

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 22 (61). 2009. № 2. С. 3-8.

УДК 581.193.582.594

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОПТИМИЗАЦИЮ ПРОЦЕССА ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *CEPHALANTHERA DAMOSONIUM* (MILL.) DRUCE (ORCHIDACEAE)

Астапенко Н.А.

Представлены результаты исследований по влиянию факторов оптимизации питательной среды на процессы прорастания семян *Cephalanthera damosonium*. Установлена зависимость скорости прорастания семян от концентрации сахарозы в среде. Показана необходимость детального изучения динамики накопления запасных метаболитов семени для повышения эффективности семенного асимбиотического размножения.

**Ключевые слова:** *Cephalanthera damosonium*, питательная среда, семенное асимбиотическое размножение.

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с проблемой сокращения видового разнообразия актуален вопрос семенного асимбиотического размножения орхидных. В настоящее время накоплен достаточно большой опыт выращивания тропических и субтропических орхидей [1 – 3]. Однако остаются нерешенными проблемы культивирования ряда орхидных умеренной зоны. Успешное культивирование семян орхидных в условиях *in vitro* во многом зависит от сбалансированного состава питательной среды, содержащей макро и микроэлементы, углеводы, витамины и регуляторы роста в нужном количестве. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния факторов питательной среды на оптимизацию процесса прорастания семян *Cephalanthera damosonium* (Mill.) Druce.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследований служили семена из зрелых плодов *Cephalanthera damosonium* (Mill.) Druce. В работе применяли общепринятые методы культуры изолированных тканей и органов растений [4]. В качестве стерилизующего агента использовали 3 % перекись водорода, выдерживая в ней семена в течение 3 суток перед посадкой. После обработки семена промывали стерильной дистиллированной водой [5].

В исследованиях использовали три варианта среды Кнудсона [2] и модификацию среды FN [6] (табл. 1). Модифицированные среды Кнудсона содержали гумат натрия (50 мг/л), активированный уголь (1 г/л) и различались по концентрации сахарозы (Кнудсон С – 20 г/л, Кнудсон С-1 – 10 г/л, Кнудсон С-2 – 50 г/л). Культивирование семян проводили в культуральных сосудах в термостате с температурой +20 – +25°C, а затем в фитолюминистате ФСЛ-В с освещением 1-3 тыс. люкс при температуре +20 – +25 °С с фотопериодом 16 часов. Чтобы оценить влияние исследуемых факторов оптимизации питательной среды на скорость прорастания семян, каждые сутки, начиная с первых суток культивирования, семена отбирали для приготовления временных препаратов. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по общепринятым методам [7].

**Таблица 1.**  
**Компоненты используемых вариантов питательных сред**

Компонент среды	Питательная среда			
	Кнудсон С	Кнудсон С-1	Кнудсон С-2	FN – мод.
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1000 мг/л			44 мг/л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 мг/л			–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 мг/л			20 мг/л
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250 мг/л			20 мг/л
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8 мг/л			14 мг/л
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	7,5 мг/л			–
Гумат натрия	–	50 мг/л		–
Активированный уголь	–	1000 мг/л		
Сахароза	20000 мг/л	10000 мг/л	50000 мг/л	10000 мг/л
Агар	8000 мг/л			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	–			40 мг/л
KCl	–			20 мг/л
Трилон «Б»	–			19 мг/л
Гидролизат казеина	–			700 мг/л
Сухой дрожжевой экстракт	–			800 мг/л

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Согласно литературным источникам, успех культивирования семян орхидных зависит не только от состава питательных сред и условий культивирования, но и от стадии развития зародыша [1, 8, 9]. Формирование в семенах большинства орхидных недифференцированных на органы зародышей и подавление развития эндосперма обуславливает накопление основного количества запасных питательных веществ непосредственно в тканях самого зародыша. Проведенные гистохимические исследования позволили установить определенные закономерности накопления крахмала и липидов на отдельных этапах эмбриогенеза и постсеменного развития некоторых видов орхидей [10].

Так, на ранних этапах формирования семени основным метаболитом является крахмал, тогда как в полностью созревших семенах преобладают вещества липидной природы [10, 11]. Экспериментальные данные показывают, что запасной крахмал служит резервом субстратов и энергии для биосинтеза липидов. Ряд авторов [1, 5, 8, 9] в своих работах отмечают, что в период зрелости плода-коробочки семена уже находятся в состоянии глубокого покоя и поэтому не прорастают в течение длительного времени. При этом семена, взятые из зеленых коробочек, прорастают намного быстрее. Следовательно, липиды являются основным веществом периода покоя семян. В процессе прорастания наблюдается обратная динамика: уменьшение количества липидов и увеличение крахмальных зерен.

