

УДК 582.594.2:581.143.6

## ОСОБЛИВОСТІ ПОЧАТКОВИХ ЕТАПІВ ОНТОГЕНЕЗУ ПРИ НАСІННЕВОМУ РОЗМНОЖЕННІ СУБТРОПІЧНОЇ НАЗЕМНОЇ ОРХІДЕЇ *BLETILLA STRIATA* L.

*ПОПКОВА Л.Л.* - к.б.н., доцент, Національний університет біоресурсів і природокористування України південний філіал «Кримський агротехнологічний університет»

*ТЕПЛИЦЬКА Л.М.* - к.б.н., доцент

*АСТАПЕНКО Н.А.*, Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського

**Постановка проблеми.** Багато тропічних і субтропічних орхідей надзвичайно декоративні і становлять інтерес як цінні квіткові культури та рідкісні види. Для збереження генофонду представників родини Orchidaceae Juss особливе значення набуває розробка способів культивування того чи іншого виду, що дає можливість зберегти вид від знищення у природі.

В даний час є досить великий досвід вирощування тропічних і субтропічних орхідей, що знайшло відображення в роботах В.А. Піддубної-Арнольдї та В.А. Селезньової, Т.М. Черевченко, Є.Г. Назарова [7,8,5]. Однак, детально метод масового розмноження, зокрема в умовах *in vitro*, розроблено лише для 30 видів промислових красивоквітучих тропічних видів орхідей з родів *Cymbidium* Sw., *Dendrobium* Sw., *Phalaenopsis* Bl., *Vanda* Jones, *Cattleya* Ldl [8]. Тому досить актуальним представляється підбір методів прискореного розмноження для інших видів красивоквітучих тропічних і субтропічних орхідей, а також вивчення їх онтогенезу в культурі для відбору повноцінного посадкового матеріалу. У зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення особливостей початкових етапів онтогенезу при насінневому розмноженні в лабораторних умовах наземної субтропічної орхідеї *Bletilla striata* L.

**Матеріали і методи досліджень.** Матеріалом для проведення досліджень було насіння з коробочок генеративних особин субтропічної наземної орхідеї *Bletilla striata*. Даний вид в умовах південного берегу Криму росте влітку та взимку у відкритому ґрунті на куртині з декоративними квітковими багаторічниками в арборетумі НБС-ННЦ.

Для пророщування в лабораторних умовах і введення в умови *in vitro* використовували насіння з нерозчинених коробочок, взятих з рослин через 2,5-3,5 місяця після запилення. Стерилізацію матеріалу (коробочок з насінням) проводили 70%-ним етанолом або 5%-ним розчином перекису водню. Після кожного реагенту коробочки промивали дистильованою водою, в стерильних умовах коробочки розкривали [4]. Насіння поміщали на агарізовані живильні середовища, використовуючи загальноприйняті в біотехнології методи, а також на ватномарлеві вологі субстрати. Лабораторний посуд з насінням перебував в фітолюміністаті ФСЛ В за температурою 20-250 С, штучною освітленістю 1-3 клк з 16-годинним фотоперіодом. Спостереження за станом насіння, формуванням протокормів і проростків, здійснювали кожні 5-7 діб.

Відсоток проростання насіння вираховували за формулою:  $\% = n / N \times 100$ , де *n* - кількість пророслого насіння, *N* - загальна кількість насіння в лабора-

торному посуді.

Визначення цитоморфологічних параметрів проводили за загальноприйнятою методикою [6]. Цитологічні препарати фарбували ацетокарміном та розчином Люголю. Мікроскопічні дослідження проводили на мікроскопі БІОЛАМ-70 і за допомогою біокуляру МБС-1А.

**Результати досліджень.** Блетіла смугаста (*B. striata*) протягом 35-40 діб з моменту запилення утворює плід - коробочку подовженої форми близько 3,5-4,0 см, яка при дозріванні набуває жовтувате забарвлення і розкривається шістьма поздовжніми тріщинами. Наявність великої кількості насіння в плоді (до 3-6 млн) є характерною особливістю орхідних. Однак, часто насіннєве відтворення слабе і навіть в природних умовах проростає всього 5% насіння орхідей [8].

