

УДК 582.594.2:281

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИМБИОЗА В КУЛЬТУРЕ СЕМЯН *CERHALANTHERA DAMASONIUM* (MILL.) DRUCE IN VITRO

Теплицкая Л.М.

Все представители семейства *Orchidaceae* *Juss* природной формы Крыма 47 видов являются редкими и исчезающими растениями, занесены в Красную книгу Украины [1]. В естественных биоценозах у орхидных наблюдается длительное воспроизводство до 8-12 лет, что связано с особенностями биологии, зависимостью от специфических опылителей и микоризных грибов [2, 3].

Важную роль в сохранении этих растений играет поиск методов ускоренного размножения, введение в культуру, репатриация в природные фитоценозы, а также создание генетических банков и коллекций для сохранения генофонда.

Биотехнологические методы позволяют решать проблемы ускоренного и массового размножения орхидей. В настоящее время работы ведутся в двух направлениях: проращивание семян и микроклональное размножение.

Метод асимбиотического семенного размножения *in vitro*, предложенный Кнудсоном [4, 5] получил широкое распространение для тропических видов орхидных, а для видов умеренной зоны этот метод пока не приносит желаемых результатов, в связи с недостаточностью знаний о взаимосвязи растений со специфическими почвенными грибами.

Поскольку грибы, выделяемые из микоризы в искусственных условиях находятся, как правило, в вегетативном состоянии и лишь в исключительных случаях удается вызвать их спороношение, проблемой для исследователей является сложность их таксономической идентификации. Большинство выделенных грибов определены только до родовых названий. Микосимбионты орхидей, по данным Burgeff [6], относятся к базидиомицетам или несовершенным грибам из рода *Rhizoctonia*.

Обсуждается вопрос о взаимодействии неспецифической почвенной микрофлоры на проращивание семян орхидных в природе [7]. Бургефф [6, 8] разработал метод проращивания семян орхидных на искусственных питательных средах в присутствии симбиотических грибов. Однако, этот метод не получил широкого применения на практике из-за трудностей выделения и культивирования гриба.

Несмотря на длительную историю изучения микоризы орхидных в настоящее время остается ряд аспектов, по которым у исследователей не сформировалось единого мнения. Спорными остаются вопросы о видовой специфичности грибов, участвующих в симбиозе, влиянии условий среды и механизмы формирования

симбиотических ассоциаций, влиянии микотрофности растений на процессы онтогенеза и репродукции [7, 10 – 11].

Таким образом, необходимо отметить, что глубокое и разностороннее изучение сложных и до конца не выясненных взаимоотношений орхидных с микоризными грибами является не только важным аспектом в исследовании особенностей биологии орхидей, звеном в установлении путей эволюционного развития семейства, а так же окажет существенную помощь в разработке биотехнологических методов размножения орхидных в связи с задачами их охраны.

Целью работы было моделирование процесса симбиоза в культуре семян орхидных *in vitro*.

В задачи исследований входило решение следующих вопросов:

1. Получение чистой культуры симбиотического гриба.
2. Инокуляция семян грибом .
3. Индукция процесса прорастания семян *in vitro* в симбиотической культуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования использовали растения *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce. Семена отбирались из незрелых плодов через 30-35 дней после опыления их культивировали на питательной среде Кнудсона с добавлением пептона и активированного угля [4]. Кусочки корней этого вида помещали в чашки Петри с питательными средами Чапека-Докса и Боаса [12]. Стерелентами в работе были спирт (70%) и $AgNO_3$ (0,8%). Культуры выращивали в условиях термостата. Семена культивировали при t 20-25°C, а гриб при t 30°C. Микроскопические исследования проводили с помощью микроскопа Биолам 70, при увеличении $\times 10$, $\times 40$, $\times 90$. фотографирование препаратов проводилось при помощи фотонасадки МФН-12 фотоаппаратом "Зенит-Е" на фотопленку Konica-200, Konica-400.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований была получена чистая культура симбиотического гриба. Наиболее эффективным при получении эндосимбионта был метод множественных пассажей, суть которого заключается в получении смешанной культуры нескольких почвенных грибов, в том числе и эндофитного микоризного гриба полученных при посадке эксплантов корня и последующем их разделении. Участки корня высаживались в чашки Петри и культивировались в условиях термостата в темноте, при t 22-23°C. Через 5-7 дней вокруг эксплантов корней образовались колонии грибов белого цвета (рис. 1).