Если допустить, что для преодоления состояния покоя семян необходимо восстановить соотношение крахмал – липиды в пользу крахмала, то нужно подобрать оптимальную концентрацию внешнего источника углеводов. Углеводы в составе питательной среды выполняют две функции – являются источником энергии и строительным материалом для процессов жизнедеятельности зародышей в культуре, и, кроме того, обеспечивают необходимые осмотические свойства среды. Проведенные многими авторами исследования по изучению влияния сахаров на зародыши показали, что лучшим источником углерода для зародышей является сахароза [12]. В литературе также имеются данные о различном влиянии сахаров на зародыши в зависимости от их концентрации, в связи с чем основной акцент модификаций используемых нами питательных сред заключался в различном содержании сахарозы: Кнудсон С-1 и модифицированная среда FN – 10 г/л; Кнудсон С – 20 г/л; Кнудсон С-2 – 50 г/л.

В процессе культивирования семян на питательной среде можно выделить следующие этапы прорастания: набухание семян, начало протокормообразования, массовое протокормообразование и появление ювенильных растений. Полученные в результате эксперимента данные показывают, что концентрация сахарозы в питательной среде оказывает существенное влияние на скорость прорастания семян, то есть на время наступления определенного этапа прорастания и его протяженность (рис. 1; табл. 2).

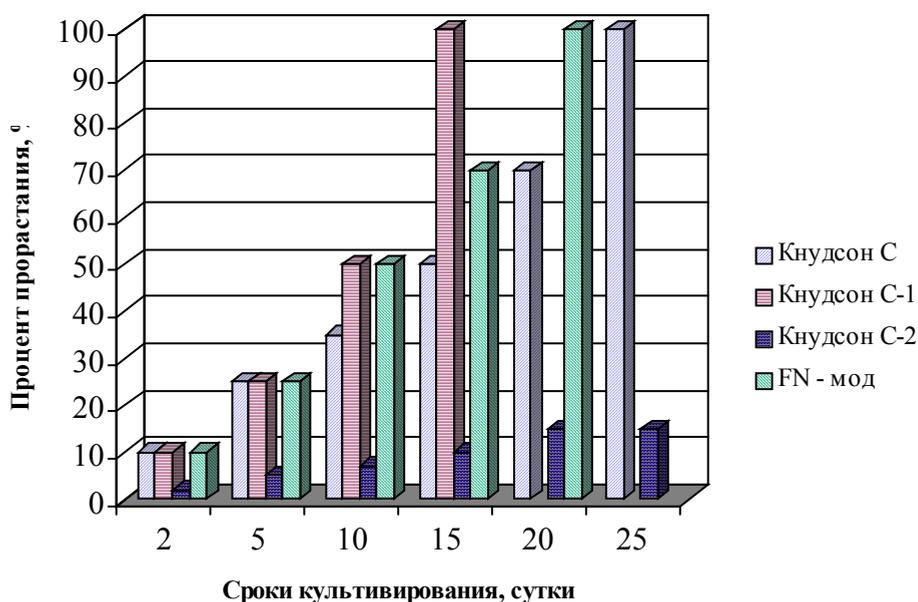


Рис. 1. Влияние сахарозы различной концентрации на скорость прорастания семян *C. damosonium*.

**Таблица 2.**  
**Влияние концентрации сахарозы на скорость прорастания семян**  
*C. damosonium* (количество набухших семян от общего количества высеванных на среду, в %)

Вариант питательной среды	Сутки культивирования					
	2	5	10	15	20	25
Кнудсон С	10 %	25 %	35 %	50 %	70 %	100 %
Кнудсон С-1	10 %	25 %	50 %	100 %		
Кнудсон С-2	2 %	5 %	7 %	10 %	15 %	15 %
FN –мод.	10 %	25 %	50 %	70 %	100 %	

При культивировании семян *C. damosonium* на четырех представленных вариантах сред были отмечены существенные различия скорости прорастания. Начиная с 5 суток культивирования, интенсивное набухание наблюдалось у семян на всех вариантах питательных сред, кроме среды Кнудсон С-2. На этом варианте среды слабое набухание (7 – 10 %) начиналось на 12 – 15 сутки культивирования, после чего процесс прорастания приостановился. На стандартной среде Кнудсон С интенсивное набухание длилось до 20 – 25 суток культивирования (70 – 100 %), затем формировались первичные протокормы. Наиболее быстрое прорастание

наблюдалось у семян, высаженных на среду Кнудсон С-1. Так, уже на 7 – 10 сутки культивирования набухало 50 % семян, а на 15 сутки происходило формирование протокормов. На среде FN модифицированной получены аналогичные результаты до 10 – 15 суток культивирования, затем скорость прорастания замедлялась по сравнению со средой Кнудсон С-1, причиной чему, возможно, послужил более сложный состав среды FN.