Відомо, що коробочки орхідних дозрівають значно довше, ніж насіння. Розкриття коробочки природним шляхом відбувається через 8-12 місяців, у той час як насіння може бути здатним до проростання вже через 4-6 місяців. Для багатьох орхідних характерно інтенсивне проростання недостиглого насіння, яке ще не перейшло в стадію фізіологічного спокою.

Оскільки стадія розвитку насіння є вирішальним фактором для успішного пророщування, нами використовувалися насіння з нерозчинених недозрілих коробочок, відібраних в різні терміни. Стадію насіння, коли вже можливо поодинокі проростання, оцінювали за кількістю діб з моменту запилення. При цьому було встановлено, що насіння *B. striata* починають проростати на 80 добу з моменту запилення. Максимальне проростання спостерігалось через 100 і 120 діб, яке починалося з 5 діб культивування (3-5%), а потім впродовж 40-45 діб зростало до 85%-90%. Після 150 діб проростання насіння знижувалося (до 40-60%) і спостерігалось на рівні 40% через 350 діб з моменту запилення (табл. 1). Проростання насіння близько 20-40% відзначалося також і через 1,5-2,0 роки зберігання.

**Таблиця 1 - Вплив ступеню стиглості на проростання насіння *B. striata* ( % від загальної кількості)**

| Строк після запилення, діб | Строк культивування насіння, діб |    |    |    |    |    |
|----------------------------|----------------------------------|----|----|----|----|----|
|                            | 5                                | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 80                         | 0                                | 0  | 1  | 2  | 5  | 10 |
| 90                         | 0                                | 5  | 20 | 30 | 45 | 55 |
| 100                        | 3                                | 15 | 40 | 65 | 75 | 85 |
| 120                        | 5                                | 15 | 45 | 65 | 80 | 90 |
| 150                        | 1                                | 5  | 25 | 40 | 50 | 60 |
| 350                        | 0                                | 0  | 1  | 5  | 15 | 40 |

Насіння *B. striata* мають сітчасту прозору насіннєву оболонку (тесту), під якою чітко проглядається світло-коричневий зародок веретеноподібної форми (рис. 1). Цитологічні дослідження дозволили встановити, що зародок гістологічно чітко диференційований на зони: дрібноклітинну (апикальну) та великоклітинну (базальну).

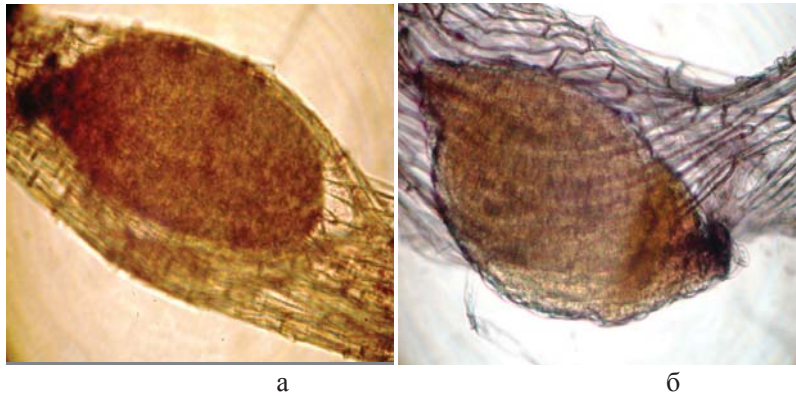


Рис. 1. Стигле насіння (а) та вихід зародку з тести в проростаючому насінні (б).

