

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД  
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ  
И БИОТЕХНОЛОГИИ  
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов  
III Международной научной конференции  
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии  
и биотехнологии растений*

Минск  
«Издательский центр БГУ»  
2008

УДК 581:576.3(043.2)  
ББК 28.55  
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;  
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;  
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,  
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

**Теоретические** и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.  
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)  
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад  
НАН Беларуси, 2008

УДК 582.594.2(476): 581.143.6

## КУЛЬТУРА *IN VITRO* ОРХИДНЫХ УМЕРЕННОГО КЛИМАТА В ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

**Козлова О.Н.**

Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» г. Минск, 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: kozlova\_o@yahoo.com.

---

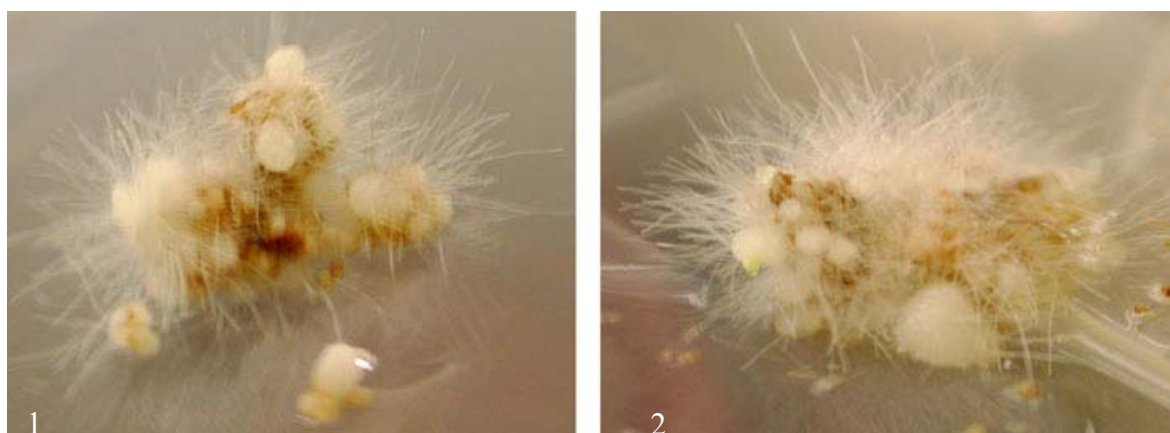
*Проведены эксперименты по введению в культуру *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo, *Epipactis helleborine* (L.) Cr., *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich, *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo. Определены оптимальные составы питательных сред для проращивания семян *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich (Fast, BM) и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo (MS, BM). Установлено, что холодовая стратификация (+4°C) в течении трех месяцев не оказывала влияния на всхожесть семян исследуемых видов.*

Проблема сохранения орхидных умеренных широт в настоящее время является актуальной. Это связано с сокращением естественного ареала многих видов в связи с хозяйственной деятельностью человека. В настоящее время среди представителей семейства *Orchidaceae* Juss. наблюдается наибольшее количество редких, исчезающих и охраняемых видов, в том числе орхидных из зоны умеренного климата. Из 33 видов, произрастающих на территории Республики Беларусь, 21 вид занесен в Красную Книгу [1]. Одним из возможных путей сохранения орхидных является их искусственное размножение в культуре *in vitro* с последующим возвращением в естественную среду обитания (посадка растений в малочисленные популяции и реинтродукция в местообитания, из которых они исчезли), а так же использование в практике цветоводства, как высокодекоративных растений [2]. Разработка асимбиотических методов посева позволит не только получить надежный способ сохранения и приумножения этих орхидей, но и решить теоретические вопросы биологических механизмов их прорастания.

Для введения в культуру мы использовали незрелые семена (метод «зеленых коробочек») следующих видов: *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo, *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo, *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich, *Epipactis helleborine* (L.) Cr. Зеленые плоды орхидных стерилизовали обжигом в 96% спирте в пламени спиртовки с предварительной обработкой в течении 30 минут в 10% растворе гипохлорита кальция. Семена высевали на поверхность плотной агаризованной среды в чашки Петри. Для посева *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo и *Epipactis helleborine* (L.) Cr. в качестве основной среды исполь-

зовалась среда MS [3]. При введении в культуру *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo использовались четыре варианта питательных сред: MS, Fast [4], BM [5], Harvais [6]. Первую неделю все посеы инкубировались в темноте при комнатной температуре для выявления грибной и бактериальной инфекции. Для определения влияния холодной стратификации на прорастание семян половину посевов поставили на инкубацию в темноте при +4°C в течение трех месяцев. Контрольные посеы оставлены при комнатной температуре.