Через каждые 7-14 дней колонии перепассировались. Таким образом, в результате множественных пассажей была получена чистая культура гриба. Рост колонии происходит равномерно радиально во всех направлениях. При культивировании гриба на питательных средах разного состава была выявлена разная скорость роста колонии. Так, при культивировании на средах Чапека-Докса и

Боаса были выявлены следующие закономерности. На среде Чапека-Докса колония гриба увеличивается интенсивнее, чем на среде Боаса.

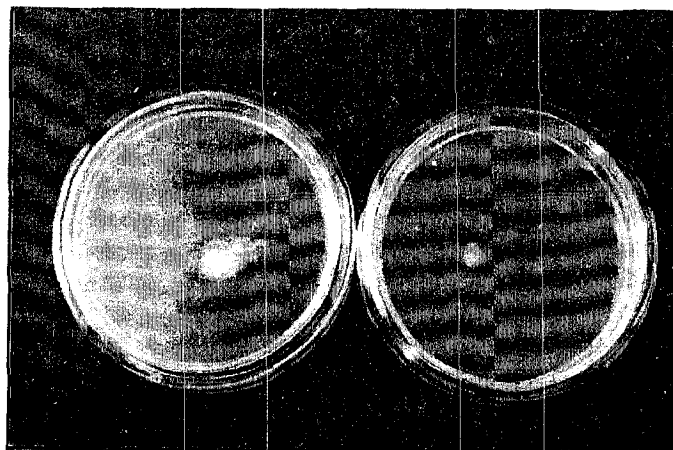


Рис. 1. Первичная культура симбиотического гриба.

К 8 дню культивирования диаметр колонии на среде Чапека-Докса составил 4,5 см, а на среде Боаса только 2,5 см (рис. 2). В генеративную стадию мицелий гриба вступает только к 12 дню культивирования. На среде Боаса спороношение наступает раньше (9-10 день культивирования). Это указывает на приспособление гриба к составу питательной среды Боаса. На основании этих данных логично сделать косвенные выводы о потребностях гриба в конкретных компонентах питательной среды и предположить, что получает гриб от подобных взаимоотношений с растением-хозяином.



Рис. 2. Интенсивность роста колонии эндомикоризного гриба вида *Cephalanthera damasonium*.

При изучении физиологического состояния колонии нами были выделены три стадии развития мицелия. Первая стадия – это молодой активно растущий мицелий, имеющий максимальную для заданных условий культивирования скорость роста. На рисунке (рис. 2) видно, что активный рост мицелия наблюдается до 8-9 дня культивирования и колония на среде Чапека-Докса достигает 4-4,5 см в диаметре. Второй этап развития мицелия, его физиологическое состояние, назван стадией "зрелого мицелия". Этот этап наступает после снижения скорости роста культуры. На рисунке видно, что это 8-10-12 дни культивирования, когда увеличение колонии происходит незначительно. Кривые на графике выходят на плато. У гриба этот период характеризуется началом спороношения – "стареющий мицелий", при этом наблюдается изменение цвета колонии, её деградация.

Микроскопические исследования показали, что гифы гриба септированы (рис. 3).

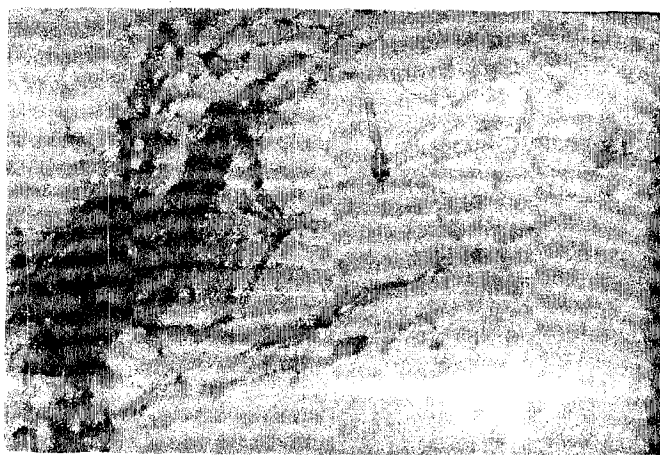


Рис. 3. Монокультура симбиотического гриба.

При изучении гиф мицелия в монокультуре и гиф в клетках корня растения-хозяина в качестве сравнительного морфологического показателя была взята ширина гиф. При измерении гиф гриба в монокультуре, также изучалась частота встречаемости гиф той или иной ширины на колонию в процентах, а в растении частота встречаемости гиф определенной ширины на группу клеток. Полученные данные сведены в таблицу (табл. 1).

