом опыления оранжерейных орхидных является перекрестное опыление: из 478 опыленных цветков 328 — завязали плоды, содержащие жизнеспособные семена, что составило 68,6%. Растения использованные нами в эксперименте, принадлежат к первой группе видов.

За многие годы в лаборатории создана обширная фототека, состоящая из фотографий сотен видов растений и их семян. Итоги многолетних наблюдения за растениями в оранжереях и *in vitro* позволяют нам сделать вывод о том, что основой любой биотехнологии является тщательное изучение биологических особенностей каждого размножаемого

растения. При проведении исследований по клональному микроразмножению растений, относящихся к различным таксономическим группам, были выделены факторы, определяющие те или иные морфологические процессы *in vitro*. По нашему мнению, в качестве таких основополагающих причин могут рассматриваться: генотип и физиологическое состояние материнского растения, время и место отбора первичного экспланта, условия культивирования, а также состав питательной среды. Как показывает наш опыт, способность к размножению *in vitro* была различной у растений разных семейств, видов и даже сортов. Травянистые растения (к примеру, *Musa nana* Lour.) размножать проще, древесные (*Rhododendron* L.) — сложнее. Основными методами, используемыми нами, были: активация пазушных меристем, индукция образования адвентивных побегов, индукция образования каллуса и эмбриоидов, соматический эмбриогенез.

Очень важным фактором является выбор экспланта. Здесь нужно учитывать следующее: состояние растения, от которого берется эксплант; орган, служащий источником ткани и его возраст; фазу развития растения и размер экспланта.

Большое значение имеет время года, в которое вычлняется эксплант, так как в основе сезонных колебаний регенерационной способности растений лежат изменения их физиолого-биохимического состояния. Наши исследования показали, что лучший рост протокормов и образование растений происходит весной. На выживаемость экспланта влияет и его размер. В целях массового размножения растений используют экспланты размером 0,5–1 см. Для освобождения от вирусной инфекции вычлняют эксплантаты от 0,1 до 0,5 мм. Однако для полной уверенности в отсутствии вирусов необходимо тестирование.

В отделе также собрана большая коллекция представителей семейства *Araceae* Juss., насчитывающая 264 таксона относящихся к 33 родам. Интродукционная оценка этой коллекции даёт основание считать эти растения перспективными для озеленения разных типов интерьеров. Для этих целей нами были размножены растения из таких родов как: *Aglonema* Schott., *Alocasia* G. Don., *Anthurium* L., *Caladium* Vent., *Dieffenbachia* Schott., *Monstera* Schott., *Philodendron* Schott., *Spathiphyllum* Schott.

Суммируя полученные результаты, следует подчеркнуть, что скорость микроразмножения, интенсивность образования каллуса и его морфогенный потенциал зависели от генотипа, возраста и фазы развития растений доноров, фитогормонального баланса в тканях экспланта, условий культивирования (физические параметры).

С помощью метода активации пазушных меристем с последующей регенерацией побегов были размножены растения таких семейств: *Araucariaceae* Henkel et W. Hochstel., *Bromeliaceae* Juss., *Dracaenaceae* Salisb., *Ericaceae* Juss., *Moraceae* Link., *Proteaceae* Juss., *Theaceae* D. Don.

У растений семейства *Begoniaceae*, *Dracaenaceae* использовали индуцированный калусогенез. Для микроразмножения растений из семейств *Cactaceae*, *Bromeliaceae*, *Nepenthaceae*, *Ericaceae*, *Theaceae*, *Dracaceae* использовали различные части семян, полученные из семян в условиях асептической культуры. При размножении представителей *Musaceae* в качестве первичных эксплантов использовали меристематическую ткань центрального побега и почек, расположенных на подземном корневище. На первых этапах размножения они формировали эмбриоиды, а затем и побеги. Такая же способность к регенерации отмечена и у полученных *in vitro* семян *Camellia japonica* (*Theaceae*). Представители споровых (*Polypodiophyta*) традиционно размножали спорами. Всего было размножено 22 вида, относящихся к 10 родам.

Перенос полученных *in vitro* ювенильных растений в септические условия — весьма болезненный процесс для представителей многих видов. Большинство тропикогенных растений хорошо переносят период адаптации при высадке их в сфагновый мох, а затем и пересадку в легкие питательные землесмеси. В то же время некоторые виды, представители которых являются ярко выраженными эпифитами, необходимо высаживать сразу на блоки.