Эти результаты можно объяснить, сопоставив полученные данные с данными о динамике метаболитов в процессе формирования и прорастания семян орхидных. В таком случае, средняя скорость прорастания семян на стандартной среде Кнудсона С объясняется достаточным количеством углеводов для восстановления необходимого соотношения метаболитов. Максимальная интенсивность прорастания в варианте модификации Кнудсон С-1, возможно объясняется тем, что такое небольшое количество углеводов не только превышает необходимый порог, но и стимулирует превращение запасных липидов в крахмал, тем самым, обеспечивая быстрый выход из периода покоя. Замедленное прорастание на среде Кнудсон С-2 вероятно связано с превышающим норму количеством углеводов, для утилизации которых происходит их превращение в вещества липидной природы, что препятствует выведению семян из состояния покоя.

Таким образом, полученные результаты создают предпосылку для детального изучения динамики накопления запасных метаболитов в процессе формирования и прорастания семян орхидных и определения оптимальной стадии их развития для введения в культуру *in vitro*. Это позволит повысить эффективность метода семенного асимбиотического размножения.

### **ВЫВОДЫ**

1. Показано влияние концентрации сахарозы в питательной среде на скорость прорастания семян *C. damosonium*.
2. Выдвинута гипотеза, объясняющая зависимость скорости прорастания семян *C. damosonium* от динамики запасных метаболитов семени.
3. Показана необходимость детального изучения динамики накопления запасных метаболитов в процессе формирования и прорастания семян орхидных и определения оптимальной стадии их развития для введения в культуру *in vitro*.

### **Список литературы**

1. Поддубная-Арнольди В. А. Орхидеи и их культура / В. А. Поддубная-Арнольди, В. А. Селезнева. – М.: АН СССР, 1957. – 174 с.
2. Черевченко Т. М. Орхидеи в культуре / Т. М. Черевченко, Г. П. Кушнир. – К.: Наук. думка, 1986. – 200 с.
3. Шосер Г. Орхидеи. Выращивание в домашних условиях. Разведение и уход / Шосер Г. – М.: Интербук-бизнес, 1997. – 132 с.
4. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Куликов П. В. Симбиотическое прорастание некоторых нетропических орхидных *in vitro* / Куликов П. В., Филиппов Е. Г. // Охорона і культивування орхідей: міжнар. наук. конф., 15 – 18 сентября 1999 г. : тези доп. – К., 1999. – С. 57 – 58.

6. Батыгина Т. Б. Размножение растений / Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. – СПб.: С.-Петербург. ун-т, 2002. – 232 с.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
8. Андропова Е.В. Эмбриогенез и постсеменное развитие орхидных (на примере *Dactylorhiza baltica*, *D. Incarnate*, *Thunia marschalliana*, *Bletilla striata*): автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Е.В. Андропова. – Л., 1988. – 24 с.
9. Андропова Е. В. Эмбриогенез орхидных / Андропова Е. В. // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / [ред. Батыгина Т. Б.]. – СПб.: Мир и семья, 1997. – Т.3. – С. 544 – 556.
10. Шевцова Г. Г. Развитие репродуктивных структур *Cymbidium hybridum* Hort. и *Dactylorhiza maculate* L. (Soo) в культуре in vitro: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Г. Г. Шевцова. – Кишинев, 1989. – 25 с.
11. Теплицкая Л. М. Гистохимические исследования запасных веществ в тканях зародыша орхидных в процессе созревания семени / Теплицкая Л. М., Бугара А. М. // Охрана и культивирование орхидей: междунар. науч. конф., 6 – 8 октября 2003 г. : тезисы докл. – Х., 2003. – С. 59 – 60.
12. Здруйковская-Рихтер А. И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений / Здруйковская-Рихтер А. И. – Ялта: Никитский Бот. Сад, 2003 – 368 с.

*Астапенко Н.А. Вплив чинників оптимізації живильного середовища на процеси проростання насіння *Cephalanthera damosonium* (Mill.) Druce (Orchidaceae) // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 2. – С. 3-8.*

Представлені результати досліджень по впливу чинників оптимізації живильного середовища на процеси проростання насіння *Cephalanthera damosonium*. Встановлена залежність швидкості проростання насіння від концентрації сахарози в середовищі. Показана необхідність детального вивчення динаміки накопичення запасних метаболітів насіння для підвищення ефективності насінневого асимбіотичного розмноження.

**Ключові слова:** *Cephalanthera damosonium*, живильне середовище, насінне асимбіотичне розмноження.

*Astapenko N.A. Influence of optimization's factors of nutrient medium on the processes of *Cephalanthera damosonium* (Mill.) Druce (Orchidaceae) seed's germination // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 2. – P. 3-8.*

The results of researches on influence of optimization's factors of nutrient medium on the processes of *Cephalanthera damosonium* seed's germination are represented. Dependence of speed of seed's germination on the concentration of sucrose in a medium is set. It is shown the necessity of the detailed study of dynamics of seed's metabolites accumulation for the increase of efficiency of seed asymbiotic reproduction.

**Keywords:** *Cephalanthera damosonium*, nutrient medium, the seed asymbiotic reproduction.

*Поступила в редакцію 06.05.2009 г.*