Полученные данные могут служить косвенным критерием оценки при определении этапа развития гриба, его возраста. Ширина гиф изолированного гриба варьирует от $7,2 \pm 0,1$ мкм до $12,1 \pm 0,3$ мкм, наиболее часто встречаются гифы шириной $9,2 \pm 0,3$ (50%) и $11,6 \pm 0,2$ (20%) на колонию. Ширина гиф в клетках корня растения варьирует от $0,8 \pm 0,2$ мкм до $14,0 \pm 0,1$ мкм. Наиболее часто встречаются гифы шириной $12,2 \pm 0,3$ мкм (59%) на группу клеток зоны всасывания корня и $13,4 \pm 0,6$ мкм (18%).

Таблица 1.
Сравнительные морфологические показатели мицелия гриба в монокультуре и тканях корня растения вида *C. damasonium*

Ширина гиф в монокультуре гриба, мкм	Частота встречаемости на колонию, %	Ширина гиф в клетках корня, мкм	Частота встречаемости на группу клеток в растении, %
7,2±0,1	4,0	8,1±0,2	2,0
8,0±0,2	17,0	11,3±0,2	15,0
9,2±0,3	50,0	12,2±0,5	59,0
11,6±0,2	20,0	13,4±0,6	18,0
12,1±0,3	9,0	14,0±0,1	6,0

Из данных видно, что в монокультуре изолированного гриба основную массу составляют гифы шириной 9,2±0,3 мкм, а в тканях корня растения *C. damasonium* 12,2±0,5 мкм. На основании данных можно предполагать, что в тканях растения по возрасту гриба продвинул в своем жизненном цикле в отличие от монокультуры, в которой, возможно, недостаточно благоприятные условия для его развития. Ширина гиф мицелия является косвенным показателем физиологического развития гриба, соответствующего среде обитания.

В процессе эволюции у орхидных выработалось приспособление, обеспечивающее образование большого числа семян и широкое их распространение. Малые размеры семян орхидей коррелятивно связаны с возможностью растений производить их в ограниченном количестве, что является важным приспособительным фактором для распространения семян. Наличие однослойной сетчатой семенной оболочки, воздушной полости зародыша с минимальным запасом питательных веществ, отсутствие эндосперма обеспечивает им легкость и летучесть. В период зрелости семени зародыш представляет собой многоклеточное глобулярное образование с выраженной гистологической дифференциацией, которая проявляется в образовании апикально-меристематической и базально-паренхимной зон, наличие эмбриодермы.

Семена вида *C. damasonium* культивировали на среде Кнудсона [4]. Семена отбирались на стадии 30-35 дней после опыления. Зародыши в семенах представляли глобулярное образование, состоящее из однородных, вакуолизированных клеток в базальной зоне и мелких клеток в апикальной зоне (рис. 4).

В апикальной части размер клеток составлял 16,9±1,9 мкм, в базальной 19,2±2,3 мкм. Эндодерма представлена клетками 20,5±1,5 мкм. Семенная оболочка представлена одним слоем крупных клеток 30,35-35,2 мкм. Величина самого зародыша 0,05-0,07 мм. Развитие семени *C. damasonium* в культуре *in vitro* сопровождается следующими преобразованиями.



Рис. 4. Семя *C. damasonium* и мицелий гриба в культуре *in vitro*.

Через 14 дней зародыши набухают, увеличиваются в размерах до 0,09-0,15 мм, приобретают молочно-белую окраску. В апикальной зоне зародыща начинаются активные клеточные деления. Образовавшиеся клетки мелкие 10,5-15,0 мкм, с насыщенной цитоплазмой, слабо вакуолизированные. Одновременно происходит увеличение размеров клеток базальной зоны за счет их роста растяжением. Клетки более крупные 30,4-38,5 мкм, сильно вакуолизированы. Через 23 недели культивирования семян мы наблюдаем разрушение клеточных оболочек и дегенерацию отдельных клеток эмбриодермы. Это связано с началом процесса дифференциации и первыми этапами формирования проростка. Крупные клетки базальной зоны в совокупности со значительно увеличившейся массой клеток апикальной зоны образуют специфическую для орхидных структуру – протокорм, постсеменная стадия прорастания семени (рис. 5).