**Результаты и обсуждение.** Спустя месяц после стратификации семена *Cypripedium calceolus* L. и *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo проросли с образованием мелких бесцветных протокормов. У *Epipactis helleborine* (L.) Cr. часть семян набухла, но прорастания так и не произошло. В последующие двенадцать месяцев протокормы *Cypripedium calceolus* L. и *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo разрастались и образовывали большое количество всасывающих волосков (рис. 1). В процессе культивирования часть протокормов побурела и некротизировала.



**Рис. 1.** Образование протокормов у *Cypripedium calceolus* L. (1) и *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (2) спустя двенадцать месяцев после посева

После того, как в апикальной части протокорма начинал развиваться побег, их разделяли и пикировали в колбы на среду MS. В течение последующих одиннадцати месяцев из апикальной почки протокорма развивался побег, а из основания побега - настоящие корни (рис. 2 а и б).

Одной из проблем выращивания ряда орхидных умеренной зоны *in vitro* является выделение сеянцами фенольных экссудатов в питательную среду при культивировании на свету [7]. Для предотвращения негативного влияния этих веществ на рост и развитие орхидных в культуре в среды для культивирования добавляли активированный уголь в количестве 1г/л.

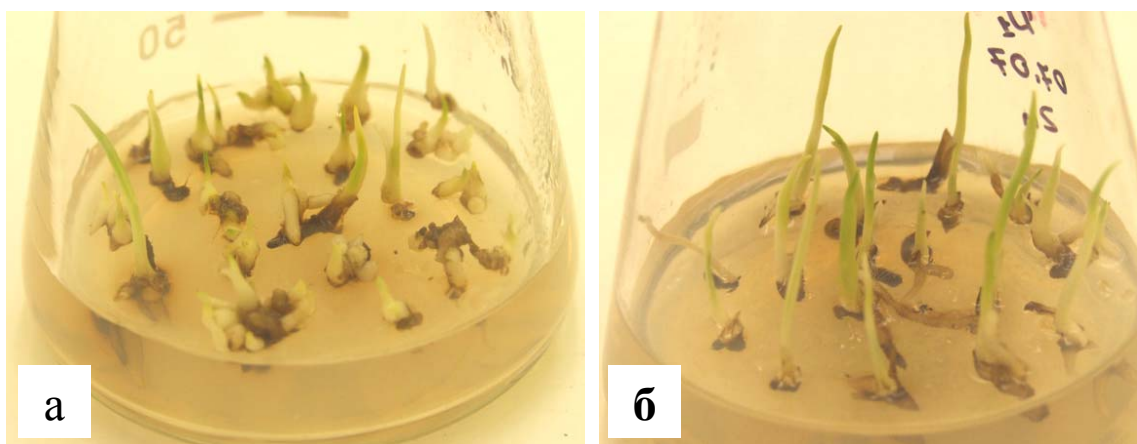


Рис. 2. Побеги *Cypripedium calceolus* L. (а) и *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (б) на среде MS

В экспериментах по введению в культуру *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo предполагалось оценить влияние состава питательной среды и холодной стратификации на прорастание семян. В течение трех месяцев культивирования при комнатной температуре происходило последовательное развитие протокормов обоих видов независимо от предварительной холодной обработки (рис. 3). Это, вероятно, связано с тем, что при введении в культуру использовались незрелые семена. Холодовая стратификация посевов чаще используется в отношении зрелых семян с целью выведения их из состояния покоя [2]. В нашем случае, как показали полученные данные, использование этого метода не явилось необходимым условием прорастания семян исследуемых видов.