Таким образом, в результате разработки процедур асептического размножения тропических и субтропических растений коллекции НБС НАНУ нами был создан банк стерильных культур тропикогенных растений *in vitro*, основную часть которого составляют представители семейства орхидных. В настоящее время ведутся работы по оптимизации условий содержания данного собрания живых растений с целью уменьшения затрат на содержание и повышения рентабельности процесса. Показано, что растения, полученные при размножении *in vitro* сохраняют все отличительные особенности, характерные для вида, морфологически выровнены и имеют высокий коэффициент размножения при культивировании в септических условиях. Предложенный нами метод длительного хранения пыльцы орхидных, можно рассматривать как эффективное (и простое в методическом отношении) дополнение к криогенным технологиям. Среди прочих преимуществ метода, кроме уже упомянутой низкой себестоимости и простоты можно подчеркнуть тот факт, что подобные банки могут быть размещены на относительно небольших площадях.

Работа выполнена в рамках научно-тематического плана отдела тропических и субтропических растений НБС им. Н. Н. Гришко НАН Украины «Теоретические и практические аспекты комплексной охраны фитогеофонда тропических и субтропических растений в Украине» (2008–2012 гг.).

Литература

1. Антипина В. А. Особенности формирования банка вегетативных и генеративных диаспор орхидных для длительного хранения. Автореф. дис. ... канд. биол. Наук. — М., 2009. — 19 с.
2. Голубинский И. Н. Биология прорастания пыльцы. — Киев: Наук. думка, 1974. — 367 с.
3. Іванніков Р. В. Длительное хранение полиниев орхидных при низких отрицательных температурах. // Матеріали міжнар. наук. конф. «Збереження біорізноманіття тропічних і субтропічних рослин». 10–13 березня, Київ. — К., 2009. — С. 151–155.
4. Abdalla A. A., Vekerk K. Growth, flowering and fruit-set of the tomato at high temperature // Netherl.J. Agric. Sci. — 1968 — 16, 1. — P. 31.
5. Cresti M., Lancelle S. A., Heler P. K. Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of *Nicotiana* and *Impatiens* // J. of Cell Science. — 88. — 1987. — P. 373 — 378
6. Hoekstra F. A. Collecting pollen for genetic resource conservation in *Collecting Plant Genetic Diversity*. CAB International. — Wallingford, U.K., 1995. — P. 527–550.
7. Plant Cryopreservation: A Practical Guide / Ed. B. M. Reed. — Berlin: Springer, 2008. — 465 p.
8. Wagner A. Vendrame Pollination of *Dendrobium* Hybrids Using Cryopreserved Pollen // Hort Science. — 43(1). — 2008. — P. 264–267.

Іванніков Р. В., Лаврентьєва А. М., Іваннікова Н. С., Беякова І. Л., Шурига Ю. М.

Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України,
вул. Тімірязівська, м. Київ, 01014, Україна, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

Колекція тропічних та субтропічних рослин *in vitro* в НБС ім. М. М. Гришка НАН України

В статті висвітлено роботу лабораторії насінного та клоного мікророзмноження рослин, яка функціонує в НБС ім. М. М. Гришка НАН України з 1974 р. Проаналізовано та систематизовано головні напрямки досліджень даного підрозділу, вказано основні особливості рослин, які були розмножені в умовах культури *in vitro*.

Ключові слова: колекція рослин *in vitro*; тропікогенна флора; біотехнологія; орхідні

R. Ivannikov, A. Lavrentyeva, N. Ivannikova, I. Belyakova, J. Shuriga

N. N. Grishko National Botanical Garden of a National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 01014 Kyiv, st. Timirjazevska, 1, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

Collection of tropical and subtropical plants *in vitro* in N. N. Grishko National Botanical Garden of National Academy of Sciences of Ukraine

In the article the works of seed and plants clonal micropropagation laboratory operating in N. N. Grishko National botanic garden of NAS of Ukraine since 1974 have been presented. Main research areas of the given department were analyzed and systematized, and basic features of plants propagated *in vitro* were indicated.

Keywords: collection of plants *in vitro*; tropicogenic flora; biotechnology; orchids.