Існує точка зору про зональність, притаманною зародку орхідних, яка виділяється на основі відмінностей в розмірах клітин або ультраструктурної організації [3]. Зональність встановлюється на ранній стадії розвитку внаслідок того, що тенденція до поділу зберігається лише в клітинах ембріодерми і клітинах апікальної частини зародка. Решта клітини зародка втрачають здатність ділитися і значно збільшуються в розмірах, перетворюючись в паренхімні клітини. Співвідношення розмірів зон зародка (дрібноклітинній і великоклітинній) варіює в залежності від виду рослини. У період активного росту зародка дрібноклітинна зона становить  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{1}{3}$  частину обсягу зародка, її клітини активно діляться. У міру дозрівання насіння поділ в апікальній частини зародка припиняються. У одних видів зональність на стадії зрілого зародка зберігається, в інших зональність виражена слабо або відсутня [1,2].

У процесі проведених цитологічних досліджень виявлено, що у *V. striata* зональність зберігається на стадії зрілого зародка, і становить приблизно 1:1. Гістологічна диференціація зародку зрілого насіння блетіли, виражається у відокремленні трьох типів тканин - покривної, паренхімної та меристематичної, елементи провідної системи відсутні. Клітини меристематичної зони мають невеликі розміри, чіткі контури, щільно прилягають друг до другу. Ядро велике, добре фарбується ацетокарміном і спостерігається в мікроскопі. Клітини паренхімної зони великі з відносно дрібним, зі слабо профарбованим ядром, розміщені повільно. Особливістю покривних клітин є наявність чітких контурів, ядро при фарбуванні не визначалося.

В наших експериментах проростання насіння *V. striata* спостерігалось вже на 10-20 добу після приміщення на живильне середовище. Причому проростання насіння відбувалося успішно як в зимові місяці, коли рослини в природних умовах знаходяться в стадії спокою, так і ранньою весною. Даний факт є особливою відзначністю та свідчить про відсутність глибокого спокою у насіння даного виду.

В процесі проростання насіння на живильному середовищі всі клітини зародка набухають, що призводить до розриву тести (насінної оболонки). Формується одиночний злегка веретеноподібний радіально-симетричний автономно фотосинтезуючий протокорм зеленого кольору. Особливістю даного виду є швидке формування протокорму протягом 5-25 діб з моменту проростання. В подаль-

шому на апікальній частині протокоорму з'являється горбок, що свідчить про початок диференціювання апексу пагону, а в базальній частині формуються волоски-ризоди (рис. 2.).

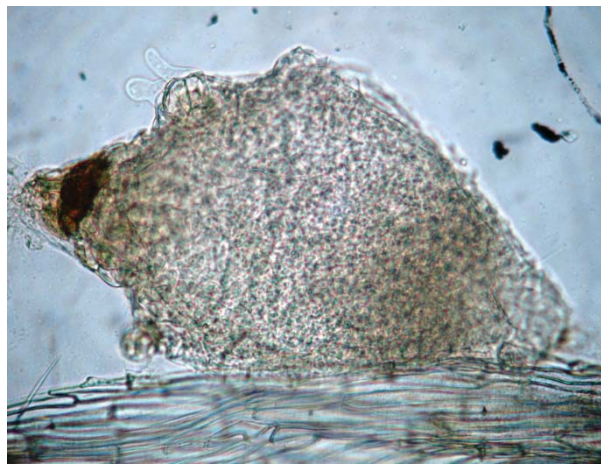


Рис. 2. Початок диференціювання протокоорму *V. striata*

Як тільки завершується диференціювання апексу пагону і з'являються зачатки листків протокоорм переходить в стадію проростка. Надалі формується злегка округлий туберидій і з'являється перший корінець, розвиток проростків триває від 60 до 120 діб. Формування більшості молодих рослин-сіянців з двома парами листя і двома-трьома корінцями закінчується через 150-200 діб. Молоді рослини з листям і корінцями розміром не менше 3-4 см готові для посадки в ґрунтовий субстрат.

Істотну роль на проростання насіння і формування проростків та сіянців надає склад поживних середовищ. Для посіву насіння нами використовувалися поживні середовища розрізняються складом і формами мікро-і макроелементів: Кнудсона, Мурасіге і Скуга і модифікації цих середовищ додаванням гумату Na, активованого вугілля і пептону. Додавання до живильного середовища активованого вугілля сприяє затемненню середовища, кращому росту і позитивного геотропізм коренів. Завдяки адсорбуючій здатності вугілля в середовищі не накопичуються продукти метаболізму. Реакція середовища в процесі тривалого вирощування сіянців не змінюється.