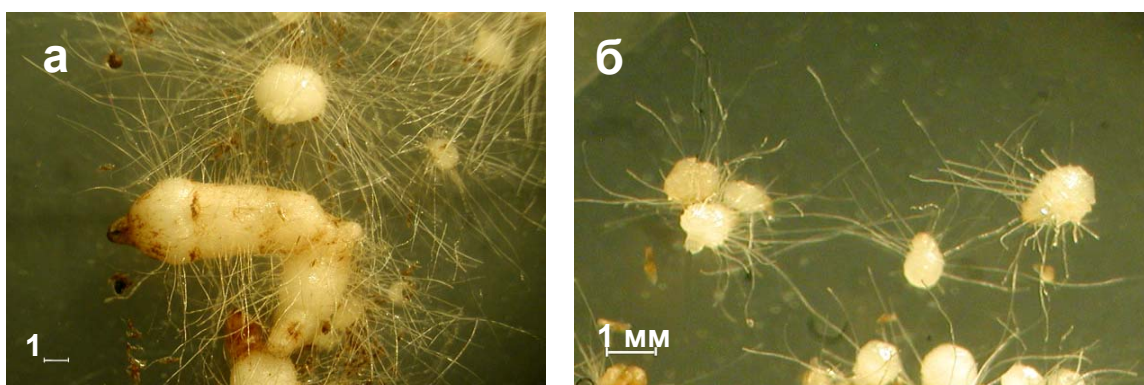


Рис. 3. Протокормы *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich (а) и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo (б) после трех месяцев культивирования

Влияние на прорастание семян *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo оказал состав питательных сред. Так для *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo наиболее оптимальными оказались среды

MS и BM. На средах Fast и Harvais прорастания семян не происходило (таблица). Оптимальными средами для проращивания семян *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich стали BM и Fast. Полученные данные частично согласуются с результатами Широкова с соавт. (2005), которые для проращивания семян *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich и *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo рекомендуют среды BM и Fast.

**Таблица**

Влияние состава среды и холодной стратификации на всхожесть семян *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo и *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich (в % от общего количества семян).

Вариант среды	<i>Dactylorhiza fuchsii</i> (Druce) Soo		<i>Platanthera bifolia</i> (L.) L. C. Rich	
	Без стратификации	Со стратификацией	Без стратификации	Со стратификацией
MS	46±2,9	39±5,9	0	0
BM	43±6,6	44±8,3	7±1,2	10±3,4
Fast	0	0	5±3	6±3
Harvais	0	0	0	0

Автор выражает благодарность н.с. А.В. Зубареву за помощь в фотодокументировании результатов экспериментов.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ Б07М-216 «Разработка методики введения в культуру представителей семейства Orchidaceae Juss. умеренного климата и наблюдение за их развитием в культуре in vitro».

#### Литература

1. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редколлегия: Л.И. Хоружик (предс.), Л.М. Сушня, В.И. Парфенов и др. – Минск: 2005. – с 456.
2. Культивирование орхидей европейской России / А.И. Широков [и др.]; под общ. ред. А.И. Широкова. - Н.Новгород: 2005. - с 64.
3. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige [et al]. // *Physiol. Plant.* – 1962. - Vol.15. - P.473-497
4. Fast, G. Möglichkeiten zur Massenvermehrung von *Cypripedium calceolus* und anderen europäischen Wildorchideen / G. Fast // 8th World Orchid Conf., Frankfurt, 1975. / *Proc. 8th World Orchid Conf.* – Frankfurt, 1975. – P. 359-363
5. Van Waes, J.M. In vitro germination of some Western European orchids / J.M. Van Waes, P.C. Deberg. // *Physiol. Plant.* – 1986. – Vol. 67. – P. 253-261.
6. Harvais, G. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in culture / G. Harvais. // *Canad. J. Bot.* – 1973. – Vol. 51, № 2. – P. 359-363.
7. Malmgren, S. Orchid propagation: theory and practice / S.Malmgren // North American native terrestrial orchids “propagation and productin”: conference proceedings, Washington, 16-17 March 1996. / DC, USA; etditor: C.Allen. – Washington, 1996. – P. 63-71.

### Summary

*In vitro* germination experiments with immature seeds of *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo, *Epipactis helleborine* (L.) Cr., *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich and *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo were conducted. Optimal composition of nutrient media for seed germination of *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich (Fast, BM) and *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo (MS, BM) was defined. Cold treatment (+4°C) during three month didn't increase percentage of germinated seeds.