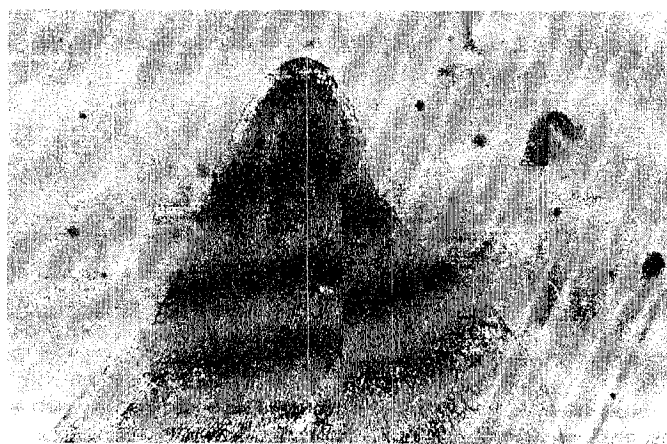


Рис. 5. Протокорм и начало формирования проростка.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИМБИОЗА В КУЛЬТУРЕ СЕМЯН

Через 2 недели культивирования семян в асептических условиях *in vitro* инокулировали монокультуру гриба и выдерживали семена до 6-12 недель. Частично наблюдалось проникновение гиф гриба внутрь семени в базальной зоне (рис. 6).

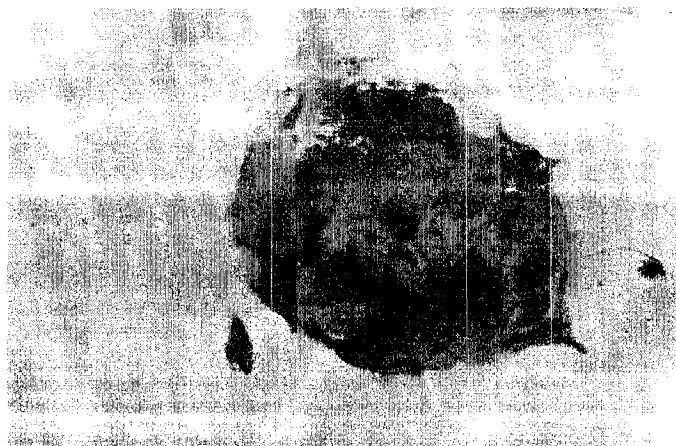


Рис. 6. Проникновение гиф гриба в зародыш семени *C. Damasonium*.

Проникновение гиф гриба активизировало прорастание семян. Пролиферация клеток зародыша и начало формирования протокормов наблюдалось через 8-12 недель. В то время как в контрольных образцах прорастание наблюдалось не ранее чем через 25-30 недель. В связи с полученными результатами по моделированию симбиоза эндофитных грибов и семян вида *C. damasonium* в экспериментальных условиях *in vitro* можно констатировать стимулирование процесса прорастания семян мицелием эндофитного гриба.

ВЫВОДЫ

1. Выделена чистая культура эндофитного микосимбионта вида *Cephalanthera damasonium*.
2. Даны основные биотехнологические характеристики монокультуры гриба: скорость роста, факторы культивирования, морфометрические параметры стадий развития гриба.
3. Монокультура использована для симбиотического культивирования семян *C. damasonium in vitro*.
4. Показана стимуляция процесса прорастания семян вида *C. damasonium* в условиях симбиотического культивирования *in vitro*.

Список литературы

1. Червона книга України. Рослинний світ / Под ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко. – К.: Українська енциклопедія, 1996. – 680 с.
2. Магру Ж. Симбиоз у орхидних и картофеля. – М.: ИЛ., 1949. – 150 с.
3. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. – К.: Наукова думка, 1986. – 200 с.

4. Knudson L. Flower production by orchid grown nonsymbiotically // Bot. Yar. – 1930. – Vol. 89. – P. 192-199.
5. Knudson L. A new nutrient solution for germination of orchids seeds // Am. Orchid. Soc. Bult. – 1946. – No. 4. – P. 214-217.
6. Бургеф Х. Микориза растений. – М.: Сельхозизд., 1963. – 370 с.
7. Kulikov P.V., Filipov E. The seed propagation in vitro of north temperate Orchids // Proc. 11 Int. Symp. "Embriol. and seed Reprod." Leningrad, July 3-7, 1970. – St. Peterburg, 1992. – С. 296-297.
8. Burgeff H. Mycorriza of orchids. // The orchids, a Scientific Survey / Ed. C. Withner. – N.Y.: Ronald Press, 1959. – P. 361-396.
9. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Система воспроизведения орхидных. // Охрана и культивирование орхидей. – Таллинн, 1980. – С. 107-110.
10. Вахрамеева М.Г., Денисова Л.В., Никитина С.В. Орхидеи нашей страны. – М.: Наука, 1991. – 224 с.
11. Терехин Э.С. Паразиты цветковых растений. – М.: Наука, 1977. – 218 с.
12. Черепанова Т.Н. Морфология и размножение грибов. – Л., 1981. – 119 с.

Поступила в редакцию 13.02.2006 г.