При використанні середовища Мурасіге і Скуга проростання починалося через 50-60 діб після висіву насіння, формування рослин спостерігалось протягом 120-180 діб, сіянці були готові до пересадки в субстрат через 365 діб. Використання середовища Кнудсона С показало, що протягом 40 діб більшість насіння проростало, через 130 діб були сформовані рослини-сіянці, які переносили в субстрат через 10 місяців після висіву насіння. На модифікованому середовищі Кнудсона (з додаванням гумату натрію і активованого вугілля) насіння проростали в 1,5-2 рази швидше, а також прискорювалося зростання сіянців (табл. 2). Додавання гумату натрію, активованого вугілля або пептону до стандартного середовища Кнудсона позитивно впливає на ріст та розвиток вегетативних органів. Оптимальним варіантом середовища була модифікація, де поєднання пепто-

ну, гумату натрію та активованого вугілля призводить до інтенсивного наростання вегетативних органів, зокрема, збільшується висота сіянців, довжина коренів і загальна маса рослин.

**Таблиця 2 - Вплив складу живильного середовища на проростання насіння та формування проростків і сіянців**

| Варіанти живильних середовищ | Строк періодів проростання насіння та формування рослин (дів) |                       |                    |
|------------------------------|---|-----------------------|--------------------|
|                              | початок проростання та формування протокормів                 | формування проростків | формування сіянців |
| М-С – I                      | 50-60   | 68-96                 | 180                |
| М-С – II                     | 50-56   | 65-90                 | 150                |
| Кнудсона С                   | 35-40   | 45-60                 | 130                |
| Кнудсона модифікована        | 20-25   | 30-45                 | 120                |

Висота сіянців вирощених на модифікованому середовищі Кнудсона за 10 місяців склала максимально 8,5 см, довжина коренів була 6,1 см, а маса 10 рослин складала 14,5 г. У присутності пептону і фізіологічно активних речовин гумусовий природи рослини енергійніше використовують елементи мінерального живлення, в результаті чого інтенсивніше розвивається вегетативна маса, активується коренеутворення, прискорюється процес розвитку проростків.

**Висновки.** Таким чином, в результаті проведених досліджень початкових етапів онтогенезу при насінневному розмноженні субтропічної наземної орхідеї *Bletilla striata* були виявлені особливості проростання насіння і ранніх етапів морфогенезу протокормів, підібрані склади живильних середовищ для їх для успішного культивування, формування проростків і молодих рослин. Оскільки насіння даного виду не має глибокого спокою, його пророщування з однаковою інтенсивністю можливо протягом усього вегетаційного сезону, а оптимальні умови культивування забезпечують отримання достатнього матеріалу для масового розмноження.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Андропова Е.В. Эмбриогенез и постсеменное развитие орхидей на примере *Dactylorhiza baltica*, *D. incarnata*, *Thunia marshalliana*, *Bletilla striata*: Автореф. дис. ...канд.биол.наук.- Л., 1988.- 24 с.
2. Батыгина Т.Б., Шевцова Г.Г. Метаморфоз в онтогенезе орхидных (*Cymbidium hybridum*, *Orchidaceae*) // Ботан. журн. – 1985. - № 70 (12). – с. 1614 – 1621.
3. Жукова Г.Я., Савина Г.И. Электронномикроскопическое исследование зародыша *Epiractis atrogubens* (Hoffm.) Schult. (*Orchidaceae*) на ранних фазах его развития // Ботан. журн. – 1978. - №9. – с. 1241 – 1246.
4. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
5. Назаров Е. Г. Орхидеи. -М.: Колос, 1983. -127 с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
7. Поддубная-Арнольди В.А., Селезнева В.А. Орхидеи и их культура. – М.: изд-во АН СССР, 1957. – 174 с.
8. Черевченко Т. М. Тропические и субтропические орхидеи в культуре. -Киев: Наукова думка, 1993. -254 с.